

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.22.001

• 基础研究 •

高脂饮食中添加短链菊粉对小鼠肠道菌群的影响*

张璐 周林康 廖榕玉 吴结根 徐俐[△]

(清华大学生命科学院 北京 100084)

摘要 目的:探究高脂饮食中添加短链菊粉对小鼠肠道菌群的影响。**方法:**选择 8 周龄雄性小鼠,5 只喂食高脂饲料,5 只喂食 10 % 菊粉复合型高脂饲料,喂食 8 周后收集小鼠粪便,检测小鼠粪便中三种主要的短链脂肪酸。同时,提取小鼠粪便中的细菌基因组,对菌群基因组 16S rRNA 基因 V4 高变区进行测序,对数据进行 PCoA 分析、Alpha 多样性分析、LEfSe 分析和 16S 功能预测。**结果:**菊粉添加后,小鼠粪便中含有的细菌 DNA 量增多,短链脂肪酸增加。菊粉组和对照组 PCoA 图可以看到明显聚类。菊粉组物种多样性低于对照组。菊粉组小鼠粪便中 S24_7 菌科丰度上升;*Lachnospiraceae* (毛螺菌科),*Ruminococcaceae* (瘤胃菌科)和 *Deferribacteraceae*(脱铁杆菌科)丰度下降。16S 基因功能预测发现 22 个第二层级的 KEGG 通路发生变化。**结论:**高脂饮食情况下短链菊粉的添加会改变小鼠肠道菌群,继而影响肠道菌群的功能。

关键词:肠道菌群;短链菊粉;高脂饮食

中图分类号:Q95-3; R-332 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)22-4201-06

Effect of Short-chain Inulin Supplement on the Gut Microbiota in Mice Fed by High Fat Diet*

ZHANG Lu, ZHOU Lin-kang, LIAO Rong-yu, WU Jie-gen, XU Li[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: Detect the gut microbiota change in mice caused by 10 % short-chain inulin addition in high fat diet condition. **Methods:** 8-week-old male C57/B6J mice, 5 mice were fed with high fat diets, 5 mice were fed with high fat diets with 10 % short-chain inulin addition. Fed 8 weeks and then collected fresh feces. Detected the three main short chain fatty acids in fresh feces. Extracted gut bacteria genome DNA for 16S rRNA V4 region sequencing. Principal Coordinate Analysis (PCoA), Alpha diversity and LEfSe analysis were performed to detect gut microbiota changes induced by short chain inulin. **Results:** Gut bacterial DNA amount and SCFAs amount per gram feces increased. PCoA analysis demonstrated fecal microbiota from inulin and control group mice had distinctive different features and clustered well. Inulin group owned lower fecal microbiota diversity compared with control group. LEfSe analysis revealed that in family level, S24_7 increased, *Deferribacteraceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* decreased. PICRUST predicted that 22 level 2 KEGG Orthology groups changed. **Conclusions:** Inulin addition altered the gut microbiota composition in mice in high fat diet condition and impact the gut microbiota gene function.

Key words: Gut microbiota; Short-chain inulin; High fat diet

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R-332 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)22-4201-06

前言

肠道菌群是寄居在肠道系统中的微生物集合,菌群之间相互制约、相互依存,使菌群组成趋于平衡稳定状态^[1]。一方面,菌群组成受饮食^[2]、抗生素^[3]、基因背景^[4]的影响;另一方面,肠道菌群又通过代谢活动影响机体^[5]。肠道系统疾病、代谢性疾病、免疫性疾病等多种疾病的发生发展与肠道菌群失调密切相关^[6]。高脂饮食会导致肠道细菌数量下降、菌群失调,而失调的肠道菌群又影响了肠道的功能,引发宿主代谢失调^[7]。

菊粉是自然界中广泛分布的碳水化合物,主要存在于植物中作为能量储备和冷冻保护剂^[8]。天然菊芋菊粉是由 β-葡萄糖苷键连接而成的链状果聚糖,哺乳动物体内由于不存在降解 β-葡萄糖苷键的消化酶,菊粉只能被寄居在肠道中的微生物水解发酵产生短链脂肪酸。因此,饮食中加入菊粉会影响肠道菌群的组成^[9]。菊粉的聚合度一般在 2~60 之间,聚合度在 2~9 之间的短链菊粉有着相似的理化性质,前期有研究表明菊粉因聚合度不同而产生不同的益生效应^[10],包括脂代谢^[11]、肠道黏蛋白和免疫球蛋白的分泌^[12,13]、矿物质吸收等^[14]。由于菊粉不能被哺乳动

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31430040,31321003);科技部 973 项目(2013CB530602)

作者简介:张璐,硕士研究生,主要研究方向:生物学,E-mail: 15311781510@163.com

△ 通讯作者:徐俐,硕士生导师,副研究员,主要研究方向:生物化学和分子生物学,E-mail: xulilulu@tsinghua.edu.cn,电话:010-62797133

(收稿日期:2016-12-22 接受日期:2017-01-23)

