DOI:10.16016/j.1000-5404.201512113

肠道菌群影响无菌小鼠对卵清蛋白的敏感性

郑 爽[1],赵新凤[1],曾本华[2],魏 泓[2],程 茜[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童保健科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室[1];400038 重庆,第三军医大学基础部实验动物学教研室[2])

[摘要] **目的** 通过观察过敏和无过敏反应小鼠肠道菌群在无菌小鼠肠道内定植后对卵清蛋白(OVA)刺激的反应,探究肠道菌群在食物过敏中的作用。**方法** 采集用卵清蛋白成功诱导出的过敏和无过敏反应 SPF 级小鼠的粪便,分别移植给无菌小鼠(各 10 只),为过敏组(FA 组)和无过敏反应组(NR 组)。粪菌移植后第 3 周,两组分别随机抽取 7 只再用 OVA 激发为实验组(FA-o 组、NR-o 组),余 3 只为生理盐水对照组(FA-c 组、NR-c 组)。用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术评价粪菌移植后肠道菌群在肠道内的定植情况,比较 FA 组和 NR 组肠道菌群的差别。观察两组再用 OVA 激发后的临床表现,HE 染色观察小鼠空肠组织形态学改变。**结果** (1)粪菌移植后第 3 周,与供体小鼠相比,FA 组与 NR 组小鼠肠道菌群的 DGGE 条带多数一致,而 FA 组与 NR 组肠道菌群比较,DGGE 条带有明显不同,聚类分析和主成分分析(principal component analysis,PCA)两组均能很好分离,测序结果也表明无过敏反应组中厚壁菌门的细菌占优势,过敏组中变形菌门的细菌占优势;(2)移植粪菌的无菌鼠再次用 OVA 激发时,FA-o 组有临床表现,NR-o 组无明显临床表现;HE 染色可见 FA-o 组较 NR-o 组小鼠空肠绒毛上皮细胞局灶性坏死、脱落,炎性细胞浸润明显严重。**结论** 肠道菌群不同使无菌小鼠对 OVA 的敏感性不同,说明肠道菌群的变化可能是食物过敏的始动因素,肠道菌群可传递宿主对食物过敏的敏感性。

[关键词] 肠道菌群;食物过敏;无菌小鼠;粪菌移植;传递

[中图法分类号] R372;R378.2;R392.8 [文献标志码] A

Influence of intestinal microbiota on sensitivity in germ-free mice to ovalbumin

Zheng Shuang[1], Zhao Xinfeng[1], Zeng Benhua[2], Wei Hong[2], Cheng Qian[1]([1]Department of Child Health Care, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of intestinal microbiota on food allergy through observing the reaction of germ-free mice to ovalbumin (OVA) stimulation after transplantation with fecal microbiota to allergic and non-allergic reaction SPF mice. **Methods** The intestinal microbiota of the allergic and non-allergic reaction SPF mice that were successfully induced by OVA were respectively transplanted into the germ-free mice to establish the allergic reaction group (FA group) and non-allergic reaction group (NR group), with 10 mice in each group. At the 3rd week after transplantation, 7 mice in each group were randomly selected for OVA treatment and defined as FA-o group and NR-o group, and the rest 3 mice in each group were treated with sodium chloride physiological solution and defined as FA-c group and NR-c group. The colonization of the intestinal microbiota in the germ-free mice after transplantation was detected by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and the differences of microbiota composition between FA

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370906);国家高技术研究发展计划(863 计划)(2014AA022209, 2014AA022204)

[通信作者] 程 茜,E-mail: chqq5@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160422.1533.012.html(2016-04-22)

group and NR group were compared. The clinical symptoms of the 2 groups after OVA stimulation were observed, and then the morphological changes of intestinal tissue were examined by HE staining. **Results** At the 3rd week after fecal microbiota transplantation, the DGGE bands were almost the same in the FA group and NR group as their own donor's, but the DGGE bands of the FA group and NR group were significantly different. The 2 groups showed a clear separation in cluster analysis and principal component analysis (PCA). The sequencing results also showed that Firmicutes was predominate in the NR group, whereas Proteobacteria was dominant bacteria in the FA group. After OVA stimulation, the FA-o group had more obvious clinical symptoms than the NR-o group. HE staining showed that the FA-o group had more serious pathological changes than the NR-o group, such as inflammatory cell infiltration, focal necrosis and shedding of the epithelial cells in the intestinal villi. **Conclusion** The intestinal microbiota can affect the sensitivity to OVA in the transplanted mice, and the sensitivity to food allergy can be transmitted *via* the intestinal microbiota.

