

## 树鼩肠道菌群多样性与功能预测研究

杨学芳<sup>1</sup>, 李波<sup>2</sup>, 郑红<sup>3</sup>, 曹雪<sup>3</sup>, 王利梅<sup>3\*</sup>

(1. 昆明医科大学科研实验中心, 云南昆明 650500; 2. 昆明医科大学研究生院, 云南昆明 650500; 3. 昆明医科大学实验动物学部, 云南昆明 650500)

**摘要** [目的] 鉴定树鼩的肠道菌群, 分析树鼩肠道菌群多样性和丰度, 并进行菌群功能预测。[方法] 随机采集 3 份雄性树鼩粪便样品, 提取树鼩粪便中细菌基因组 DNA, 通过 PCR 扩增获得 16S rRNA V3~V4 片段, 采用高通量 Illumina PE300 平台进行测序, 利用 BIPES 以及 QIIME 分析并比较菌群结构及多样性。最后, 通过 PICRUS t 软件对肠道菌群的功能进行预测。[结果] 树鼩肠道粪便细菌有 9 门 20 纲 33 目 53 属 122 种 208 个 OTU。门水平上, 优势菌群为厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria); 属水平上, 埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 为优势菌群。PICRUS t 功能预测结果表明, 肠道细菌编码的大多数基因与代谢相关, 其次是基因信息加工、环境信息加工。COG 功能分类分析表明肠道微生物基因在“氨基酸的运输和代谢”和“碳水化合物运输与代谢”功能类群的相对丰度较高。[结论] PICRUS t 功能预测到树鼩肠道菌群主要与代谢相关, 树鼩肠道菌群是研究肠道菌群与代谢类疾病的一种良好试验材料。

**关键词** 树鼩; 肠道菌群; 16S rRNA; 菌株功能

中图分类号 S852.21 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)08-0101-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.026



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

**Study on the Diversity and Function Prediction of Intestinal Flora in *Tupaia belangeri***

**YANG Xue-fang<sup>1</sup>, LI Bo<sup>2</sup>, ZHENG Hong<sup>3</sup> et al** (1. Research Center of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500; 2. Graduate School of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500; 3. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500)

**Abstract** [Objective] To identify the intestinal flora of *Tupaia belangeri*, analyze the diversity and abundance, and predict the function of the flora. [Method] Three male feces samples of *T. belangeri* were randomly collected, bacterial genomic DNA were extracted from the feces samples of *T. belangeri* to make PCR amplification. 16S rRNA V3-V4 fragments were obtained. The high-throughput Illumina PE300 platform was used for sequencing, and the structure and diversity of the bacterial flora were analyzed by BIPES and QIIME. The function of intestinal flora was predicted through PICRUS t. [Result] There were 9 phyla, 20 phyla, 33 orders, 53 genera, 122 species, 208 OTU in the intestinal fecal flora of *T. belangeri*. Firmicutes and Proteobacteria dominated at the level of phylum. At the level of genus, *Escherichia*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* were the dominant flora. The functional prediction results by PICRUS t showed that most genes encoded by gut bacteria were associated with metabolic "metabolism", followed by genetic information processing "based information processing", environmental information processing "environmental information processing". COG gene function classification statistics showed that the relative abundance of intestinal flora in "amino acid transport and metabolism" and "carbohydrate transport and metabolism" were higher. [Conclusion] The function of PICRUS t predicted that the intestinal flora of *T. belangeri* was mainly related with the metabolism, and the intestinal flora of *T. belangeri* was a good experimental material for studying intestinal flora and metabolic diseases.

