猴头菌粉对结肠炎小鼠肠道菌群的影响

李 望[1]，耿 燕[*1]，任怡琳[1]，史劲松[1]，许正宏[2]
（1. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：探究猴头菌粉对小鼠结肠炎的治疗效果及肠道菌群的影响。C57BL/6 雄性小鼠随机分为正常组、DSS 模型组、猴头菌粉低剂量组和猴头菌粉高剂量组，采用质量分数 2%葡聚糖硫酸钠（Dextran Sulfate Sodium，DSS）诱导 C57BL/6 小鼠建立结肠炎动物模型，低剂量组（250 mg/kg/d）和高剂量组（500 mg/kg/d）小鼠同时给予猴头菌粉和质量分数 2% DSS，7 d 后进行疾病活动指数评分和病理组织切片观察，并利用变性梯度凝胶电泳技术分析小鼠肠道微生物的变化。结果：猴头菌粉在一定剂量（250 mg/kg/d 和 500 mg/kg/d）下均表现出良好的抗结肠炎效果，其摄入能显著增加结肠炎小鼠体重、降低疾病活动指数评分并改善结肠组织病理形态；抑制由 DSS 造成的肠道菌群紊乱，增加了 *Akkermansia muciniphila* 和 *Barnesiella intestinihominis* 的比例。研究结果提示猴头菌粉可能通过调节肠道微生物比例，改善小鼠结肠炎。

关键词：猴头菌；结肠炎；肠道菌群；变形梯度凝胶电泳
中图分类号：R 285　**文章编号**：1673-1689(2019)09-0097-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.014

Effect of *Hericium erinaceus* on Gut Microbiota in Mice with Colitis

LI Wang[1]，*GENG Yan*[*1]，*REN Yilin*[1]，*SHI Jinsong*[1]，*XU Zhenghong*[2]
（1. School of Pharmaceutical Science，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The study aimed to investigate the effect of *Hericium erinaceus* （HE） on intestinal microbiota of mice with colitis. C57BL/6 male mice were randomly divided into four groups （normal，model，HE low and high dose groups）. Mice were induced by 2% dextran sulfate sodium （DSS） to establish the mouse model of ulcerative colitis. Meanwhile，mice of high and low dose groups administrated dry powder of HE （250 mg/kg/d and 500 mg/kg/d） and drunk 2% DSS. After 7 days，disease activity index was scored and the shift of gut microbiota was examined by PCR-DGGE technology. The results showed that HE possesses anti-colitis activity. The administration of HE could significantly increase the body weight，decrease the score of disease activity index，and improve the histological change induced by DSS. Furthermore，HE restored the disordered gut microbiota caused by DSS and increased the proportions of *Akkermansia muciniphila* and *Barnesiella intestinihominis*. Therefore，the results demonstrated that HE possesses anti-colitis activity，partially through modulating gut microbiota.

Keywords：*Hericium erinaceus*，colitis，gut microbiota，PCR-DGGE

收稿日期：2017-02-07
基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（31401931）；中国博士后科学基金面上资助项目（2018M640455）；江苏省博士后科研资助项目（2018K029B）。
* **通信作者**：耿 燕（1984—），女，博士，副教授，主要从事天然药物筛选及分子机制研究。E-mail：gengyanjnu@163.com
引用本文：李望，耿燕 ，任怡琳，等. 猴头菌粉对结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（09）：97-102.

研究证明,肠道微生物的群落组成和多样性改变会影响肠道内环境的稳态,促进结肠炎的发展[1-4]。猴头菌(*Hericium erinaceus*)是著名的药食用真菌,具有良好的抗氧化活性[5],并对结肠炎的治疗[6]、胃黏膜的保护[7]等具有重要作用。鉴于猴头菌对消化系统的保护作用,作者初步考察猴头菌粉对 DSS 诱导小鼠结肠炎的治疗效果,并利用变性梯度凝胶电泳技术从肠道微生物的角度探讨猴头菌粉对结肠炎小鼠的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠:6 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 实验器材