[**Key words**] intestinal microbiota; food allergy; germ-free mice; fecal microbiota transplantation; transmission

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81370906) and the National High Technology R&D Program of China (863 Program,2014AA022209, 2014AA022204). Corresponding author: Cheng Qian, E-mail:chqq5@126.com

食物过敏(food allergy,FA)是一种常见的变态反应性疾病,由机体对某些食物蛋白产生异常的免疫反应所致。研究表明,食物过敏患儿的肠道菌群与正常儿童的肠道菌群组分存在差异[1-4]。食物过敏动物模型的研究结果亦是如此[5]。近年来,临床上也提出用粪菌移植治疗食物过敏的观点[6-7]。但迄今为止,肠道菌群变化与食物过敏的因果关系尚不明了。本研究通过观察无菌 Balb/c 小鼠移植不同粪便菌群后对卵清蛋白(ovalbumin,OVA)敏感性的变化,分析肠道菌群在食物过敏发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 过敏和无过敏反应小鼠粪便的制备和采集

选择 30 只 SPF 级 Balb/c 小鼠(5 周龄,雌性,第三军医大学实验动物中心提供),用 OVA 加免疫佐剂 $AL(OH)_3$ 灌胃及腹腔注射诱导食物过敏,致敏成功后,分别选出过敏和无过敏反应的供菌小鼠,采集粪便。无菌环境中分别称取 1 g 粪便,加入 100 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)缓冲液中混匀。取粪便混悬液与 60% 无菌甘油按 3∶1的比例加入灭菌离心管,-80 ℃ 冻存备用。

1.2 实验分组及 OVA 致敏移植小鼠

1.2.1 实验分组 无菌 Balb/c 小鼠($n=20$,5 周龄,雌性)由第三军医大学实验动物中心提供。饲养于专用的无菌隔离器中,饲养环境温度为 20 ~ 26 ℃,湿度为 40% ~ 70%,光照周期明暗比为 12 h∶12 h。经 ^{60}Co γ 射线 40 kGy 辐照消毒的无菌、不含鸡蛋的特殊饲料,自由采食和饮水(饮水、垫料、鼠笼和饮水瓶等均采用高温高压灭菌,121 ℃,60 min)。

无菌 Balb/c 小鼠随机分为两组,每组 10 只,移植过敏小鼠粪菌组为 FA 组,移植无过敏反应小鼠粪菌组为 NR 组。粪菌移植操作在隔离器中完成。移植后第 3 周,从两组中分别随机挑出 7 只进行 OVA 致敏,为实验组(FA-o 组和 NR-o 组);两组中的另外 3 只予以等量生理盐水腹腔注射和灌胃,为生理盐水对照组(FA-c 组和 NR-c 组)。

1.2.2 OVA 致敏 参考文献[8]报道的方法,按基础致敏、强化致敏和肠道激发的步骤处理各组小鼠。粪菌移植后的第 3 周和第 7 周定时取新鲜粪便,装于 1.5 mL 无菌 EP 管中,-80 ℃冻存备用。

1.3 粪便菌群总 DNA 提取

分别取冻存备用的小鼠粪便 20 mg,置于 2 mL 螺口管(BioSpec)中,加入 700 μL 裂解液[500 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,50 mmol/L EDTA,4% SDS],250 μL 酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)和 0.2 g 锆珠(0.5 mm,BioSpec)混匀,以最大速度研磨 2 min,4 ℃下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液加入 10 mol/L 乙酸铵 250 μL,DNA 随即使用 2 次酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1) 250 μL 和氯仿 250 μL 提取,异丙醇沉淀。70% 乙醇洗涤沉淀,风干后,每管加 50 μL 去离子水,再加入适量 DNAfree-RNAase(10 mg/μL),去除其中的 RNA,于 37 ℃中孵育 15 min,然后使用 NaNodrop ND-1000 测定 DNA 的含量。

1.4 PCR-DGGE 分析

1.4.1 16S rRNA V3 区 PCR 引物为大肠埃希菌 16S rRNA 基因 341 ~ 534 碱基的片段[9],GC 上游:5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCAC-GGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3′, 下游:5′-AT-