物代谢,这些生理指标的影响是由于不同聚合度的菊粉对肠道菌群影响的不同造成的。因此,探究某聚合度下的菊粉对肠道菌群组成的影响有着重要的意义。此前研究菌群变化的传统方法多使用定量 PCR-DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)对特定关注菌进行定量,这种方法无法宏观全面地反映菌群结构的变化。随着高通量测序技术的兴起,16S rRNA 测序应用于肠道菌群的研究,获取更多的信息和生物学功能分析。本研究使用 16S rRNA 测序的方法从整体菌群结构、差异菌群标记物和菌群差异功能基因三个角度探讨高脂饮食情况下短链菊粉的添加对肠道菌群的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

8 周龄 C57/B6J 野生型小鼠 10 只,高脂饲料 12492(60 % 能量由脂肪提供,华阜康,北京),短链菊粉(聚合度为 2~9)由英纽林公司提供。10 % 菊粉复合型高脂饲料由华阜康混合投料加工。PowerSoil DNA Isolation Kit(货号 12888-50,美国 MOBIO 公司),提取基因组送到诺禾致源(天津)进行后续测序分析。

1.2 方法

1.2.1 小鼠喂养和粪便收集 SPF 级环境普通繁殖饲料饲养,自由取食,自由饮水的 8 周龄雄鼠 10 只,随机分成两组,每组 5 只,一组喂食高脂饲料,一组喂食 10 % 菊粉复合型高脂饲料。喂食 8 周后,早 9:00-9:30 分别置于空笼中,分别收集新鲜粪便 0.1 g 于 1.5 mL EP 管中,立即提取短链脂肪酸或粪便菌群基因组。

1.2.2 粪便中短链脂肪酸的提取和定量 短链脂肪酸的提取和定量按照论文^[15]中的方法。称取 100 mg 左右新鲜粪便于 1.5 mL EP 管中,按 10 μ L/mg 加入 50 % (v/v) 乙腈水溶液,用枪头捣碎粪便,再使用涡旋仪震荡 5 min,充分提取短链脂肪酸。4,000 $\times$ g, 10 $^{\circ}$ C 离心 10 min,吸取 40 μ L 上清液于 PCR 管中,加入 20 μ L 的 200 mM 3NPH-HCl 乙腈水溶液和 20 μ L 120 mM EDC-HCl-6 % 吡啶溶液,混匀,使用 PCR 仪控温,40 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。反应液常温 10,000 $\times$ g 离心 10 min,室温真空烘干,悬干粉末于 -80 $^{\circ}$ C 过夜保存,第二天 TSQ 上机分析。参数设定与文献一致。使用 Synergi Hydro-RP 100A 柱子,柱温 40 $^{\circ}$ C。阴离子模式。流动相 A(水:甲酸=100:0.01, v/v),流动相 B(乙腈:甲酸=100:0.01, v/v)。梯度洗脱,流速 0.35 mL/min。

1.2.3 粪便菌群基因组 DNA 的提取 使用 PowerSoil DNA Isolation 试剂盒提取小鼠粪便基因组。具体方法:向提供的 PowerBead Tubes 里加入 100 mg 粪便样品。涡旋混匀。加入 60 μ L 试剂 C1,涡旋震荡 20 min。室温 10000 $\times$ g 离心 30 s。上清转移到新的 2 mL EP 管中,加入 250 μ L 试剂 C2,涡旋 5 s,4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。室温 10000 $\times$ g 离心 1 min。转移上清到新的 2 mL 离心管中,加入 200 μ L 试剂 C3,涡旋混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。室温 10000 $\times$ g 离心 1 min,转移上清到 2 mL 离心管中,加入 1.2 mL 试剂 C4,涡旋 5 s。吸取 675 μ L 混合液加入 Spin Filter 上,室温 10000 g 离心 1 min。弃掉底部收集的滤液,重复 3 次,将混合液中 DNA 富集到 Spin Filter 的滤膜上。向 Spin Filter 中加入 500 μ L 试剂 C5,室温 10000 $\times$ g 离心 1 min。弃掉滤液,10000 $\times$ g 空离 1 min,将 Spin Filter 置于新的 2 mL 离心管上,

加入 100 μ L 试剂 C6,10000 $\times$ g 离心 30 s,收集液为提取到的基因组 DNA。使用 Nano Drop 检测 DNA 浓度粗略反应粪便中肠道细菌的数量。提取到的基因组 DNA 送到诺禾致源进行后续测序分析。

1.2.4 PCR 扩增和建库测序 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度,取适量的样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至 1 ng/ μ L。以稀释后的基因组 DNA 为模板,使用带 Barcode 的 16S V4 区(515F 和 806R)特异引物,New England Biolabs 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer,和高效高保真酶进行对 PCR,确保扩增效率和准确性。PCR 产物使用 2 % 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的条带使用 qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物。使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序。