**Key words** *Tupaia belangeri*; Intestinal flora; 16S rRNA; Function of strain

树鼩隶属攀缘目 (Scandentia) 树鼩科 (Tupaiaidae), 是灵长类动物的近亲<sup>[1]</sup>。研究表明, 树鼩在进化关系、解剖结构、新陈代谢等方面比大鼠、小鼠更接近于人类<sup>[2]</sup>, 常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用, 在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学等方面对树鼩已有广泛和深入的研究<sup>[3]</sup>。

肠道是人体最大的消化和排泄器官, 存在数以亿计的微生物与宿主共生, 肠道菌群是宿主不可或缺的一部分。正常肠道菌群在宿主营养代谢、药物代谢、免疫调节等方面起着重要作用<sup>[4]</sup>。肠道菌群与宿主免疫系统的相互作用是彼此多方向的、交互式的化学交流传递通道<sup>[5]</sup>。肠道菌群产生的胆汁酸、胆碱、短链脂肪酸是宿主健康所必需的物质<sup>[6]</sup>。机体的正常活动以及消化食物、机体免疫功能及抗病能力、排便功能等都离不开菌群的参与, 并需要它们发挥应有的作用, 正常菌群的失调可能导致诸多疾病<sup>[7]</sup>。

以前采用传统的分离与培养、构建克隆文库、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)、荧光原位杂交 (FISH) 等方法揭示肠道微生物的多样性<sup>[8]</sup>, 但这些方法有很大的局限性。高通量测序技术作为新一代的测序方法, 具有较高的准确性和灵敏度, 极大地提高了对样品中微生物多样性分析的深度和广度, 加深人们对肠道微生物菌群的结构和功能的了解。基于细菌 16S rRNA 的高通量基因测序分析已成为研究肠道菌群与疾病间关系的重要工具。笔者通过高通量测序细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区测序, 鉴定树鼩的肠道菌群, 对树鼩肠道菌群多样性、丰度和菌群功能代谢进行了预测。

**1 材料与方法**

**1.1 试验动物** 3 只健康成年雄性树鼩, 体重 140~160 g, 来源于昆明医科大学实验动物学部 [SCXK(滇) K2013-0002], 饲养于昆明医科大学普通级实验室, 单笼饲养, 饮用城市供应的自来水, 每日定时饲喂全价颗粒饲料, 动物饲养温度 22~25 °C, 湿度 40%~60%, 明暗交替照明 12 h。

**1.2 方法**

**1.2.1 树鼩粪便的收集。** 抓取并保定树鼩, 多数树鼩在抓取

**基金项目** 云南省教育厅科学研究基金项目 (2018JS89)。**作者简介** 杨学芳 (1987—), 女, 云南陇川人, 助理实验师, 硕士, 从事分子生物学研究。\* 通信作者, 实验师, 硕士, 从事微生物与实验动物研究。**收稿日期** 2018-11-12; **修回日期** 2018-12-07

过程中因紧张而主动排出粪便,对无粪便者轻轻按摩其腹部,使其排便,每只树鼩采集豌豆粒大小的新鲜粪便标本。

**1.2.2 粪便样品的混悬与稀释。**将粪便样品混悬到无菌生理盐水中后,以10倍递增梯度进行稀释。

**1.2.3 DNA的提取与检测。**使用粪便基因组提取试剂盒 E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.), 从树鼩粪便样品中提取细菌DNA,并利用1%琼脂糖凝胶电泳进行定性检测。

**1.2.4 PCR扩增。**按照指定测序区域,扩增的目标区域为16S rRNA基因的V3和V4区域,引物名称为338F (5'-ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3'),合成带有barcode的特异引物。

**1.2.5 荧光定量。**参照电泳初步定量结果,将PCR产物用 Quanti Fluor<sup>™</sup>-ST 蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,此后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。

**1.2.6 Miseq文库构建和Miseq测序。**文库的制备和上机测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

**1.3 生物信息学分析** Miseq测序得到的PE reads首先根据overlap关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,按照97%相似性对非重复序列进行OTU (operational taxonomic unit)聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到OTU的代表序列,将所有优化序列map至OTU代表序列,选出与OTU代表序列相似性在97%以上的序列,生成OTU表格。基于Silva数据库,应用RDP classifier 2.2对每个OTU的最长16S rRNA序列片段进行相似性比对,统计每个样本中细菌在门、纲、目、科、属、种各分类水平上的构成<sup>[9]</sup>。在上述分析的基础上,对树鼩肠道菌群代谢功能预测等进行分析。