1.2.1 材料与试剂 猴头菌粉:江苏省神华制药有限公司提供;粪便隐血试剂盒:南京森贝伽公司产品;H&E 染色试剂盒:上海碧云天公司产品;蛋白酶 K:美国 Thermo 公司产品;PCR 产物纯化回收试剂盒:上海捷瑞公司产品;DNA 测序和引物合成服务:上海生工提供。

1.2.2 仪器 倒置显微镜:日本 Nikon 公司产品;低温高速离心机:德国 Epperdorf 公司产品;振荡恒温金属浴:上海一恒公司产品;核酸浓度测定仪:美国 Thermo 公司产品;PCR 仪、凝胶成像系统和变性梯度凝胶电泳仪:美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立和给药方法 参照文献方法[8]建立 DSS 小鼠结肠炎模型。C57BL/6 雄性小鼠于实验环境适应一周后随机分为 4 组,每组 8 只。正常对照组(NC):饮食饮水为正常饲养条件;DSS 模型组(MC):2% DSS 溶液替代饮用水,饮食条件不变;HE 低剂量组(HEL):小鼠自由摄取 2% DSS 溶液,同时每天灌胃猴头菌粉溶液,剂量为 250 mg/kg;HE 高剂量治疗组(HEH):饮用 DSS 溶液,同时每天灌胃猴头菌粉溶液,剂量为 500 mg/kg。具体分组和实验步骤如图 1 所示。

1.3.2 小鼠病活动指数评分(Disease activity index, DAI) 记录各组小鼠的体重并监测小鼠粪便形状和隐血情况,参照文献[9]进行 DAI 评分。小鼠同时接受猴头菌粉和 2% DSS 小鼠作用 7 d 后牺牲,分离结肠组织,记录结肠长度并收集肠道内容物。

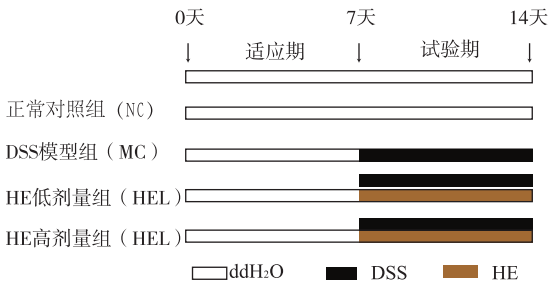


图 1 猴头菌粉对 DSS 诱导小鼠结肠炎的治疗方法

Fig. 1 Procedure of DSS –induced colitis in mice administrated with Hericium erinaceus

1.3.3 小鼠结肠病理检查 解剖取新鲜的结肠组织固定于福尔马林溶液,制作病理组织切片,在显微镜下观察结肠组织炎症细胞浸润、腺体和隐窝结构等情况。

1.3.4 结肠内微生物总 DNA 的提取 样品中加入 500 μL 的裂解缓冲液(50 nmol/L Tris-HCl,100 nmol/L EDTA,100 nmol/L NaCl,1 g/dL SDS)和 2.5 μL 蛋白酶 K,55 ℃恒温振荡器震荡 3 h 后,与 500 μL 水饱和酚—三氯甲烷—异戊醇(体积比为 25:24:1)混匀离心取上清,两倍体积乙醇与上清混匀后离心取沉淀 DNA,用体积分数 70%乙醇洗涤 DNA,挥发干乙醇后加入 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)溶解 DNA,测定 DNA 浓度。

1.3.5 16S rDNA V3 区 PCR 扩增 将 16S rDNA V3 区基因采用通用引物进行扩增,引物序列如下:上游引物 5′-CGC CCG CCG CGC GCC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3′;下游引物 5′-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3′。Touch-down PCR 程序:94 ℃,3 min;94 ℃,1 min;65 ℃,1 min;72 ℃,1 min;从第二次循环开始,每个循环退火温度降低 1 ℃,退火温度达到 55 ℃后,72 ℃延伸 6 min;4 ℃,∞。Touch-down PCR 产物进行 Recondition PCR,程序为:94 ℃,3 min,94 ℃,1 min;55 ℃,1 min;72 ℃,1 min,6 次循环后,72 ℃延伸 6 min;4 ℃,∞。