1.2.5 16S rDNA 数据分析 根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)对每个样品的 reads 进行拼接,得到的拼接序列为原始 Tags 数据。参照 Qiime (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html)的 Tags 质量控制流程,经过严格的过滤处理得到高质量的 Tags 数据。利用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类,默认以 97 % 的一致性将序列聚类成为 OTUs,同时选取 OTUs 的代表性序列,依据其算法原则,筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。对 OTUs 代表序列进行物种注释,用 Mothur 方法与 SILVA(<http://www.arb-silva.de/>)的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析(设定阈值为 0.8~1),获得分类学信息并分别在各个分类水平统计各样本的群落组成。以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理,后续所有分析都是基于均一化处理后的数据。使用 Qiime 软件 (Version 1.7.0) 计算 Observed-species, Chao1, Shannon, Simpson, ACE, Goods-coverage 指数。使用 R 件 (Version 2.15.3) 绘制 PCoA 图,PCoA 分析使用 R 软件的 ade4 包和 ggplot2 软件包。LEfSe 分析使用 LEfSe 软件,默认设置 LDA Score 的筛选值为 4。基因组 16S 功能预测使用 PICRUSt 软件, LDA Score 的筛选值为 2。

2 结果

2.1 高脂饮食中添加短链菊粉增加肠道细菌数量和短链脂肪酸

用每克粪便中提取到的细菌 DNA 量粗略反映粪便中细菌数量的多少,可见高脂饮食情况下菊粉的添加使肠道细菌数量增加(图 1A)。通过对粪便中的短链脂肪酸定量发现菊粉的添加使对宿主有益的短链脂肪酸乙酸、丙酸、丁酸的产生增多(图 1B)。

2.2 高脂饮食中添加短链菊粉显著改变小鼠肠道菌群的组成

对小鼠粪便基因组 16S rRNA 的 V4 区进行 PCR 扩增,产物纯化建库后使用 HiSeq PE250 进行测序,下机数据是 Raw

PE, 然后进行拼接和质控, 得到 Clean Tags, 再进行嵌合体过滤, 得到可用于后续分析的有效数据, 即 Effective Tags。数据处理过程中各步骤得到的序列统计结果见表 1。其中, 每个样品均得到 49000 条以上有效数据, 原始数据有效率均在 90 %以上。

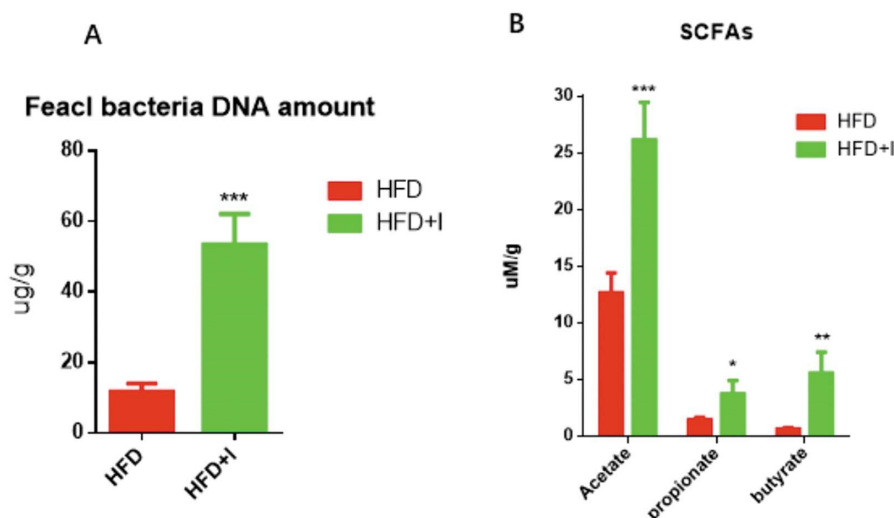


图 1 菊粉组 and 对照组小鼠 A) 粪便细菌的 DNA 量 B) 粪便代谢产物短链脂肪酸的量
Fig. 1 A) Fecal bacteria DNA amount B) Metabolites SCFAs amount in inulin and control group

表 1 数据预处理统计及质控
Table 1 Data process and quality control

Sample Name	Raw PE(#)	Raw Tags (#)	Clean Tags (#)	Effective Tags(#)	Base(nt)	AvgLen(nt)	Q20	Q30	GC%	Effective%
HFD1	57,807	56,537	55,862	54,072	13,668,040	253	99.23	98.56	53.05	93.54
HFD2	64,927	63,380	62,610	60,714	15,349,296	253	99.16	98.46	53.78	93.51
HFD3	52,380	51,157	50,492	49,400	12,489,941	253	99.13	98.4	52.26	94.31
HFD4	60,890	59,139	58,374	55,644	14,062,427	253	99.15	98.43	51.16	91.38
HFD5	58,345	56,919	56,149	54,745	13,835,906	253	99.13	98.42	52.02	93.83
HFD+I1	68,815	67,322	66,375	65,052	16,440,577	253	99.12	98.39	52.61	94.53
HFD+I2	64,544	63,044	62,168	60,979	15,414,590	253	99.14	98.41	51.91	94.48
HFD+I3	59,961	58,504	57,636	56,489	14,283,048	253	99.11	98.37	52.72	94.21
HFD+I4	61,945	60,432	59,602	58,477	14,776,106	253	99.09	98.34	52.01	94.4
HFD+I5	68,516	66,790	65,842	64,406	16,278,159	253	99.09	98.35	52.44	94