PICRUS t对OTU丰度表进行标准化,去除16S marker gene在物种基因组中的拷贝数目的影响;然后,通过每个OTU对应的green gene id,比对到COG和KEGG库,获得OTU对应的COG家族信息和KO信息;计算各COG的丰度和KO丰度。根据比对到COG库的COG编号,可以从基因的进化谱系(egg NOG)数据库中解析到各个COG的描述信息及其功能信息,从而得到功能丰度谱;根据比对到KEGG数据库的信息,获得KO、Pathway、EC信息,并根据OTU丰度计算各功能类别的丰度。

## 2 结果与分析

**2.1 测序结果物种注释与评估** 从3只成年雄性树鼩的粪便样品中共得到高质量质控序列58 328条,序列长度主要分布在441~460 bp,其他少量分布在421~440 bp。

**2.1.1 树鼩肠道菌群 $\alpha$ -多样性指数分析。**从图1可以看出,3个树鼩样品的 $\alpha$ -多样性相差不大。

**2.1.2 OTUs稀释曲线。**从图2可以看出,随着测序深度的逐渐增加,OTUs稀释曲线趋于平坦,说明更多的测序数量对于OTU的边际贡献较小,测序的数据量较为合理。3个样品的稀释曲线趋于平缓(图2),说明样品测序量是足够的,足以覆盖所有微生物的组成。

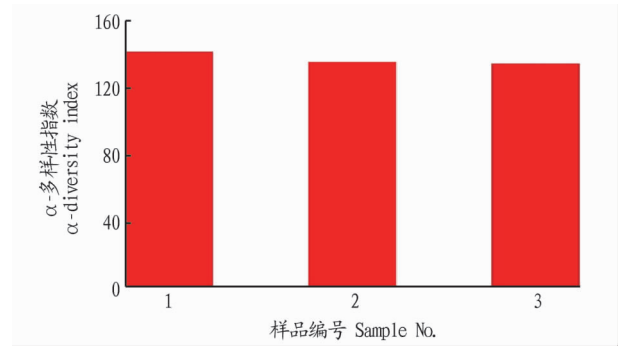


图1 树鼩肠道菌群 $\alpha$ -多样性指数分析

Fig.1  $\alpha$ -diversity index analysis of the intestinal flora of *T. belangeri*

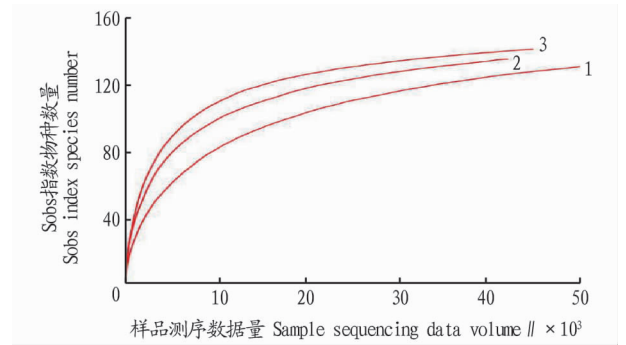


图2 操作单元(OTUs)稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves for OTUs

**2.2 树鼩肠道菌群的物种组成分析** 在97%的相似水平上进行OTU序列分类,共聚成208个可操作分类单元(OUT)。肠道细菌隶属9门20纲33目53属122种。这9个门分别为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、柔膜菌门(Tenericutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、螺旋体菌门(Saccharibacteria)。从图3可以看出,门水平上优势菌群为变形菌门(Proteobacteria,占61.22%)和厚壁菌门(Firmicutes,占36.65%)。从图4可以看出,属水平上埃希氏杆菌属(*Escherichia*)占59.72%,乳酸菌属(*Lactobacillus*)占26.86%,肠球菌属(*Enterococcus*)占6.36%,这3个属为优势菌群。