1.3.6 变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE) 采用变形梯度凝胶电泳仪进行 DGGE,凝胶浓度为 30~50 g/dL,60 ℃下 200 V 电泳 4 h。SYBR Green Ⅰ染料对凝胶进行染色,凝胶成像系统拍照,采用 Quantity one 软件分析图谱,构建 PCR-DGGE 的聚类分析图。

1.3.7 DGGE 条带分析 切下含有目的 DNA 片段

的凝胶,加入 20 μL 无菌 ddH_2O 于灭菌离心管中捣碎,4 ℃过夜。取进行方法 1.2.5 中的 Touch-down PCR,其中上游引物 5′-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3′;下游引物 5′-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3′。PCR 产物进行胶回收,连接,转化到 PMD19-T 感受态细胞中,在添加氨苄的平板上随机挑取转化子接入含有氨苄的 LB 摇瓶培养基中,37 ℃培养 12~16 h 后进行菌落 PCR 验证,通用引物序列为 M13-47 和 RV-M,PCR 程序同上述 Recondition PCR 程序方法,选取含有目的基因的转化子菌液,送样由上海生工进行测序,序列在 Gen Bank 数据库中进行同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 猴头菌粉对小鼠结肠炎的治疗效果

2.1.1 猴头菌粉对小鼠体质量的影响 观察小鼠的活动状况可以发现,正常小鼠饮食饮水及活动均正常,无便血;模型组小鼠出现便血、弓背、活动减少等现象。检测小鼠实验期间的体重变化,由图 2 所示,正常组小鼠的体质量变化不大,而模型组小鼠的体重在 0~3 d 时波动不大,但从第 4 天开始,体质量变化呈现急剧下降的趋势;与正常组相比,猴头菌粉低、高剂量两组的小鼠体质量整体也呈下降趋势,但是变化趋势较 DSS 模型组有所减缓。

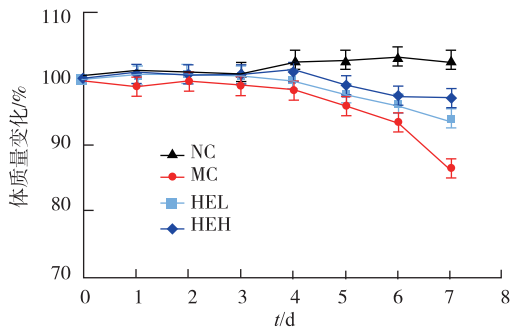
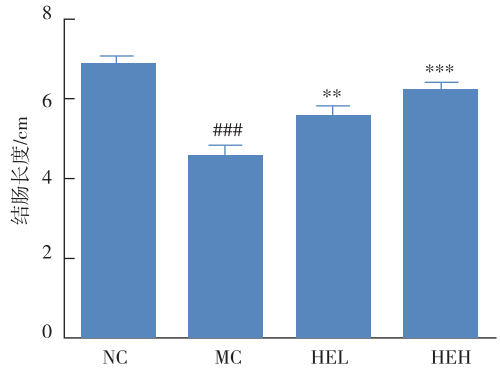


图 2 猴头菌粉对 DSS 诱导的结肠炎小鼠体质量的影响

Fig. 2 Effect of Hericium erinaceus on body weight of mice with colitis

2.1.2 猴头菌粉对小鼠结肠长度的影响 如图 3 所示,正常小鼠的结肠长度在 6.7~7.3 cm,当小鼠接受 DSS 刺激后,引发溃疡性结肠炎,其结肠长度为 4.1~4.8 cm,较正常组明显缩短(###$p < 0.001$);接受猴头菌粉低剂量治疗的小鼠,其结肠长度增长至 5.5~5.9 cm,猴头菌粉高剂量组小鼠的结肠长度为 6.1~6.4cm,两组的结肠长度较模型组均明显增加(**$p < 0.001$,***$p < 0.001$),且高剂量猴头菌粉治疗效果更佳。