TACCGCGGCTGCTGG-3′。PCR 使用 25 μL 扩增体系:12.5 μmol/L Mix,上下游引物各 0.5 μmol/L,DNA 模板为 1 μmol/L,ddH_2O 10.5 μmol/L。反应程序:94 ℃预变性 5 min,包括 30 个循环,每个循环包括 94 ℃变性 30 s,65 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,最终延伸 72 ℃ 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。

1.4.2 16S rRNA V6~V8 区 PCR 引物对应于大肠埃希氏菌 16S rRNA 基因 968~1 401 碱基的片段,GC 上游:5′-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3′,下游:5′-CGGTGTGTACAAGACCC-3′。下划线部分为 GC 夹子。PCR 反应体系和程序同 1.4.1。为了纯化,第一次 PCR 的产物稀释 10 倍作为 Reconditioning PCR[10] 的模板。扩增体系和反应程序均与第一次相同。

参考文献[9]报道的方法,对 PCR 产物进行 DGGE 分析。DGGE 使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,将 100% 变性梯度定义为包含 40%(体积比)甲酰胺和 7 mol/L 尿素,电泳采用 DCodeTM Universal Mutation Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA),V3 区使用 30%~60% 变性梯度,V6~V8 区 DGGE 变性梯度为 32%~56%。电泳缓冲液为 1×TAE(pH 8.0)。条件是 220 V 预电泳 10 min,然后设定 60 ℃和 85 V 电泳 16 h。结束后,使用硝酸银进行染色,并拍照。

1.5 相似性非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)聚类分析和主成分分析(principal component analysis,PCA)

使用 Quantity One 4.6.2 对 DGGE 图谱进行数字化分析,检测条带的迁移位置和亮度,得到各泳道的条带数和亮度的数字化信息,得出关于条带位置和亮度的二维矩阵,然后采用 UPGMA 聚类法得到进化树。采用多变量统计对 PCR-DGGE 指纹图谱的数字化信息进行 PCA 分析,将前面获得的条带位置和亮度的二维矩阵转化为条带位置和相对亮度的二维矩阵。在 SPSS 13.0 中运行 PCA 分析,得到贡献率最大的两个主成分,再用 Originlab 8.0 软件绘制散点图。

1.6 PCR-DGGE 凝胶回收与测序

无菌手术刀片割下 DGGE 凝胶上有差异的条带,无菌双蒸水冲洗数次后放入 1.5 mL EP 管中,捣碎,加入 100 μL 无菌双蒸水,4 ℃静置 16 h。取 5 μL 上清液为模板进行 PCR 扩增,引物序列不带 GC 夹子,其余 PCR 反应体系和程序同 1.4.1。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,结果若为阳性就再进行一次 DGGE。在胶上显示单一条带的,将 PCR 产物测序;若在 DGGE 胶上不为单一条带,则选择最亮条带重新割胶回收。

测序结果使用 BioEdit 软件去除载体序列,再登录 NCBI 网站,在 GenBank 中进行序列 Blast 比对,找到最相似的菌属,并向 GenBank 中提交该序列,获得序列登录号。

1.7 小肠组织 HE 染色观察

粪菌移植后第 7 周,用脱臼的方法处死小鼠,剪取 1 cm 位于 Tretiz 韧带下方 5 cm 处的小肠,然后将标本固定于 4% 多聚甲醛 24 h。梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片(4 μm),HE 染色。镜下观察并拍照。

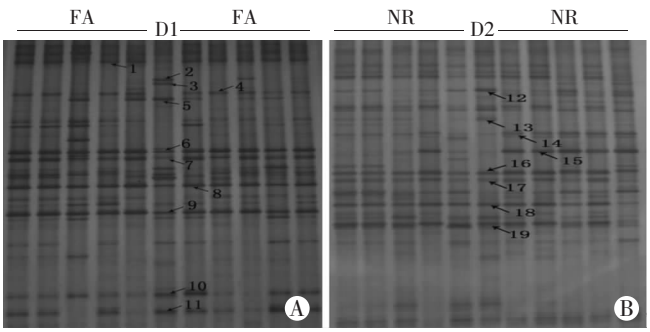
1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,多组间采用单因素方差分析,进一步的两组间比较采用 Student-Newman-Keuls 法(q 检验),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