按 Effective tags 最少的样品 HFD3 进行均一化处理, 对所有样品有效序列进行聚类, 以 97 % 的一致性将序列聚类成为操作分类单元 OTUs, 然后对 OTUs 的代表序列进行物种注释。从图 2 可以看出, 高脂饮食情况下, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Deferribacteres*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* 和 TM7 是丰度高的菌门。饮食中添加短链菊粉后, *Bacteroidetes* 丰度上升, *Deferribacteres* 丰度下降。

如图 3 所示, 用 Weighted_UniFrac 进行 PCoA 聚类分析, 其中第一主坐标贡献 64.83 %, 第二主坐标贡献 13.46 %。菊粉添加组和对照组间能看到明显聚类(P=0.0048), 说明高脂情况下添加菊粉会显著影响小鼠肠道菌群。

2.3 高脂饮食中添加短链菊粉降低粪便菌群的多样性

对小鼠粪便样品中的菌群多样性进行评估, 一个 OTU 代表一个物种, 菊粉组观测到 374 个物种, 对照组观测到 570 个物种, 测序深度 0.998。计算每个样品的 Shannon、Simpson、Chao1、ACE 指数, 其中 Chao1 和 ACE 用于估算菌群中含有的 OTU 数目, Shannon 和 Simpson 用于估算菌群多样性, 4 个指数均用来反映菌群的多样性。可以见高脂情况下添加短链菊粉粪便中菌群多样性下降(表 2)。

2.4 高脂饮食中添加短链菊粉的差异物种

LEfSe 采用线性判别分析来估算每个组份丰度对差异效果影响的大小, 找出对样品划分产生显著性差异影响的群落或物种。相较于对照组小鼠, 菊粉组小鼠粪便中 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)中的 *Bacteroidales*(拟杆菌目)丰度上升, *Bacteroidales*(拟杆菌目)中的 S24_7 菌科丰度上升; *Firmicutes*(厚壁菌门)中

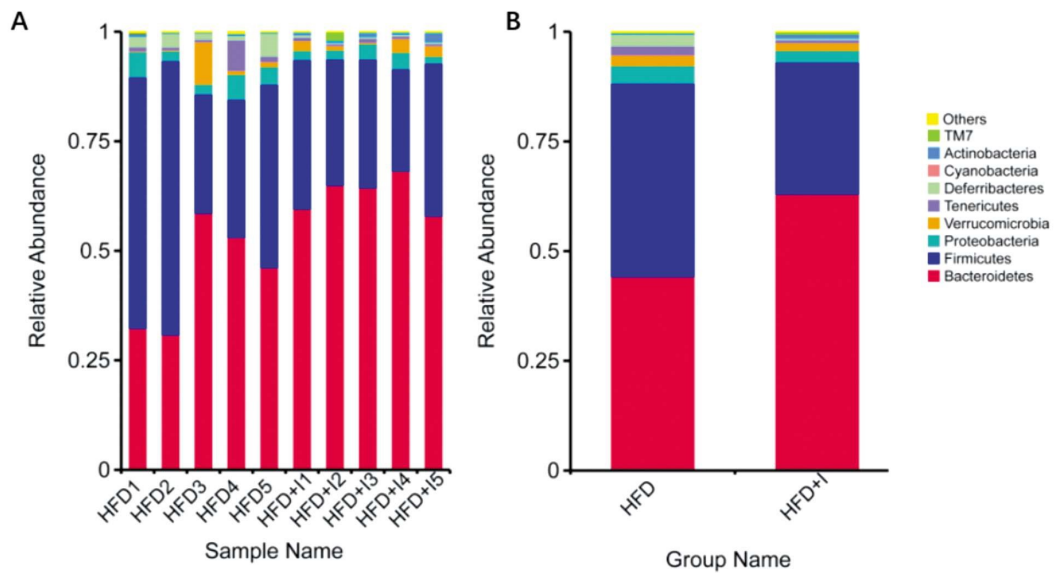


图 2 菊粉组和对照组小鼠菌群在门水平的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of bacteria taxa in phylum level in inulin and control group