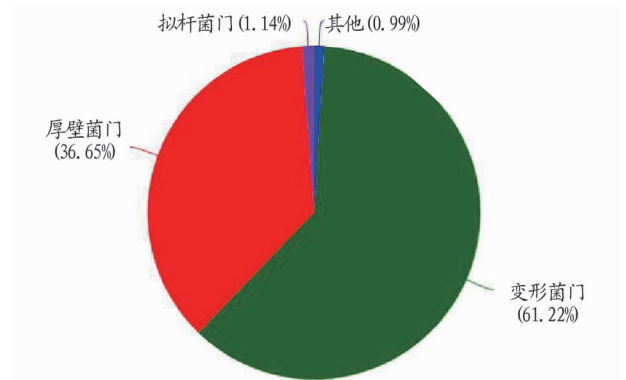


图3 门水平上树鼩肠道细菌优势菌群分析

Fig.3 The dominant flora analysis of intestinal flora of *T. belangeri* at phylum level

**2.3 PICRUS t 软件预测** 肠道细菌菌群功能基因和代谢途径分布表明,KEGG 代谢通路中树鼩肠道细菌编码的大多数基因与代谢相关(表 1)。COG 功能分类统计结果表明,微生物基因在“氨基酸的运输和代谢”和“碳水化合物运输与代谢”功能类群的相对丰度较高(图 5)。

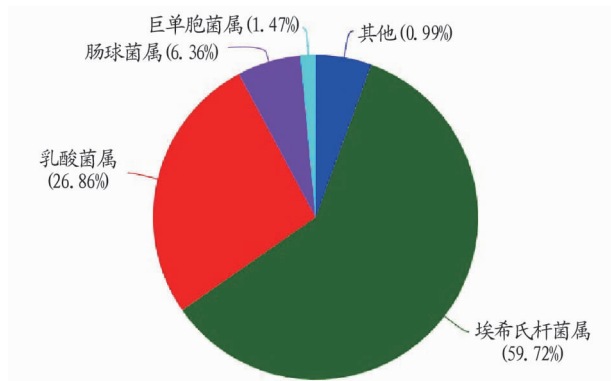


图 4 属水平上树鼩肠道细菌优势菌群分析

Fig.4 The dominant flora analysis of intestinal flora of *T. belangeri* at genus level