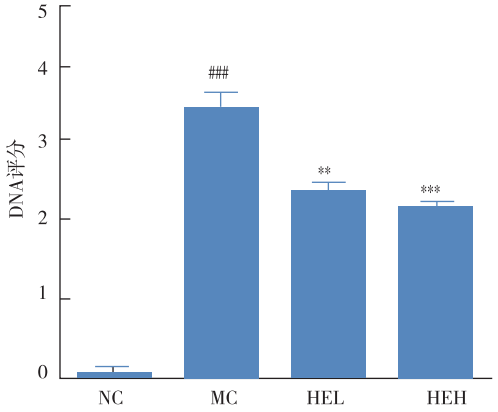


与正常组相比,###$p < 0.001$;与模型组相比,**$p < 0.01$,***$p < 0.001$

图 3 猴头对 DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠长度的影响

Fig. 3 Effect of Hericium erinaceus on colon length of mice with DSS-induced colitis

2.1.3 猴头菌粉对小鼠 DAI 的影响 如图 4 所示,正常组小鼠体质量波动不大,偶有稀便,而模型组小鼠的体质量急剧下降,粪便出现肉眼可见的含血情况,因此其 DAI 评分极显著增加(###$p < 0.001$);与模型组小鼠相比,HEL 和 HEH 两组小鼠的粪便含血情况得到明显改善,且体质量下降趋势得到减缓,两组的 DAI 评分明显降低(**$p < 0.001$,***$p < 0.001$)。这说明,猴头能改善 DSS 诱导小鼠结肠炎的临床症状,对结肠炎有良好的治疗效果。



与正常组相比,###$p < 0.001$;与模型组相比,**$p < 0.01$,***$p < 0.001$

图 4 猴头菌粉对 DSS 诱导的结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

Fig. 4 Effect of Hericium erinaceus on DAI score of mice with DSS-induced colitis

2.1.4 小鼠结肠组织病理切片观察　由病理切片图 5 可以看出,正常组小鼠基本没有出现炎性细胞浸润的情况,黏膜没有糜烂且无溃疡形成,隐窝和腺体结构保持完整且排列规则;由于 DSS 的刺激作用,在模型组小鼠的结肠组织中,隐窝和腺体的正常结构被破坏,观察发现大量炎性细胞浸润到黏膜层;与模型组相比,HEL 和 HEH 两组的黏膜损伤程度小,腺体结构破坏较轻,炎性细胞的数量和浸润深度都显著减少。这表明,猴头菌粉可以修复 DSS 诱导的结肠黏膜损伤,减轻肠道炎症反应,保护结肠组织。

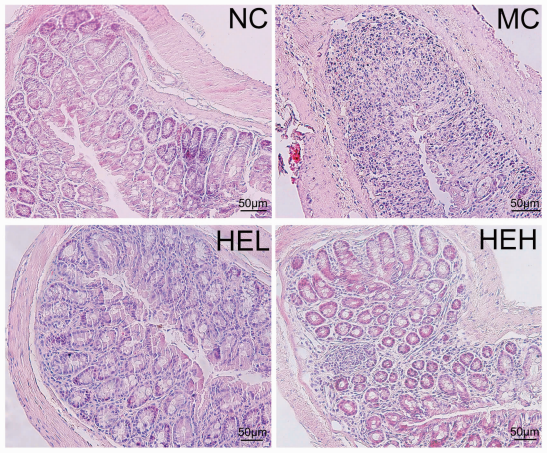


图 5　小鼠结肠组织病理切片(H&E 染色,×200)

Fig. 5　Histopathological sections of colon (H&E staining, ×200)

2.2　猴头菌粉对小鼠肠道菌群的影响

2.2.1 肠道微生物 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 图谱分析　PCR-DGGE 技术是分析复杂微生物组成的简便手段,在 DGGE 图谱中,每一个条带代表一类细菌,条带的数量及其灰度分别代表细菌的多样性和相对丰度[10]。由图 6 可以看出,DGGE 技术可以有效反应肠道菌群的多样性,与正常组相比,模型组条带数量没有明显减少,说明肠道菌群的多样性没有明显变化,但是条带的整体灰度明显降低,说明其肠道菌群的丰度减少。模型组中条带 A 的灰度明显增加,条带 B 和 C 的灰度减少,说明在结肠炎小鼠的肠道菌群中,条带 A 代表的微生物相对丰度增加,条带 B 和 C 代表的微生物相对丰度减少,而与模型组相比,HEL 和 HEH 两组中条带 A 的灰度降低,条带 B 和 C 的灰度整体呈增加趋势,猴头菌粉能调节由结肠炎引起的肠道菌群失调,维持肠道内环境的稳态。