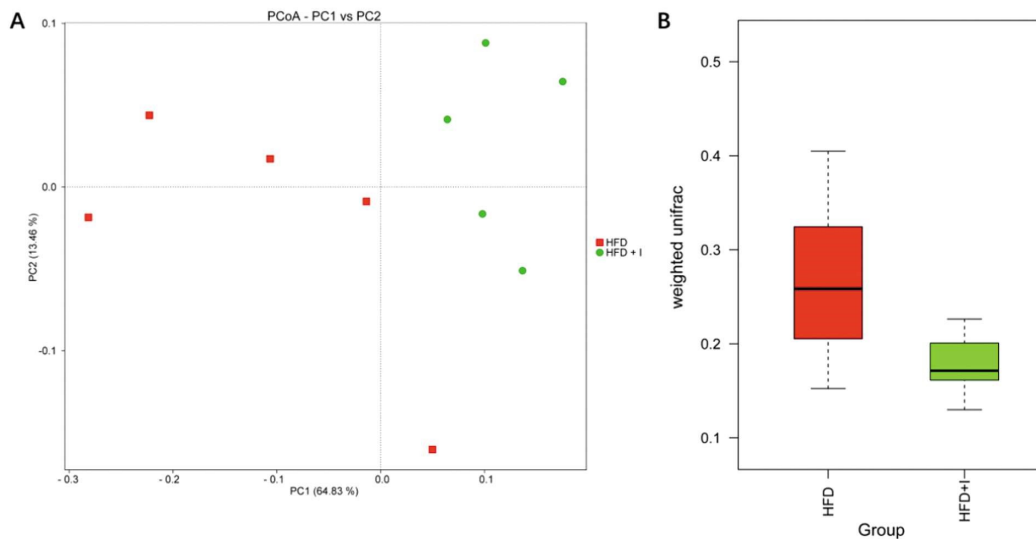


图 3 PCoA 聚类分析菊粉和对照小鼠肠道菌群

Fig. 3 PCoA analysis of gut bacterial communities of inulin and control group mice

表 2 Alpha 多样性指数表

Table 2 Alpha diversity index

Groups	Observed species	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods coverage
HFD	570	6.337	0.9644	607.3694	610.9362	0.9986
HFD+Inulin	374	5.721	0.9536	404.5358	407.3074	0.999
P value	0.00493	0.014468	0.183485	0.005416	0.005504	0.141113

的 *Clostridiales*(梭菌目)丰度下降, *Clostridiales*(梭菌目)中的 *Lachnospiraceae*(毛螺菌科)和 *Ruminococcaceae*(瘤胃菌科)丰度下降; *Deferribacteres*(脱铁杆菌门)下 *Deferribacteraceae*(脱铁杆菌科)中的 *Mucispirillum.schaedle* 菌种丰度减少(图 4)。

2.5 PICRUS 分析预测菌群基因组功能变化

PICRUS 基于 16S rDNA 和参考序列数据库,预测菌群宏基因组功能组成,方法准确性在 84 %-95 %^[16]。从图 5 中可以看

出,在菊粉组中包括多糖合成和代谢,氨基酸代谢,核酸代谢,能量代谢,次级代谢物合成等在内的 14 个第二层级的 KEGG 通路上调,包括膜运输,细胞运动,信号转导,心血管疾病在内的 8 个第二层级的 KEGG 通路下调。这些显著性改变通路预测,暗示高脂情况下菊粉的添加可改善小鼠菌群结构,从而对小鼠产生益生效应。

3 讨论

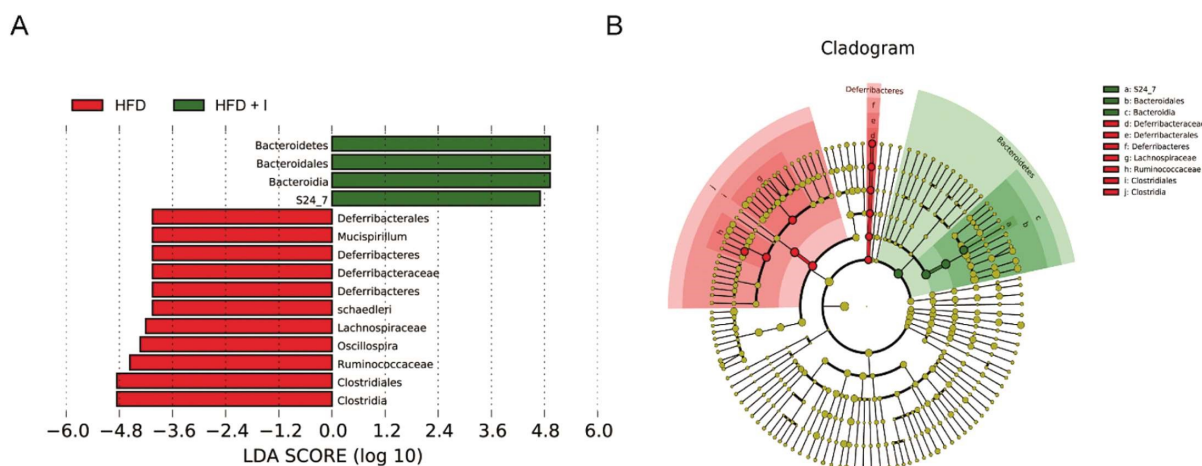


图 4 LefSe 分析鉴定菊粉和对照组小鼠的肠道微生物差异

Fig. 4 LefSe analysis identified biomarker bacteria between inulin and control group

