

美沙酮对小鼠肠道菌群的影响

黎勇¹, 申元英^{1,2}, 闵梦雅¹, 邓琦蕾¹, 张敏¹

1. 大理大学公共卫生学院, 云南 大理 671000; 2. 大理大学基础医学院

摘要: **目的** 通过研究美沙酮对小鼠肠道菌群的影响,探讨美沙酮与机体疾病发生的关系。 **方法** 将 75 只小鼠随机分为三组,分别用美沙酮、燕麦 β -葡聚糖和生理盐水进行灌胃,28 d 后收集小鼠粪便,提取细菌基因组 DNA,应用实时荧光定量 PCR 法对 6 种细菌进行定量。 **结果** 美沙酮组总肠道菌群 (9.93 ± 0.16 vs. 9.78 ± 0.17)、拟杆菌属 (8.84 ± 0.41 vs. 8.46 ± 0.54)、大肠杆菌 (7.08 ± 0.21 vs. 6.86 ± 0.05) 数量均显著高于生理盐水组 ($P < 0.05$)。 **结论** 美沙酮对小鼠肠道菌群有一定影响,能使小鼠粪便中总肠道菌群、拟杆菌属、大肠杆菌数量增加,肠道微生物定植抗力减弱。

关键词: 美沙酮; 肠道菌群; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)05-0524-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.05.004

Effect of methadone on intestinal flora in mice

LI Yong*, SHEN Yuan-ying, MIN Meng-ya, DENG Qi-lei, ZHANG Min

* School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

Corresponding author: SHEN Yuan-ying, E-mail: yuanyingshen@163.com

Abstract: **Objective** To explore the relationship between methadone and the occurrence of diseases by studying the impact of methadone on intestinal flora in mice. **Methods** Seventy-five mice were randomly divided into three groups, and then the three groups were intragastrically administered with methadone, oat β -glucan and normal saline respectively. Mouse faeces were sampled to extract bacterial genome DNA 28 days later, and then real-time fluorescence quantitative PCR was employed to detect the amounts of 6 kinds of bacteria. **Results** The total intestinal flora (9.93 ± 0.16 vs. 9.78 ± 0.17), *Bacteroides* (8.84 ± 0.41 vs. 8.46 ± 0.54) and *Escherichia coli* counts (7.08 ± 0.21 vs. 6.86 ± 0.05) were all significantly higher in the methadone group than in the normal saline group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Methadone has certain influence on the intestinal flora in mice, and it can increase the total intestinal flora, *Bacteroides* and *Escherichia coli* counts in the feces of mice, and decrease the intestinal microbial colonization resistance.

Key words: methadone; intestinal flora; real-time fluorescence quantitative PCR

美沙酮是一种二战期间人工合成的麻醉药品,药效与海洛因、吗啡相似。在临床上可用于癌症患者的镇痛,在公共卫生学方面主要用于阿片类依赖的替代维持治疗,是目前国内外使用最为广泛的戒毒药物之一。国内外的专家学者在美沙酮对机体免疫功能、精神心理状况、胃肠道功能的影响^[1-4],与过敏反应、炎症的关系^[5-6]等方面有过诸多的研究,但在肠道菌群方面还没有过文献报道。本实验用美沙酮对小鼠进行灌胃,分析美沙酮灌胃后小鼠肠道菌群的数量变化,以为美沙酮维持治疗人群在肠道菌群变化上提供实验参考资料,给美沙酮维持治疗者肠道疾病的诊断和