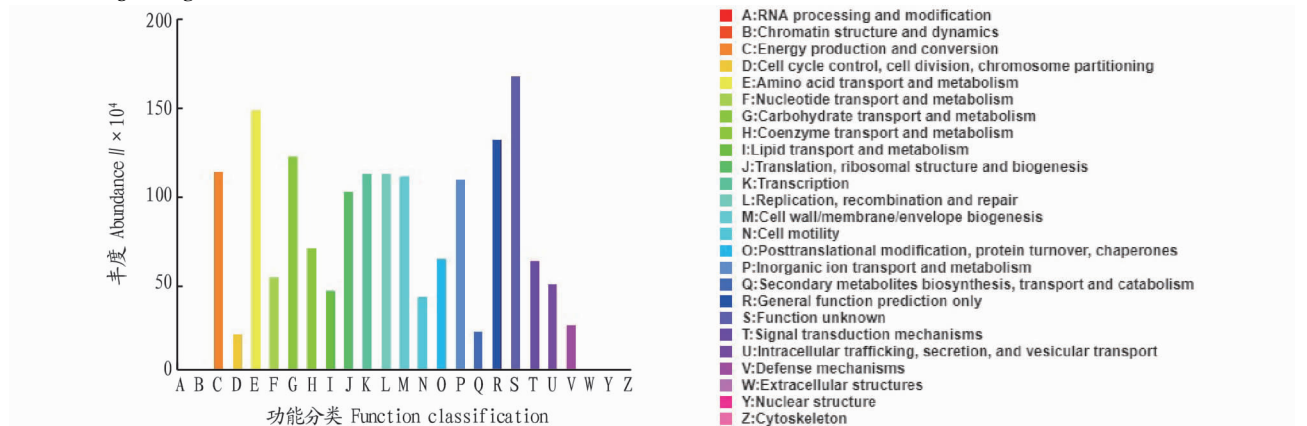


图 5 COG 功能分类统计

Fig.5 The statistics of COG function classification

(大鼠、小鼠)更接近于人类。研究表明,小鼠肠道菌群在门水平上主要为放线菌门、拟杆菌门、脱铁杆菌门(Deferritobacteria)、广古菌门(Euryarchaeota)、壁厚菌门、变形菌门、柔壁菌门、疣微菌门 9 个门<sup>[10]</sup>。大鼠粪便菌群主要为壁厚菌门、拟杆菌门、蓝藻菌门、软壁菌门、壁厚菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门<sup>[11]</sup>。人体肠道中的菌群主要有拟杆菌门、壁厚菌门、变形菌门,这 3 门细菌占总细菌量的 80% 以上,其他细菌主要有蓝藻菌门、拟杆菌门、放线菌门、梭杆菌门、疣微菌门、螺旋体菌门。在健康人类和树鼩肠道菌群被鉴定到的螺旋体菌门,在大小鼠肠道菌群中未被发现。

使用 PICRUS t 软件计算方法<sup>[12-13]</sup> 预测微生物 16S rRNA 文库,对其功能基因和类群进行了探索,进而将菌群结构与宿主代谢相联系。研究表明,PICRUS t 软件对肠道菌群功能基因预测的准确度为 85%~90%<sup>[14]</sup>。该软件在 KEGG 通路水平输出预测的代谢功能丰度,得到的通路谱用于下游比较分析。通过与 KEGG 的比对搜索,笔者发现肠道细菌编码的大多数基因与代谢相关,其次是基因信息加工、环境信息加工。

表 1 KEGG 代谢通路统计

Table 1 Metabolism pathway statistics of KEGG

编号 Number	功能 Function	样本丰度 Abundance of samples
1	代谢	8 959 629
2	遗传信息处理	3 632 604
3	环境信息处理	3 379 953
4	细胞过程	763 328
5	人类疾病	237 612
6	有机体系	95 097
7	无	34 235

### 3 讨论

笔者通过 16S rRNA 高通量测序分析树鼩肠道菌群,共得到 9 门 20 纲 33 目 53 属 122 种 208 个 OUT。该试验覆盖率为 0.99,说明树鼩大肠细菌 99.9% 多样性情况得到体现。每个样本的稀释曲线都趋于平缓,表明该试验的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物。树鼩肠道细菌门水平上丰度较高的是变形菌门和壁厚菌门。其他菌群为放线菌门、拟杆菌门、疣微菌门、柔壁菌门、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、蓝细菌门、螺旋体菌门。在门水平上,树鼩肠道菌群比啮齿类动物

COG 功能分类统计表明,肠道微生物基因在“氨基酸的运输和代谢”和“碳水化合物运输与代谢”功能类群的相对丰度较高,说明这些肠道细菌的主要功能是维持正常状态下细胞的基本生理活动。功能基因主要与代谢相关,推测树鼩肠道菌群可能是研究代谢类相关疾病的良好动物模型。