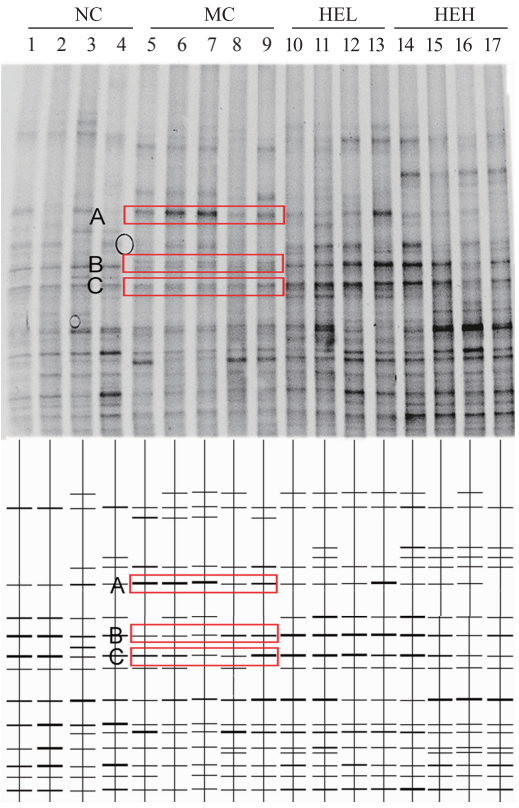
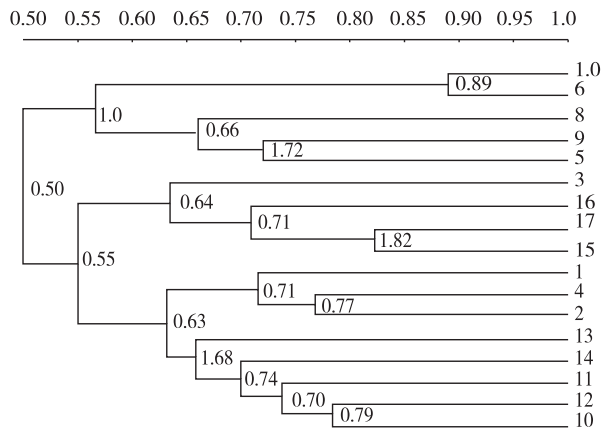


图 6　肠道微生物 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 6　DGGE profiles of intestinal microbiota in V3 region

2.2.2 PCR-DGGE 图谱聚类分析　如图 7 显示,采用非加权成对算术平均法 UPGMA 分析肠道微生物 PCR-DGGE 图谱时发现,各组样本都能够有效的聚为一类,由于个体差异,个别样品出现不同。正常组和模型组的相似性降低为 50%,说明发生结肠炎小鼠的肠道微生物群落结构与正常组小鼠存在显著差异;HEL 和 HEH 两组能够与模型组区分,并与正常组聚类,相似性可达到 64%,说明接受猴头菌粉治疗的小鼠,其肠道微生物群落向正常组接近。

2.2.3 微生物特异性分析　根据 DGGE 图谱发现,条带 A、B 和 C 的灰度与正常组相比,发生显著变化,于是将 3 个条带测序并在 GenBank 中进行同源性比对分析,结果显示条带 A 为 *Clostridium cocleatum* (99%),条带 B 为 *Akkermansia muciniphila* (100%),条带 C 为 *Barnesiella intestinihominis* (99%)。



注:1–4,5–9,10–13,14–17 分别表示 NC,MC,HEL 和 HEH 组

图 7 肠道微生物 16S rDNA V3 区 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 7 UPGMA analysis on DGGE profiles of intestinal microbiota in C57BL/6 mice