治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组及处理 健康 4~6 周龄雄性昆明种小鼠 75 只,体重在 20 g 左右,由西南医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号和使用许可证号分别为 SCXK(川)2013-17,SYXK(川)2013-065。给小鼠 3 d 适应环境后,随机分为 3 组,每组 25 只。用美沙酮口服液灌胃的小鼠为实验组,燕麦 β -葡聚糖溶液和生理盐水灌胃的小鼠分别为阳性对照组和阴性对照组。分别用 0.3 ml 美沙酮口服液(1 g/ml)、燕麦 β -葡聚糖溶液(0.042 g/ml)和生理盐水灌胃,每天在同一时间段灌胃一次。在鼠笼上提供适量的基础饲料和自来水,小鼠可以自由饮水和取食。实验期间小鼠饲养的环境温度控制在 19℃~21℃,湿度调节为 30%~

基金项目: 国家自然科学基金项目(81641095);2017 年度云南省教育厅科学研究基金项目(2017YJS012)

作者简介: 黎勇(1991-),男,在读研究生,研究方向:传染病流行病学。

通信作者: 申元英, E-mail: yuanyingshen@163.com。

40%, 12 h 明暗交替。连续灌胃 28 d 后, 将小鼠断颈处死, 在无菌条件下, 切开小鼠结肠和直肠, 用灭菌棉签取小鼠粪便于 1.5 ml EP 管中, 放入 -80 ℃ 冰箱内冻存备用, 时间不超过 1 h。

1.1.2 主要试剂 粪便基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖、Real Mastermix (SYBR Green I)、Taq PCR Mastermix、DNA 分子质量标准 (Marker)、无水乙醇、Loading buffer、TAE、TE 缓冲液等。

1.1.3 主要仪器 高压蒸汽灭菌锅、电热恒温水浴锅、掌上离心机、台式高速离心机、超净工作台、微量移液器、电子分析天平、超低温冰箱、超纯水系统、超微量分光光度计、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像分析系统、实时荧光定量 PCR 仪等。

1.2 观察指标及检测方法

1.2.1 小鼠生存状况和体重 在小鼠饲养和灌胃过程中, 随时观察小鼠的毛发、饮食、排便、精神状态和活动情况, 并做好记录。分别在灌胃前一天和灌胃开始后的第 7、14、21、28 d 对小鼠的体重进行测量。

1.2.2 粪便细菌基因组 DNA 的提取 将小鼠粪便在常温下融冻, 称取 0.2 g 标本, 使用试剂盒 (天根生化科技有限公司) 严格按照说明书操作, 提取小鼠粪便基因组 DNA, 放入 -20 ℃ 冰箱保存。

1.2.3 引物的设计与合成 总肠道菌群、拟杆菌属、双歧杆菌属、乳酸杆菌属、大肠杆菌、肠球菌属的引物设计参照文献 [7-12] 的报道, 根据细菌的 16S rDNA 基因序列设计各菌属 (种) 的特异性引物, 在 BLAST 在线软件对比 6 对引物的特异性后, 送到上海生工生物工程公司合成。引物序列见表 1。

表 1 6 种菌属 (种) 的 PCR 扩增引物序列

扩增菌种	扩增片段长度 (bp)	引物序列 (5'-3')
肠道总菌群	200	F (20): 5'-ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3' R (17): 5'-ATTACCGCGGCTCTG-3'
拟杆菌属	200	F: 5'-CTGAACCAAGTAGCG-3' R: 5'-CCGCAAACTTTCACAACTGACTTA-3'
双歧杆菌属	243	F: 5'-TCGCGTC (C/T) GGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGC (A/G) TCCAC-3'
乳酸杆菌属	341	F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R: 5'-CACCAGTACACATGGAG-3'
大肠杆菌	340	F: 5'-GTTAATACCTTTGCTCATTGA-3' R: 5'-ACCAGGATATCTTAATCCTGTT-3'
肠球菌属	144	F: 5'-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3' R: 5'-ACTCGTGTACTCCCATGTT-3'