肠道菌群与宿主的营养、疾病的发生发展等密切相关<sup>[15]</sup>。宿主为肠道菌群的生长繁殖提供必要条件,菌群在肠道内代谢活动产生物质作用于宿主,影响宿主整个生命过程。肠道微生物在宿主体内具有抵御病原菌侵袭、促进免疫器官成熟、激活免疫系统发挥作用等功能,例如微生物可以与肠道黏膜上皮细胞结合,产生一些抑菌物质,发动非特异性防御功能<sup>[16]</sup>。壁厚菌门在肠道中能够帮助多糖发酵,壁厚菌门和拟杆菌门可协助宿主从本身无法消化的食物成分中提取更多的能量,维持动物肠道的健康<sup>[17]</sup>。因而,研究肠道菌群多样性及菌株对宿主的功能对于探讨人类疾病的发生机制具有重要意义。

(下转第 113 页)

性低温胁迫 3、5 ℃,血清生化指标均分别于 24、48 h 恢复至胁迫前水平,急性胁迫 5 ℃(Ⅱ)组响应胁迫持续时间长于 3 ℃胁迫组(Ⅰ);急性胁迫 7 ℃,尤其胁迫 24 h 后条纹锯鲷血清各项生化指标会发生显著变化,预示此胁迫强度已对肝脏、心肌、肾脏等机体内脏功能造成不可逆的损伤。因此,在条纹锯鲷实际养殖生产及低温驯化期间,应尽量降低胁迫强度和缩短胁迫时间。

### 参考文献

- [1] 雷霖霖,卢继武.美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景[J].海洋水产研究,2007,28(5):110-115.
- [2] 刘瑞棠.美洲黑石斑鱼海水网箱养殖技术[J].海洋与渔业,2012(4):59.
- [3] 郑国洪.美洲黑石斑与对虾、花蛤混养试验[J].海洋与渔业,2012(1):62-63.
- [4] 谢书秋.条纹锯鲷海水网箱养殖技术[J].渔业信息与战略,2014,29(4):285-288.
- [5] 毕浩,侯文杰.陆基循环水养殖美洲黑石斑技术[J].水产科技情报,2017,44(3):128-130.
- [6] 潘元潮,杨心德,陆波.美洲黑石斑大规模鱼种培育技术[J].水产养殖,2013(2):31-32.
- [7] 张廷廷,陈超,邵彦翔,等.美洲黑石斑鱼(*Centropomus striata*)消化系统胚后发育的组织学观察[J].渔业科学进展,2017,38(3):78-85.
- [8] 贾瑞锦,王鲁,赵从明,等.条纹锯鲷鱼胚胎发育及卵黄囊仔鱼形态变化的观察[J].渔业科学进展,2012,33(4):11-17.
- [9] 韩龙江,刘清华,官曙光,等.条纹锯鲷精液超低温冷冻保存研究[J].水产学报,2014,38(10):1714-1721.
- [10] 陈超,贾瑞锦,李炎璐,等.条纹锯鲷精子超微结构及其入卵过程的电镜观察[J].渔业科学进展,2014,35(5):97-103.
- [11] 林星.条纹锯鲷幼鱼配合饲料适宜的蛋白质、脂类含量及能蛋比[J].福建农林大学学报(自然科学版),2011,40(4):401-406.
- [12] 林星.条纹锯鲷肌肉营养成分分析与品质评价[J].养殖与饲料,2009(9):43-46.
- [13] 党冉,竺俊全,邱新志.美洲黑石斑鱼含肉率及肌肉营养成分分析[J].

海洋学研究,2010,28(2):60-66.