3 讨 论

溃疡性结肠炎的发病原因及相关机制还未有确切结论,但是越来越多的研究发现其发生、发展与肠道微生物的作用密不可分[11]。作者初步考察了猴头菌粉对小鼠结肠炎的治疗效果,并利用 PCR–DGGE 技术,分析猴头菌粉对结肠炎小鼠肠道微生物的影响。研究结果发现,猴头菌粉对结肠炎具有良好的治疗效果。经过治疗的小鼠饮食和活动情况得到改善,体重下降趋势减缓,DAI 评分降低。观察结肠的病理组织切片可以发现,发生结肠炎的小鼠结肠中出现大量炎性细胞的浸润和杯状细胞缺失的现象,隐窝腺体严重变形或消失,治疗组的小鼠结肠隐窝结构清晰可见,腺体排列整齐,但是仍然有不少炎性细胞浸润。陈敏等[12]人研究发现猴头提取物颗粒可以改善机体自由基水平来修复三硝基苯磺酸诱发的大鼠溃疡性结肠炎。李桂珍[13]、周中银[14]等人也在临床水平上证实了猴头菌提取物对溃疡性结肠炎具有良好的治疗效果。

通过分析 PCR–DGGE 指纹图谱发现,结肠炎小鼠与正常组小鼠的肠道微生物相似性为 50%,且图谱中大部分条带灰度降低,说明结肠炎小鼠的肠道菌群结构发生一定改变,菌群丰度降低,这与 Zhang 等[15]报道的结果一致。经过测序并在 Gen Bank 中进行比对发现,结肠炎小鼠肠道菌群中 *Clostridium cocleatum* 含量高于正常水平,治疗组中该菌的生长繁殖能够得到有效抑制。Erja Malinen[16]等研究发现肠易激综合症(IBS)患者胃肠内 *C. cocleatum* 的含量明显高于健康人群。Bibiloni 等[17]利用 PCR–DGGE 技术分析肠炎小鼠粪便样品,研究结肠炎发生过程中小鼠肠道微生物的变化,研究结果显示,小鼠肠道内 *C. cocleatum* 含量显著高于普通小鼠。这说明 *C. cocleatum* 与肠道疾病的发生相关,经 DSS 诱导引发肠炎疾病后的小鼠,其肠道内环境发生了变化,促进 *C. cocleatum* 快速繁殖。*Akkermansia muciniphila* 在结肠炎小鼠内的含量降低,治疗组中该菌的相对丰度增加。Everard 等[18]研究发现当肠道粘液层的 *A. muciniphila* 含量增加时,其对维持肠道内平衡,抑制饮食诱导的黏膜屏障厚度减少等具有重要作用。同时,*A. muciniphila* 能够增强肠上皮细胞的单层完整性,从而对受损肠道屏障起到一定的增强和保护作用[19]。Zhang 等[15]研究发现 DSS 诱导后的小鼠肠道中 *A. muciniphila* 含量下降,促进了结肠炎的发展。*A. muciniphila* 含量减少,影响了炎症肠道粘膜和屏障的修复,加剧了结肠炎的发展,而猴头菌粉的治疗可以促进 *A. muciniphila* 生长繁殖,使其发挥保护肠道粘膜的功能,改善肠道炎症症状。Sasso 等[20]研究发现 *Barnesiella intestinihominis* 存在于人类和小鼠肠道中,其含量在 IBD 患者肠道中显著减少。Zhao 等[21]发现在抗生素处理后的肠道微生物中 *B. intestinihominis* 含量减少,短链脂肪酸、初级胆汁酸的代谢水平也出现显著降低。治疗组小鼠肠道中由 DSS 摄入引起 *B. Intestinihominis* 含量降低情况有所改善,说明猴头菌粉能缓解肠道细菌紊乱的情况,维持机体代谢平衡。

4 结 语

猴头菌粉对 DSS 诱导的小鼠结肠炎具有良好的治疗效果,同时在一定程度上改善结肠炎小鼠肠道菌群紊乱的情况。DSS 的摄入扰乱了肠道细菌的群落结构,使得结肠炎小鼠肠道的菌群丰度低于正常水平,*C. cocleatum* 菌群相对含量增加,猴头菌粉促进了 *A. muciniphila* 等有益微生物的生长,减轻肠道炎症反应,从而在炎症性肠病的预防和治疗中发挥功效。猴头可以作为一种保健食品发挥改善溃疡性结肠炎的作用,但是具体的作用机制仍待进一步研究。

参考文献:

[1] MOLODECKY N A,SOON I S,RABI D M,et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time,based on systematic review[J]. **Gastroenterology**,2012,142(1):46-54.