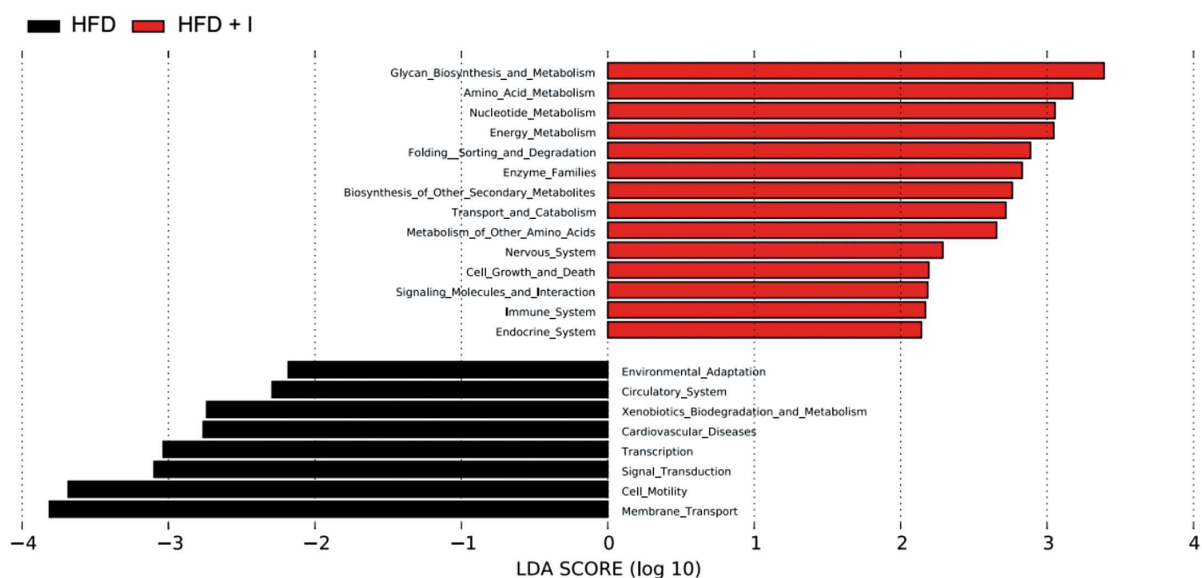


图 5 16S 预测菊粉和对照组小鼠的肠道微生物基因功能差异

Fig. 5 16S predict the bacterial gene function difference between inulin and control group

越来越多的研究表明寄居在动物和人类肠道的菌群正在作为第二基因组密切的影响着宿主的健康。不同于我们以素食为主的祖先,现代人高脂、高蛋白的饮食习惯使肠道菌群数量减少,多样性下降,紊乱的肠道菌群又进一步影响着我们的健康。膳食纤维可以一定程度的改善肠道菌群的情况,菊粉作为一种膳食纤维在菌群受高脂饮食影响减少的情况下为饥饿的肠道菌群提供食物,刺激肠道益生菌的生长。在本实验中,高脂饮食情况下添加短链菊粉后肠道细菌数量上升,有益代谢产物短链脂肪酸增多,肠道菌群结构发生明显变化。研究表明饮食中添加菊粉可以刺激益生菌的生长,抑制有害菌的定植从而减轻肠道炎症^[17];可以减低基因毒性酶的活性,降低癌症的风险^[18];可以通过改变肠道菌群增加肠道对矿物质的吸收^[19];可以调节脂代谢,减少高脂饮食导致的体重上升,血脂增高^[20];可以降低胆固醇及心血管疾病的风险^[21,22]。因此,全面而深入的检测菊粉对菌群组成的影响是我们阐明菊粉健康作用的第一步。

LefSe 分析显示相较于对照组小鼠,菊粉组小鼠粪便丰度

上升的菌群包括 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)中的 *Bacteroidales*(拟杆菌目),*Bacteroidales*(拟杆菌目)中的 *S24_7* 菌科,研究表明高脂饮食情况下,肠道中的 *S24_7* 菌群丰度下降^[23],补充菊粉后,*S24_7* 丰度上升;*S24_7* 在未发展为糖尿病的 NOD 小鼠中丰度较高,而在发展为糖尿病的 NOD 小鼠中丰度较低^[24]。此外,菊粉组小鼠粪便丰度下降的菌群包括 *Firmicutes*(厚壁菌门)中的 *Clostridiales*(梭菌目),*Clostridiales*(梭菌目)中的 *Lachnospiraceae*(毛螺菌科)和 *Ruminococcaceae*(瘤胃菌科),*Deferribacteres*(脱铁杆菌门)下 *Deferribacteraceae*(脱铁杆菌科)中的 *Mucispirillum.schaedle*。*Mucispirillum.schaedleri* 是一种螺旋形细菌,分布在肠分泌粘液层,被认为具有降解黏液蛋白层的危害^[25],可逃避 T-细胞非依赖反应渗入粘膜层和抗原呈递细胞及初级 T 细胞发生作用^[26]。随着炎症反应丰度升高^[27],*Mucispirillum.schaedle* 在小鼠结肠炎活跃期粪便中丰度更高,而在结肠炎缓解期的小鼠粪便中丰度降低^[28],将 *Mucispirillum.schaedle* 移植到无菌小鼠中引发肠道促炎反应^[29]。*Ruminococ-*