- [14] 郑磊,马振宇,吴斌,等.美洲黑石斑鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清部分特性[J].上海海洋大学学报,2011,20(4):494-498.
- [15] 陈超,施兆鸿,薛宝贵,等.低温胁迫对七带石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响[J].水产学报,2012,36(8):1249-1255.
- [16] 朱文彬,刘浩亮,陈作志,等.低温胁迫对马来西亚红罗非鱼血清生化指标的影响[J].水产学杂志,2013,26(5):16-20.
- [17] 冀德伟,李明月,王天柱,等.不同低温胁迫时间对大黄鱼血清生化指标的影响[J].水产科学,2009,28(1):1-4.
- [18] 宁军号,秦宇博,胡伦超,等.水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响[J].大连海洋大学学报,2017,32(3):294-301.
- [19] 何福林,向建国,李常健,等.水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究[J].水生生物学报,2007,31(3):363-369.
- [20] 臧坤,徐永江,柳学周,等.两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析[J].渔业科学进展,2013,34(5):36-42.
- [21] PANSEERAT S, PERRIN A, KAUSHIK S. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The journal of nutrition, 2002, 132(2): 137-141.
- [22] 邵同先,张苏亚,康健,等.低温环境对家兔血清蛋白、血糖和钙含量的影响[J].环境与健康杂志,2002,19(5):379-380.
- [23] 刘波,王美姝,谢骏,等.低温胁迫对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响[J].生态学报,2011,31(17):4866-4873.
- [24] 常玉梅,匡友谊,曹鼎臣,等.低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响[J].水产学报,2006,30(5):701-706.
- [25] 谢明娟.急性温度胁迫对银鲳幼鱼各项生化指标的影响[D].上海:上海海洋大学,2016.
- [26] 尾崎久雄.鱼类血液与循环生理[M].上海:上海科学技术出版社,1982:151-154.
- [27] SANO T. Haematological studies of the culture fishes in Japan [J]. Journal of Tokyo University of Fisheries, 1962, 48: 105-109.
- [28] HOLMES W N, DONALDSON E M. The body compartments and the distribution of electrolytes [M] // HOAR W S, RANDALL D J. Fish physiology. New York: Academic Press, 1969: 1-89.
- [29] LEBRETON G T O, BEAMISH F W H. The influence of salinity on ionic concentrations and osmolarity of blood serum in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* [J]. Environmental biology of fishes, 1998, 52: 477-482.

(上接第 103 页)

### 参考文献

- [1] XIAO J, LIU R, CHEN C S. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model [J]. Zool Res, 2017, 38(3): 127-137.
- [2] LI R F, YUAN B, XIA X S, et al. Tree shrew as a new animal model to study the pathogenesis of avian influenza (H9N2) virus infection [J]. Emerging microbes & infections, 2018, 7(166): 1-11.
- [3] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等.树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J].实验动物科学,2013,30(2):59-64.
- [4] 刘昌孝.肠道菌群与健康、疾病和药物作用的影响[J].中国抗生素杂志,2018,43(1):1-12.
- [5] BEYO GLU D, SMITH R L, IDLE J R. Dog bites man or man bites dog? The enigma of the amino acid conjugations [J]. Biochem pharmacol, 2012, 83(10): 1331-1339.
- [6] UMESAKI Y, SETOYAMA H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model [J]. Microbes Infect, 2000, 2(11): 1343-1351.
- [7] 沈男,刘毅,盖中涛.肠道菌群与肠道疾病关系的研究进展[J].基础医学与临床,2018,38(7):1034-1037.
- [8] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. PANS, 2011, 108(S1): 4516-4522.
- [9] QUSAT C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene

dataset project: Improved data processing and web-based tools [J]. Nucl Acids Res, 2013, 41: 590-596.

- [10] 杨俊花,赵志辉,郭文博,等.应用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2017, 29(1): 158-167.
- [11] 张芹,周中凯,任晓冲,等.高通量测序技术研究糖尿病大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构差异 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 232-238.
- [12] MORGAN X C, TICKLE T L, SOKOL H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment [J]. Genome Biol, 2012, 13(9): 1-18.
- [13] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. Nature biotechnology, 2013, 31(9): 814-821.
- [14] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity [J]. Nature, 2006, 444: 1022-1023.
- [15] LEY R E, PETERSON D A, GORDON J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124(4): 837-848.
- [16] HOOPER L V, MACPHERSON A J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(3): 159-169.
- [17] RUIZ L, MARGOLLES A, SÁNCHEZ B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [J]. Frontiers in microbiology, 2013, 4: 396.