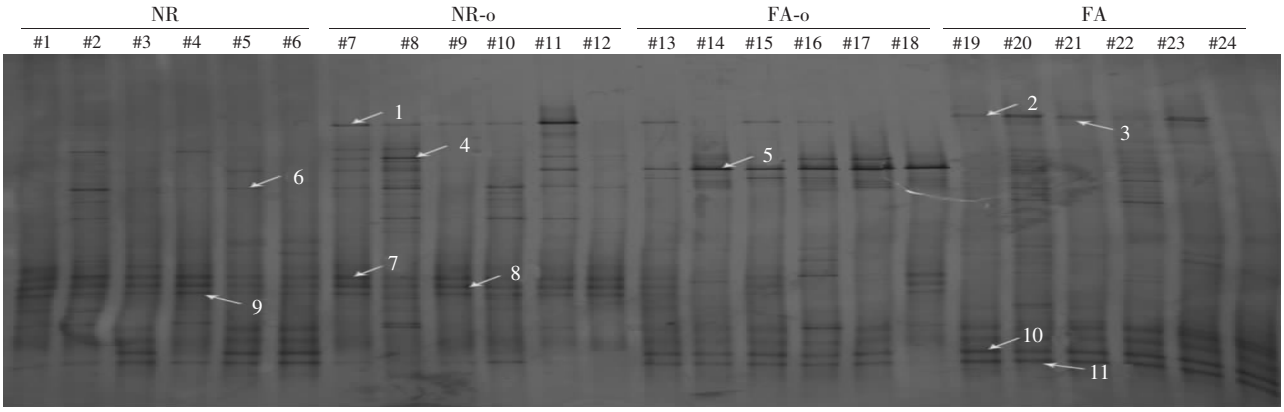
2.1 肠道菌群结果分析

2.1.1 DGGE 图谱 粪菌移植后第 3 周,供体小鼠的大部分菌群分别在两组移植小鼠肠道内得到定植,如 FA 组中条带 1、5、6、7、8、9、10、11,以及 NR 组中 12、16、17、18 和 19(图 1)。由图 2 可知,OVA 致敏前,NR 组与 FA 组相比,条带不同。NR 组的优势条带 7、8 和 9 在 FA 组中很难检测得到,而 FA 组的优势条带 2、3 和 10 在 NR 组中未检出。OVA 致敏后,条带 7、8 和 9 在 NR-o 组仍是优势条带,FA-o 组的优势条带是 10 和 11。NR-o 与 NR 组相比,增加了条带 1 和 4;而 FA-o 与 FA 组相比,优势条带增加了 5,条带 2 和 3 变得不清晰。



A:过敏小鼠粪菌移植组,其中 D1 为过敏组供体鼠;B:无过敏反应小鼠粪菌移植组,其中 D2 为无过敏反应组供体鼠;1~19:粪便菌群中主要组分定植的条带

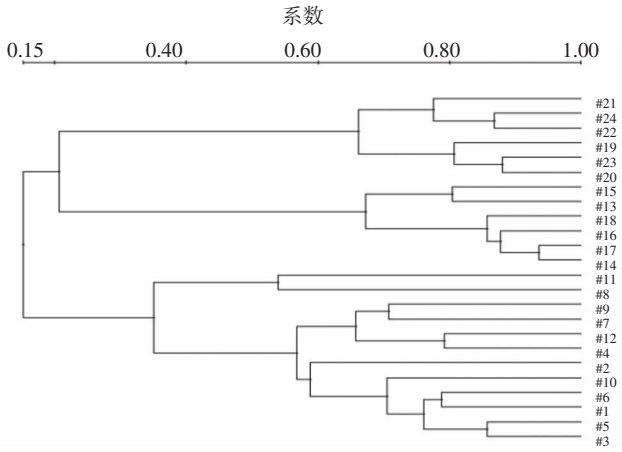
图 1 粪菌移植后第 3 周移植小鼠粪便菌群 16S rRNA V3 区 DGGE 分析



NR(#1～#6):无过敏反应小鼠粪菌移植组 OVA 处理前;NR-o(#7～#12):无过敏反应小鼠粪菌移植组 OVA 处理后;FA-o(#13～#18):过敏小鼠粪菌移植组 OVA 处理后;FA(#19～#24):过敏小鼠粪菌移植组 OVA 处理前;1～11:粪便菌群中主要组分定植的条带