1.2.4 构建重组质粒 提取大鼠粪便细菌基因组 DNA 作为模板, 用设计的 6 对引物对目的 DNA 片段

进行 PCR 扩增, 用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行验证, 验证无误后, 使用胶回收试剂盒对扩增片段进行回收和纯化, 将纯化后的扩增片段与 pMD 19-T Vector 载体连接, 转入到 E. coli DH5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑实验挑选白色菌落接种到 5 ml LB 液体培养基中, 37 ℃、225 r/min 在恒温培养箱内培养 14 h, 吸取 4 ml 的浑浊菌液, 用质粒小提试剂盒提取质粒, 质粒提取完成后用超微量分光光度计测定浓度。

1.2.5 引物特异性检测 对上述 6 种重组质粒进行常规 PCR 扩增, 反应体系 20 μ l: 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, DNA 模板 2.0 μ l, 灭菌 ddH₂O 7.0 μ l。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 总菌属 60 ℃、拟杆菌属 62 ℃、双歧杆菌属 58 ℃、乳酸杆菌属 58 ℃、大肠杆菌 60 ℃、肠球菌属 61 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 ℃ 后延伸 8 min。-4 ℃ 保存。取 3 μ l 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上上样, 将电压设置为 100 V, 时间设置为 40 min 进行电泳, 电泳完毕后在凝胶成像系统中拍照。

1.2.6 构建标准曲线 对已知浓度的重组质粒进行 10 倍系列稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$), 通过预实验确定其中的 5 个梯度作为各个菌属 (种) 的标准品。实时荧光定量 PCR 时, 系统会根据读取的荧光数据生成 Ct 值与已知的细菌拷贝数的对数值构建标准曲线, 并生成相应线性范围内的回归方程。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法对待测样本进行定量 将待测样品 DNA 浓度调整为 20 μ g/ml, 用实时荧光定量 PCR 法分别对待测粪便样品的 6 种菌属 (种) 进行定量, 每次反应均设置标准品同时进行扩增, 并以灭菌 ddH₂O 替代 DNA 模板作为阴性对照。反应体系 20 μ l: 2 \times SYBR Mixture UNG (含 ROX) 10 μ l, 上、下游引物各 0.75 μ l, DNA 模板 2.0 μ l, 灭菌 ddH₂O 0.5 μ l。扩增程序: 50 ℃ UNG 酶作用 5 min, 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环。循环完毕后进入溶解曲线的反应程序, 根据溶解曲线中的特征峰来判断 PCR 产物的特异性。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 进行数据处理与分析。小鼠体重用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用重复测量方差分析; 粪便 DNA 样品定量数据经过对数转换后, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (方差齐) 或完全随机设计多个样本资料的秩和检验 (方差不齐), 分析美沙酮组、燕麦 β -葡聚糖组、生理盐水组之间有无统计学差异, 任意两组之间的比较采用 LSD-*t* 检验 (方差齐) 或 Wilcoxon 秩和检验 (方差不

齐), 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

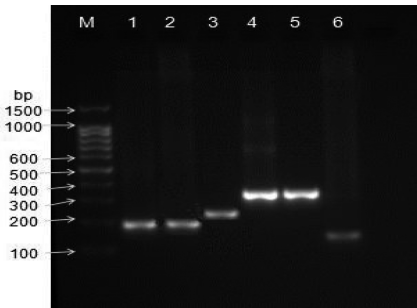
2.1 小鼠生存状况和体重 小鼠饲养和灌胃期间, 三组小鼠一般生长状况良好, 毛发鲜亮, 柔顺, 饮食及大小便正常, 活动度良好, 未见精神萎靡或者过度亢奋的情况。三组小鼠之间的生存状态无明显区别。随着时间的推延, 三组小鼠体重均保持稳步增长, 统计学分析结果表明, 不同时期小鼠体重差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而不同分组之间小鼠体重差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 五个时点小鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	给药前	给药后			
		第 7 d	第 14 d	第 21 d	第 28 d
美沙酮组	22.55±2.05	25.02±1.90	26.63±1.75	27.40±1.96	28.47±2.28
生理盐水组	22.71±1.69	24.83±1.58	26.06±1.65	27.12±1.33	28.33±1.29
燕麦 β -葡聚糖组	22.60±1.71	24.43±1.95	26.20±1.77	27.33±1.91	28.37±1.85