caceae 在右旋糖酐硫酸酯钠诱导的结肠炎小鼠粪便中丰度上升^[30],在结肠腺瘤患者中丰度高于健康群体^[31]。*Lachnospiraceae* 和 *Ruminococcus* 在发展为糖尿病的 NOD 小鼠中丰度较高,而在未发展成糖尿病的小鼠中丰度较低^[24]。这些数据暗示短链菊粉的添加抑制了一些潜在有害菌的生长,改善了肠道微生物的健康。通过 16S 菌群基因功能预测表明高脂情况下菊粉添加影响了菌群基因功能。然而,由于细菌不同菌株之间的差异很大,有观点认为科水平和属水平的变化很难进一步探讨这些变化带来的生理意义^[32]。因此,进一步的研究希望集中在菌种水平,甚至菌株水平的探讨。此外,在本实验中添加短链菊粉后大便菌群多样性却下降,推测可能是由于短链菊粉发酵迅速有关系。可见,由菊粉添加导致肠道内不同部位的菌群变化研究也是有必要的。

总之,高脂饮食情况下补充短链菊粉影响肠道菌群的结构和基因功能,并且菌群有益代谢产物短链脂肪酸的生成增加。

参 考 文 献(References)

- [1] Brussow H. How stable is the human gut microbiota? And why this question matters [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18 (9): 2779-2783
- [2] Voreades N, Kozil A, Weir T L. Diet and the development of the human intestinal microbiome [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 494
- [3] Lange K, Buerger M, Stallmach A, et al. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota[J]. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 2016, 34(3): 260-268
- [4] Goodrich J K, Waters J L, Poole A C, et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 789-799
- [5] Donia M S, Fischbach M A. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2015, 349(6246): 1254766
- [6] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 242-249
- [7] Daniel H, Gholami A M, Berry D, et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice[J]. *The ISME journal*, 2014, 8(2): 295-308
- [8] Mensink M A, Frijlink H W, Van Der Voort Maarschalk K, et al. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 130: 405-419
- [9] Roberfröid M B. Introducing inulin-type fructans [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2005, 93(Suppl 1): S13-25
- [10] Van De Wiele T, Boon N, Possemiers S, et al. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(2): 452-460
- [11] Han K-H, Tsuchihira H, Nakamura Y, et al. Inulin-type fructans with different degrees of polymerization improve lipid metabolism but not glucose metabolism in rats fed a high-fat diet under energy restriction [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2013, 58(8): 2177-2186
- [12] Ito H, Wada T, Ohguchi M, et al. The degree of polymerization of inulin-like fructans affects cecal mucin and immunoglobulin A in rats [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(3): H36-41
- [13] Ito H, Takemura N, Sonoyama K, et al. Degree of Polymerization of Inulin-Type Fructans Differentially Affects Number of Lactic Acid Bacteria, Intestinal Immune Functions, and Immunoglobulin A Secretion in the Rat Cecum [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5771-5778
- [14] Coudray C, Tressol J C, Gueux E, et al. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats [J]. *European Journal of Nutrition*, 2003, 42(2): 91-98
- [15] Han J, Lin K, Sequeira C, et al. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 854: 86-94
- [16] Langille M G I, 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
- [17] Guarner F. Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation [J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(11 Suppl): 2568S-2571S
- [18] Pool-Zobel B L, Sauer J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans [J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(11 Suppl): 2580S-2584S
- [19] Scholz-Ahrens K E, Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials [J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(11 Suppl): 2513S-2523S
- [20] REIS S A Dos, CONCEIÇÃO L L Da, ROSA D D, et al. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile [J]. *Nutricion Hospitalaria*, 2014, 31(2): 528-534
- [21] Mitchell C M, Davy B M, Halliday T M, et al. The effect of prebiotic supplementation with inulin on cardiometabolic health: Rationale, design, and methods of a controlled feeding efficacy trial in adults at risk of type 2 diabetes [J]. *Contemporary Clinical Trials*, 2015, 45(Pt B): 328-337
- [22] Aliasgharzadeh A, Khalili M, Mirtaheri E, et al. A Combination of Prebiotic Inulin and Oligofructose Improve Some of Cardiovascular Disease Risk Factors in Women with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial [J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 5(4): 507-514
- [23] Tomas J, Mulet C, Saffarian A, et al. High-fat diet modifies the PPAR-γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(40): E5934-E5943
- [24] Krych Ł, Nielsen D S, Hansen A K, et al. Gut microbial markers are associated with diabetes onset, regulatory imbalance, and IFN-γ level in NOD mice[J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(2): 101-109
- [25] Robertson B R, O'Rourke J L, Neilan B A, et al. *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp. nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(Pt 3): 1199-1204
- [26] Bunker J J, Flynn T M, Koval J C, et al. Innate and adaptive humoral responses coat distinct commensal bacteria with immunoglobulin A [J]. *Immunity*, 2015, 43(3): 541-553