图 2　各组移植小鼠粪便菌群 V6～V8 区 PCR-DGGE 指纹图谱

2.1.2　UPGMA 聚类分析　　对 4 组移植小鼠肠道菌群 V6～V8 区 DGGE 图谱的数字化信息进行 UPGMA 聚类分析得到如图 3 所示的树状图,显示明显的聚类分离现象,FA 组和 FA-o 组各成一簇,NR 组和 NR-o 组也只有条带 4 和 10 聚在不同的聚类枝上。



右侧数字对应于 DGGE 图谱中泳道编号

图 3　4 组移植小鼠粪便菌群 V6～V8 区 DGGE UPGMA 聚类分析

2.1.3　DGGE 图谱 PCA 分析　　V6～V8 区 DGGE 图谱 PCA 分析见图 4,其中 4 种颜色代表 4 个组,每一个点代表图 4 中的一个样本在空间上所处的位置。除了个别标本,4 组在空间分布上相对独立,表明四者菌群结构差异显著。其中 NR 与 NR-o 组向中间聚拢,说明这两组菌群结构相对相似。

2.1.4　DGGE 条带测序结果　　如表 1 所示,在这 11 个条带中,条带 1、4、6 和 9 代表的细菌属于厚壁菌门,8、10 和 11 代表的细菌属于变形杆菌门,其中 8 为 δ-变形杆菌,10 为 γ-变形杆菌,11 为 β-变形杆菌。条带 5 和 7 分别属于酸杆菌门和柔膜菌纲中的支原体科。条带 1、4、6、8 和 9 在 NR 组和 NR-o 组占优势,说明过敏组厚壁菌门菌和 δ-变形杆菌的量减少;条带 10、11 在 FA 组和 FA-o 组明显,说明过敏组 γ-变形杆菌和 β-变形杆菌的量增加。

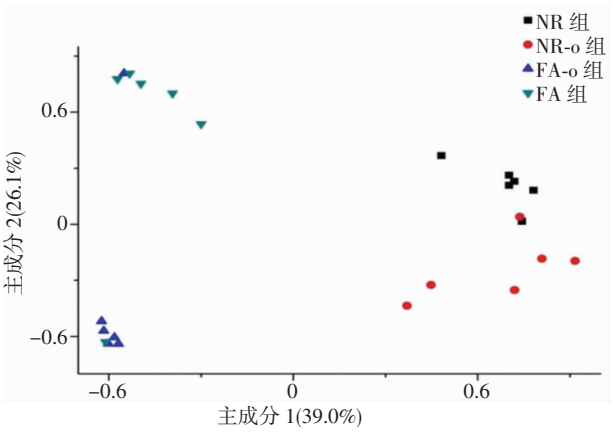


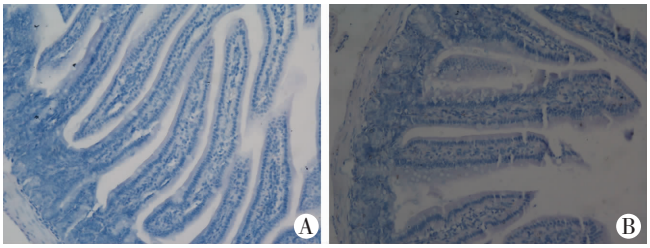
图 4　4 组移植小鼠 V6～V8 区 DGGE 图谱 PCA 分析

表 1　DGGE 图谱中条带测序结果

条带编号	长度(bp)	最相似菌属	相似度
1	388	*Lactobacillus rogosae*	93%
2	418	*Candidatus Arthromitus sp*	99%
3	418	*Candidatus Arthromitus sp*	100%
4	375	*Eubacterium contortum*	98%
5	486	*Edaphobacter aggregans*	86%
6	359	*Clostridium scindens*	94%
7	413	*Allobaculum stercoricanis*	93%
8	421	*Desulfovibrio*	96%
9	413	*Oscillibacter valericigenes*	95%
10	418	*Delftia sp*	99%
11	347	*Stenotrophomonas maltophilia*	93%

2.2 OVA 致敏后移植小鼠临床表现和肠道组织形态学改变

OVA 致敏后 FA-o 组 7 只小鼠中 6 只出现不同程度的烦躁不安或抓耳挠腮、活动减少或俯卧不动、粪便变稀;NR-o 组小鼠无明显临床表现。空肠组织 HE 染色可见,FA-o 组小鼠空肠绒毛上皮细胞出现局灶性坏死、脱落,炎性细胞浸润等较严重的炎性病理改变,NR-o 组肠绒毛断裂和炎性细胞浸润不明显,空肠组织形态结构完整,无明显病理变化(图 5)。FA-o 组与 NR-o 组小鼠空肠组织形态学改变分别与其供体小鼠(图 6)相似。