注: 不同时期: $F=129.76, P=0.001$; 不同分组: $F=0.513, P=0.601$; 时间 \times 分组: $F=0.280, P=0.972$ 。

2.2 引物特异性分析 用 6 对特异性引物对 6 种菌属(种)进行常规 PCR 扩增后, 扩增产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 6 种菌属(种)的产物均出现单一条带, 用 Marker 作为参照, 本实验扩增产物的长度与已知的 DNA 片段长度一致。见图 1。



注: M、1~7 分别代表 Marker、总肠道菌群、拟杆菌属、双歧杆菌属、乳酸杆菌属、大肠杆菌、肠球菌属。

图 1 常规 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 扩增曲线 本实验中扩增曲线平滑, 呈 S 型, 明显的分为基线期、对数期和平台期三个阶段, 且同一样本的 3 个平行样的曲线重合度好, 说明扩增曲线可行。见图 2。

2.4 标准曲线 本实验的斜率在 -3.3 左右, $R^2>0.99$, E 接近于 100%, 表示标准曲线可行。见图 3。

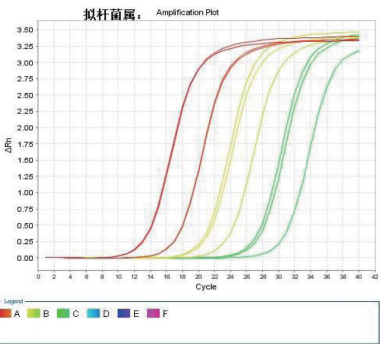


图 2 扩增曲线(以拟杆菌属为例)

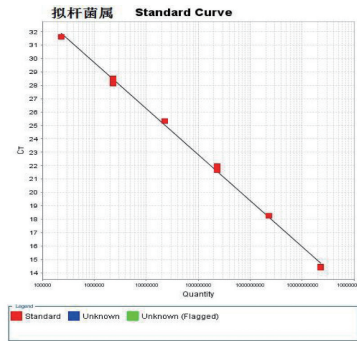


图 3 标准曲线(以拟杆菌属为例)

2.5 熔解曲线 本实验 6 种菌属(种)的熔解曲线均为单峰, 且特征峰所对应的 T_m 值与相关文献报道的相同, 说明引物特异性好。见图 4。

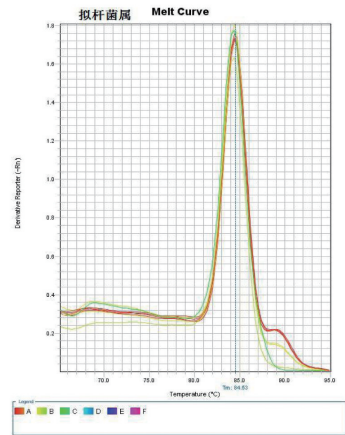


图 4 熔解曲线(以拟杆菌属为例)

2.6 实时荧光定量 PCR 法对待测样品进行定量 美沙酮组和燕麦 β -葡聚糖组总肠道菌群、拟杆菌属、大肠杆菌的数量多于生理盐水组 ($P<0.05$), 燕麦 β -葡聚糖组乳酸杆菌属数量多于生理盐水组 ($P<0.05$)。三组之间双歧杆菌属与大肠杆菌的比值 (B/E 值) 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 6 类菌属的定量结果(拷贝数的对数值/20 μ g DNA)

组别代号	分组	例数/统计值	总肠道菌群	拟杆菌属	双歧杆菌属	乳酸杆菌属	大肠杆菌	肠球菌属	B/E 值
1	美沙酮组	25	9.93±0.16	8.84±0.41	5.64±0.77	7.13±0.44	7.08±0.21	5.35±0.41	0.79±0.12