[2] FRANK D N,AMAND A L S,FELDMAN R A,et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2007,104(34):13780-13785.

[3] NAGALINGAM N A,LYNCH S V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases [J]. **Inflammatory Bowel Diseases**,2012,18(5):968-984.

[4] BERRY D,KUZYK O,RAUCH I,et al. Intestinal microbiota signatures associated with inflammation history in mice experiencing recurring colitis[J]. **Frontiers in Microbiology**,2015,6(R50).

[5] QIN Mingming,GENG Yan,LUAN Xue,et al. Antioxidant activity of mycelial extracts from medicinal mushrooms [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2017,36(1):80-86. (in Chinese)

[6] QIN M,GENG Y,LU Z,et al. Anti-inflammatory effects of ethanol extract of lion's mane medicinal mushroom,Hericium erinaceus (agaricomycetes),in mice with ulcerative colitis[J]. **International Journal of Medicinal Mushrooms**,2016,18(3):227-234.

[7] HUANG Ping,LUO Zhen,GUO Zhongyi,et al. Study on the protective effect of polysaccharides from Hericium erinaceus[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**,2011,34(10):1588-1590. (in Chinese)

[8] COOPER H S,MURTHY S N,SHAH R S,et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. **Laboratory Investigation**,1993,69(2):238-249.

[9] GINER E,ANDUJAR I,RECIO M C,et al. Oleuropein ameliorates acute colitis in mice [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2011,59(24):12882-12892.

[10] WU Junrui,YUE Xiqing,SHI Pu,et al. Diversity of lactic acid bacteria involved in suan-cai using PCR-DGGE [J]. **Journal of Food Science & Biotechnology**,2014,33(2):127-130. (in Chinese)

[11] DONALDSON G P,LEE S M,MAZMANIAN S K. Gut biogeography of the bacterial microbiota [J]. **Nature Reviews Microbiology**,2015,14(1):20-32.

[12] CHEN Min,TIAN Hanwen. Study of Hericium erinaceus extract granules on ulcerative colitis[J]. **Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine**,2008,17(29):4529-4531. (in Chinese)

[13] LI Guizhen,JIANG Biwu,HU Wei,et al. Therapeutic effect of Hericium erinaceus extract granules on 80 patients with mild to moderate ulcerative colitis[J]. **Chinese Journal of Clinical Gastroenterology**,2007,19(2):113-114. (in Chinese)

[14] ZHOU Zhongyin,JING Zheyou. Clinical study on treatment of severe chronic ulcerative colitis with Hericium erinaceus extract granules[J]. **Chinese Journal of Clinical Gastroenterology**,2007,19(6):376-378. (in Chinese)

[15] ZHANG Z,WU X,CAO S,et al. Caffeic acid ameliorates colitis in association with increased Akkermansia population in the gut microbiota of mice[J]. **Oncotarget**,2016,7(22):31790.

[16] MALINEN E,KROGIUSKURIKKA L,LYRA A,et al. Association of symptoms with gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome[J]. **World Journal of Gastroenterology**,2010,16(36):4532-4540.

[17] BIBILONI R,SIMON M,ALBRIGHT C B,et al. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2005,41(1):45-51.

[18] EVERARD A,BELZER C,GEURTS L,et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2013,110(22):9066-9071.

[19] REUNANEN J,KAINULAINEN V,HUUSKONEN L,et al. Akkermansia muciniphila adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2015,81(11):3655-3662.

[20] SASSO G L,RYU D,MOUCHIROUD L,et al. Loss of sirt1 function improves intestinal anti-bacterial defense and protects from colitis-induced colorectal cancer[J]. **Plos One**,2014,9(9):e102495.

[21] ZHAO Y,WU J,LI J V,et al. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice [J]. **Journal of Proteome Research**,2013,12(6):2987-2999.