A:NR-o 组;B:FA-o 组

图 5 光镜下移植小鼠空肠组织 HE 观察 (×200)

3 讨论

3.1 无菌小鼠能较好地维持粪菌移植后的菌群结构,过敏和无过敏反应小鼠肠道菌群存在差异

粪菌移植后第 3 周的 V3 区 DGGE 图谱显示,与供体小鼠相比无论是过敏组还是无过敏反应组,条带多数一致,说明两组肠道菌群均得到了较好的定植,能代表过敏鼠和无过敏反应鼠的菌群结构。由于我们选择粪菌移植后的第 3 周检测,所以少数条带没有显示,可能与少数菌株因时间短尚未定植或尚未稳定,或其数量低于 PCR-DGGE 技术的检测限值(细菌数量大于总菌数量的 1% 才能被检出)有关。张晓婧等[11]在比较两种不同品系小鼠人源化菌群模型的肠道菌群研究中指出,两种小鼠定植的菌群条带随时间的推移而明显增加,到第 4 周趋于稳定。

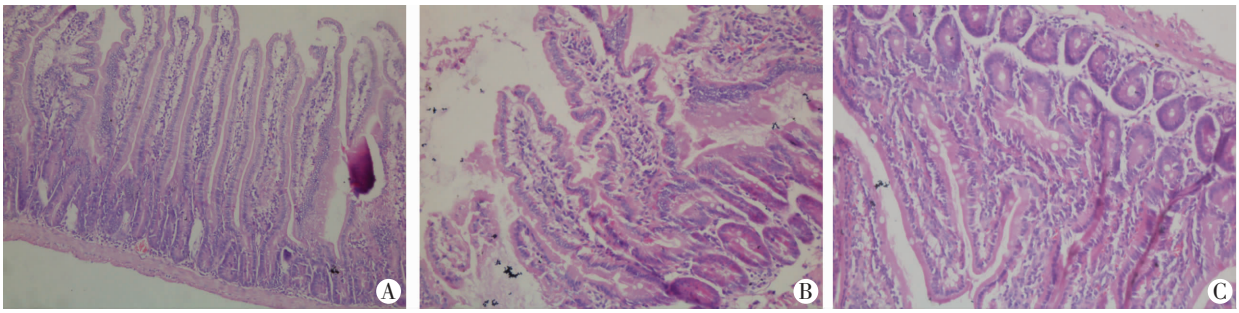
为避免单个区域检测可能存在的片面性[12-13],对菌群 16S rRNA 的 V6~V8 区进行 PCR-DGGE 分析,结果显示,移植后第 3 周,两组移植小鼠菌群结构差异显著。DGGE 图谱经 Quantity One 分析数字化转化而来的菌群聚类分析图和主成分分析图也表明,FA 组和 NR 组粪便菌群不同,说明过敏小鼠和无过敏反应小鼠的肠道菌群存在差异,这与人群的研究报道[14]一致。

本研究中,测序的 11 种菌主要为厚壁菌门和变形杆菌门。无过敏反应组中厚壁菌门的细菌占优势,过敏组中变形菌门的细菌占优势。这与 Noval-Rivas 等[15]的研究结果一致,他们将 IL-4 受体基因突变(会增加食物过敏的易感性)的小鼠和野生型对照小鼠用 OVA 致敏后比较菌群变化,发现 IL-4 受体基因突变小鼠的菌群中厚壁菌门的量减少,而 γ-变形杆菌数量增加。

3.2 肠道菌群不同使小鼠对 OVA 的敏感性不同,肠道菌群异常可能是食物过敏的始动因素,肠道菌群可传递食物过敏的敏感性

无菌 Balb/c 小鼠是具有一致基因背景的近交系小鼠[16],且无菌状态又避免了环境因素的干扰,因此它们具有完全相同的遗传背景。我们将过敏和无过敏反应小鼠的粪便分别移植给无菌小鼠后再用 OVA 致敏,移植了过敏小鼠粪菌的小鼠出现了明显的胃肠道过敏反应和较严重的肠道病理改变,而移植了无过敏反应小鼠粪菌的小鼠则无明显胃肠道反应及肠道病理改变。因肠道菌群的差异而引起移植小鼠对 OVA 致敏产生了不同的反应,说明肠道菌群不同使无菌小鼠对 OVA 的敏感性不同。因此,我们可以认为,肠道菌群的变化可能是导致食物过敏发生的始动因素。