续表 3

组别代号	分组	例数/统计值	总肠道菌群	拟杆菌属	双歧杆菌属	乳酸杆菌属	大肠杆菌	肠球菌属	B/E 值
2	生理盐水组	25	9.78±0.17	8.46±0.54	5.30±0.71	7.00±0.30	6.86±0.05	5.09±0.31	0.77±0.10
3	燕麦 β-葡聚糖组	25	9.85±0.10	8.74±0.43	5.32±0.57	7.29±0.36	7.09±0.06	4.87±0.66	0.75±0.08
总体比较		<i>F</i> / <i>X</i> ² 值	11.891	4.605	3.697	3.610	44.159	6.648	1.203
		<i>P</i> 值	0.003	0.013	0.157	0.032	0.001	0.002	0.548
1 vs. 2		<i>t</i> / <i>Z</i> 值	-3.031	4.180	-1.804	1.762	-5.412	2.722	-0.534
		<i>P</i> 值	0.002	0.004	0.071	0.217	0.001	0.058	0.594
3 vs. 2		<i>t</i> / <i>Z</i> 值	-2.035	3.007	-0.754	3.798	-6.067	2.351	-0.825
		<i>P</i> 值	0.042	0.037	0.451	0.009	0.001	0.100	0.410

3 讨 论

肠道菌群是近年来国内外研究的一个热点问题。机体肠道内的菌群在种属、比例和数量上均保持着一个动态平衡状态,一旦这种平衡被打破,就有可能引发疾病^[13]。文献报道显示:肠道菌群与肥胖、糖尿病、营养不良等代谢性疾病^[14-17],炎症性肠病、胃肠道癌症、肠易激综合症等消化系统疾病^[18-20],焦虑和抑郁症^[21],艾滋病^[22]等诸多疾病均有关联,近两年还发现肠道菌群可以促进神经系统的发育和功能的完善^[23],对婴儿的成长同样有帮助^[24],由此可见对肠道菌群进行研究的重要性。我国从 2004 年开始开设美沙酮维持治疗门诊,截止到 2016 年 6 月 30 日,全国在治人数已经达到了 161 975 人,服用美沙酮的人数越来越多,这些人加入替代维持治疗以后的生存状况和服药不良反应,也越来越受到关注。研究美沙酮对肠道菌群的影响是一个极具创新的切入点,具有很大的公共卫生学意义。肠道菌群的变化受到遗传、饮食、药物、年龄、性别等诸多因素的影响,不可控因素较多,所以本研究用动物实验代替对人体的研究,采用美沙酮对小鼠灌胃,可以对小鼠的体重、性别、活动范围、饮食等进行限制,尽可能的减少美沙酮以外的因素对小鼠肠道菌群的影响。

实时荧光定量 PCR 法是目前一项比较成熟和应用较为广泛的分子生物学技术,该技术能够弥补传统培养的许多不足,极大的减少了检测所花费的时间,具有污染途径少、特异性强、灵敏度高、重复性好、自动化程度高、定量准确等诸多优点。扩增曲线、标准曲线和熔解曲线是实时荧光定量 PCR 的三个主要组成部分。扩增曲线是描述 PCR 动态进程的曲线,用于表示不同样品的循环次数与荧光强度之间的关系。通过比较 3 个

平行样的扩增曲线的重合度,可以检验同一个样品的扩增重复性的好坏;对比每条扩增曲线与阈值线的交点相差的距离,能够判断标准曲线的优劣。标准曲线用于待测样品的定量,通过系统生成的 Ct 值和线性回归方程可以计算出待测样品的拷贝数。通过标准曲线的斜率、相关系数(*R*²)和扩增效率(*E*)可以判断质粒标准品稀释的精确度、结果的可信度以及扩增的准确性。熔解曲线用于进一步验证引物的特异性。如果熔解曲线为单峰,表明扩增产物单一,与 SYBR Green I 荧光染料结合的为目的 DNA 片段。与阴性对照对比,可以判断有无引物二聚体生成、污染和非特异性片段的扩增。