- J UOEH, 2007, 29(1): 27-38
- [6] Yurko Y Y, Scerbo M W, Prabhu A S, et al. Higher mental workload is associated with poorer laparoscopic performance as measured by the NASA-TLX tool[J]. *Simul Healthc*, 2010, 5(5): 267-271
- [7] Mazur L M, Mosaly P R, Jackson M, et al. Quantitative assessment of workload and stressors in clinical radiation oncology [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(5): e571-e576
- [8] Dey A, Mann D D. Sensitivity and diagnosticity of NASA-TLX and simplified SWAT to assess the mental workload associated with operating an agricultural sprayer[J]. *Ergonomics*, 2010, 53(7): 848-857
- [9] Avni N, Avni I, Barenboim E, et al. Brief posturographic test as an indicator of fatigue[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2006, 60(3): 340-346
- [10] Widyanti A, de Waard D, Johnson A, et al. National culture moderates the influence of mental effort on subjective and cardiovascular measures[J]. *Ergonomics*, 2013, 56(2): 182-194
- [11] Ma J, Yao Y J, Ma R M, et al. Effects of sleep deprivation on human postural control, subjective fatigue assessment and psychomotor performance[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(5): 1311-1320
- [12] Patel M, Gomez S, Berg S, et al. Effects of 24-h and 36-h sleep deprivation on human postural control and adaptation [J]. *Exp Brain Res*, 2008, 185(2): 165-173
- [13] Nam H S, Park D S, Kim D H, et al. The relationship between muscle fatigue and balance in the elderly [J]. *Ann Rehabil Med*, 2013, 37(3): 389-395
- [14] Akkaya N, Akkaya S, Atalay N S, et al. Assessment of the relationship between postural stability and sleep quality in patients with fibromyalgia[J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(3): 325-331
- [15] 王斌, 马进, 张利利, 等. 持续工作负荷所致脑力疲劳对静态平衡能力变化的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2012, 25(04): 251-255
Wang Bin, Ma Jin, Zhang Li-li, et al. Effects of mental fatigue induced by continuous workload on posturographic changes[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2012, 25(4): 251-255
- [16] 程珊, 马进, 孙继成, 等. 模拟飞行任务负荷对人体姿势控制的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(09): 1735-1739
- Cheng Shan, Ma Jin, Sun Ji-cheng, et al. The effect of simulated flight tasks on postural control [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(9): 1735-1739
- [17] Barozzi S, Soi D, Gagliardi C, et al. Balance function in patients with Williams syndrome[J]. *Gait Posture*, 2013, 38(2): 221-225
- [18] Hill M W, Oxford S W, Duncan M J, et al. The effects of arm crank ergometry, cycle ergometry and treadmill walking on postural sway in healthy older females[J]. *Gait Posture*, 2015, 41(1): 252-257
- [19] Ceyte H, Lion A, Caudron S, et al. Does calculating impair postural stabilization allowed by visual cues?[J]. *Exp Brain Res*, 2014, 232(7): 2221-2228
- [20] Kanakis I, Hatzitaki V, Patikas D, et al. Postural leaning direction challenges the manifestation of tendon vibration responses at the ankle joint[J]. *Hum Mov Sci*, 2014, 33: 251-262
- [21] Janssens L, Brumagne S, McConnell A K, et al. Proprioceptive changes impair balance control in individuals with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57949
- [22] Wiggermann N, Keyserling W M. Effects of anti-fatigue mats on perceived discomfort and weight-shifting during prolonged standing [J]. *Hum Factors*, 2013, 55(4): 764-775
- [23] Putilov A A, Donskaya O G, Verevkin E G. Quantification of sleepiness through principal component analysis of the electroencephalographic spectrum[J]. *Chronobiol Int*, 2012, 29(4): 509-522
- [24] Putilov A A. Principal components of electroencephalographic spectrum as markers of opponent processes underlying ultradian sleep cycles[J]. *Chronobiol Int*, 2011, 28(4): 287-299
- [25] Krisciukaitis A, Simoliuniene R, Tamosiunas M, et al. Efficiency evaluation of autonomic heart control by using the principal component analysis of ECG P-wave [J]. *Methods Inf Med*, 2010, 49(2): 161-167
- [26] Forsman P, Haeggstrom E, Wallin A E, et al. Principal component analysis detects sleepiness-related changes in balance control[J]. *Gait Posture*, 2010, 32(3): 419-421

(上接第 4206 页)

- [27] 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
- [28] Rooks M G, Veiga P, Wardwell-Scott L H, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission [J]. *The ISME journal*, 2014, 8(7): 1403-1417
- [29] El Aidy S, Derrien M, Aardema R, et al. Transient inflammatory-like state and microbial dysbiosis are pivotal in establishment of mucosal homeostasis during colonisation of germ-free mice [J]. *Beneficial Microbes*, 2014, 5(1): 67-77
- [30] Berry D, Schwab C, Milinovich G, et al. Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis[J]. *The ISME journal*, 2012, 6(11): 2091-2106
- [31] Zackular J P, Rogers M A M, Ruffin M T, et al. The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer [J]. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2014, 7(11): 1112-1121
- [32] Zhang C, Zhao L. Strain-level dissection of the contribution of the gut microbiome to human metabolic disease[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 41