另一方面,移植小鼠对 OVA 致敏后的表现分别与粪便供体小鼠对 OVA 致敏后的表现相似,说明小鼠对 OVA 的敏感性可以通过肠道菌群的水平移植来传递。有研究者将肥胖者的粪便移植给无菌小鼠后,能使移植小鼠的体质量增加[17-19]。Le-Roy 等[20]将非酒精性



A:正常对照小鼠;B:过敏组供体小鼠;C:无过敏反应组供体小鼠

图 6 光镜下供体小鼠空肠组织 HE 染色观察 (×200)

脂肪肝小鼠和正常小鼠的粪便移植于无菌小鼠,然后给予相同的高脂饮食,结果移植了非酒精性脂肪肝小鼠粪便的小鼠出现非酒精性脂肪肝的症状,而移植了正常小鼠粪便的小鼠未出现类似症状。说明,患这些疾病的人或动物的肠道菌群可传递该病的易感性或者导致该病在另一个体发生。

综上所述,本研究证实肠道菌群异常可能是食物过敏发生的始动因素,肠道菌群还可通过宿主之间的粪菌移植来传递食物过敏的敏感性。但尚需更大样本量的随机对照试验,甚至直接将食物过敏患者的肠道菌群引入动物做深入研究,以进一步验证肠道菌群在食物过敏发生中的始动作用,为临床上食物过敏的诊治提供更准确而有效的理论依据。

参考文献:

[1] Xu D, Gao J, Gillilland M 3rd, *et al*. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats[J]. Gastroenterology, 2014, 146(2): 484 - 496. e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.026

[2] Sepp E, Julge K, Mikelsaar M, *et al*. Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(9): 1141 - 1146. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2005.02315.x

[3] Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, *et al*. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(3): 587 - 591.

[4] Bottcher M F, Nordin E K, Sandin A, *et al*. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants[J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30(11): 1590 - 1596.

[5] Rodriguez B, Prioult G, Bibiloni R, *et al*. Germ-free status and altered caecal subdominant microbiota are associated with a high susceptibility to cow's milk allergy in mice[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2011, 76(1): 133 - 144. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.01035.x

[6] Xu M Q, Cao H L, Wang W Q, *et al*. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(1): 102 - 111. DOI:10.3748/wjg.v21.i1.102

[7] Reynolds L A, Finlay B B. A case for antibiotic perturbation of the microbiota leading to allergy development[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2013, 9(11): 1019 - 1030. DOI:10.1586/1744666X.2013.851603

[8] 白枫, 黎海芪. 黄褐毛忍冬总皂苷对卵清蛋白致敏小鼠的抗过敏作用[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(15): 1395 - 1398.

[9] Muyzer G, de-Waal E C, Uitterlinde A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695 - 700.

[10] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(9): 2083 - 2088.

[11] 张晓婧, 曾本华, 刘智伟, 等. 两种不同品系小鼠的人源菌群模型的建立与肠道菌群的比较[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(4): 376 - 380.

[12] Myers R M, Fischer S G, Maniatis T, *et al*. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13(9): 3111 - 3129.

[13] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E. Bacterial community structure and location in Stilton cheese[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3540 - 3548.

[14] Sepp E, Julge K, Vasar M, *et al*. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants[J]. Acta Paediatr, 1997, 86(9): 956 - 961.

[15] Noval-Rivas M, Burton O T, Wise P, *et al*. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(1): 201 - 212. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.10.026

[16] 赵新凤, 曾本华, 谭毅, 等. 两品系小鼠食物过敏模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 35 - 39. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.007

[17] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, *et al*. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027 - 1031. DOI: 10.1038/nature05414

[18] Turnbaugh P J, Backhed F, Fulton L, *et al*. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome[J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(4): 213 - 223. DOI:10.1016/j.chom.2008.02.015

[19] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, *et al*. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480 - 484. DOI:10.1038/nature07540

[20] Le-Roy T, Llopis M, Lepage P, *et al*. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Gut, 2013, 62(12): 1787 - 1794. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-30381

(**收稿**:2015-12-18;**修回**:2016-03-23)

(编辑 邓强庭)