研究结果显示,燕麦 β-葡聚糖组的总肠道菌群、拟杆菌属、乳酸杆菌属、大肠杆菌的数量均有所增加,肠球菌属和双歧杆菌属则没有变化。与申瑞玲等^[25]的双歧杆菌,乳酸杆菌数量增加,大肠杆菌数量减少的研究结果有所不同。主要原因可能是申瑞玲等用的是传统培养的方法,跟实时荧光定量 PCR 法不同的是,传统培养的方法只能培养出 20%~30% 的细菌,同时乳酸杆菌属、双歧杆菌属的培养比较困难^[26],所以对细菌数量的鉴定不够准确。而且传统培养只能对活菌进行培养,但实时荧光定量 PCR 法不仅能检出活菌的核酸,也能检出死菌的核酸^[27]。

研究结果显示:美沙酮组小鼠的肠道菌群中,总菌群、拟杆菌属、大肠杆菌的数量有所增加。双歧杆菌属、乳酸杆菌属则没有差异。拟杆菌属很少单独致病,常与其他菌(如大肠杆菌等)混合感染,在机体免疫功能紊乱或菌群失调时,能导致内源性感染。肠道微生物定值抗力指肠道内源性专性厌氧菌抑制消化道中主要属需氧菌的潜在致病菌群数量的能力^[28],起到预防

和控制肠道传染性疾病的作用^[29],通常用双歧杆菌属/大肠杆菌(B/E 值)表示,用 B/E 值代表厌氧菌和需氧菌的数量比例,一般用 10 作为分界线,小于 10 就可以认为肠道菌群比例失调^[26]。粪便肠杆菌、肠球菌、酵母菌的数值可作为肠道微生物定植抗力的指标,三者数量的增加表明肠道定植抗力受到削弱或下降^[30]。本实验中,美沙酮组、生理盐水组和燕麦 β -葡聚糖的 B/E 值分别是(0.79±0.12)、(0.77±0.10)和(0.75±0.08),三组菌群的 B/E 值差异无统计学意义($P>0.05$),但从另一方面分析,与生理盐水组相比,美沙酮组小鼠的大肠杆菌数量增加,而双歧杆菌属没有变化,从侧面反映了 B/E 值减小,且 B/E 值倒置,提示美沙酮组小鼠肠道微生物定植抗力下降。文献报道,阿片类药物对免疫系统有抑制作用^[31],而双歧杆菌和乳酸杆菌均有提高机体免疫力的作用,本实验结果中,美沙酮组小鼠双歧杆菌属和乳酸杆菌属的数量没有变化,尚不能说明美沙酮会通过减少双歧杆菌属和乳酸杆菌属的数量对机体起到免疫抑制的作用,还需要做进一步的研究。

综上所述,本实验研究美沙酮对小鼠肠道中总菌群、拟杆菌属等 6 种菌属(种)的影响,应用实时荧光定量 PCR 法快速、准确的对小鼠粪便中的菌群进行定量,结果显示美沙酮组小鼠与生理盐水组小鼠肠道菌群数量差异有统计学意义,表明美沙酮对小鼠的肠道菌群具有一定影响作用。

参考文献

- [1] Hutchinson MR, Somogyi AA. (S)-(+) -methadone is more immunosuppressive than the potent analgesic (R)-(-) -methadone[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1525-1530.
- [2] Fulton HG, Barrett SP, Macisaac C, et al. The relationship between self-reported substance use and psychiatric symptoms in low-threshold methadone maintenance treatment clients[J]. Harm Reduct J, 2011, 8(1): 1-10.
- [3] Beitel M, Peters S, Savant JD, et al. The psychometric properties of the iowa personality disorder screen in methadone-maintained patients: an initial investigation[J]. J Pers Disord, 2015, 29(1): 131-144.
- [4] Lugoboni F, Mirijello A, Zamboni L, et al. High prevalence of constipation and reduced quality of life in opioid-dependent patients treated with opioid substitution treatments[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(16): 2135-2141.
- [5] Lee MR, Cooper A. Desquamating rash associated with methadone use[J]. Australas J Dermatol, 2006, 47(2): 145-148.
- [6] Chan YY, Yang SN, Lin JC, et al. Inflammatory response in heroin addicts undergoing methadone maintenance treatment[J]. Psychiatry Res, 2015, 226(1): 230-234.
- [7] 程悦,左浩江,廖虹瑜,等. 肠道常见菌群荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 现代预防医学, 2014, 41(23): 4338-4341.
- [8] 蒋曼,高鸿亮,姚萍. RT-PCR 技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(4): 596-600.
- [9] 宋美茹,姚萍. 应用实时荧光定量 PCR 定量检测溃疡性结肠炎肠道大肠埃希菌乳酸杆菌及双歧杆菌属的变化[J]. 中国微生态学杂

- 志, 2012, 24(3): 239-243.
- [10] 褚源. 溃疡性结肠炎患者腔菌群及膜菌群变化的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [11] 郭世奎,包维民,龚昆梅,等. 实时荧光定量 PCR 法研究结直肠癌患者肠道拟杆菌属、梭杆菌属和梭菌属量的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(1): 24-28.
- [12] 白鹏,吕愈敏,顾芳. 细菌 16SrDNA 荧光定量 PCR 法分析溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(7): 566-571.
- [13] 刘玉婷,郝微微,温红珠,等. 肠道菌群的检测方法及其研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(20): 3142-3148.
- [14] Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance[J]. Physiology, 2016, 31(4): 283-293.
- [15] Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity diabeters[J]. Clin Chem, 2013, 59(4): 617-628.
- [16] Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2013, 27(1): 73-83.
- [17] Blanton LV, Barratt MJ, Charbonneau MR, et al. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics[J]. Science, 2016, 352(6293): 1533.
- [18] Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease[J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(1): 47-55.
- [19] Asquith M, Powrie F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer[J]. J Exp Med, 2010, 207(8): 1573-1577.
- [20] Bustos Fernandez LM, Lasa JS, Man F. Intestinal microbiota: its role in digestive diseases[J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(8): 657-666.
- [21] Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression[J]. Trends Neurosci, 2013, 36(5): 305-312.
- [22] Mudd JC, Brenchley JM. Gut mucosal barrier dysfunction, microbial dysbiosis, and their role in HIV-1 disease progression[J]. J Infect Dis, 2014(2): 58-66.
- [23] Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, et al. The central nervous system and the gut microbiome[J]. Cell, 2016, 167(4): 915-932.
- [24] Pennisi E. The right gut microbes help infants grow[J]. Science, 2016, 351(6275): 802.
- [25] 申瑞玲,王章存,姚惠源. 燕麦 β -葡聚糖对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 208-212.
- [26] 郭世奎,包维民,龚昆梅,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法分析结直肠癌患者肠道菌群变化[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17(5): 463-468.
- [27] 田梅,沈静. 实时荧光定量 PCR 法与常规细菌鉴定法检测肠道致病菌的比较[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(10): 1221-1223, 1237.
- [28] 任效东,陈庆森,李俊洁,等. 酪蛋白糖巨肽和乳铁蛋白灌胃对小鼠肠道微生物定植抗力的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 282-286.
- [29] Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance[J]. Immunology, 2013, 138(1): 1-11.
- [30] 吴仲文,李兰娟,马伟杭,等. 肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值[J]. 浙江预防医学, 2000, 12(1): 4-5.
- [31] Garcia JB, Cardoso MG, Dos-Santos MC. Opioids and the immune system: clinical relevance[J]. Rev Bras Anesthesiol, 2012, 62(5): 709-718.

收稿日期: 2017-07-03