

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :167 - 173; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.005

高脂肪日粮和产甲烷菌抑制剂对 C57BL/6J 小鼠盲肠微生物及脂肪代谢的影响

马力, 张信宜, 把程成, 高铭蔚, 苏勇*, 朱伟云

南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

摘要: 【目的】本文旨在研究产甲烷菌抑制剂溴氯甲烷 (BCM) 对采食高、低脂肪水平日粮小鼠的肠道微生物以及脂肪代谢的影响。【方法】选取 32 只 21 日龄的雌性 C57BL/6J 小鼠, 随机分成 4 组: 对照低脂日粮组、对照低脂日粮加 BCM 组、高脂日粮组及高脂日粮加 BCM 组, 每组 8 个重复, BCM 通过饮水添加。饲养周期为 6 周, 试验期结束, 采集小鼠血液样品, 用于生化指标分析; 采集小鼠盲肠内容物, 用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和 real-time PCR 技术分析其菌群; 气相色谱法分析粪样中短链脂肪酸含量; real-time PCR 技术分析肝脏中脂肪代谢相关基因表达。【结果】高脂日粮和 BCM 处理对小鼠体增重均无显著影响; DGGE 图谱中低脂日粮组和高脂日粮组样品聚于不同簇, 但对各组总细菌、产甲烷菌和硫还原菌数量无显著影响。高脂日粮组粪样中乙酸占总挥发酸比例显著降低 ($P < 0.05$); BCM 处理显著增加小鼠粪样丙酸比例 ($P < 0.05$); 高脂日粮处理显著影响高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇含量 ($P < 0.05$); 高脂日粮处理促进了甘油三酯水解酶表达 ($P < 0.05$)。【结论】高脂日粮对小鼠肠道菌群结构以及脂肪代谢有明显影响, 而 BCM 处理影响较小。

关键词: 溴氯甲烷, 高脂日粮, 肠道菌群, 脂肪代谢

中图分类号: S811.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014)02-0167-07

作为温室气体 CH_4 最主要的产生者, 产甲烷菌是目前研究最广泛、最热门的肠道寄生菌之一, 尤其是在瘤胃动物的研究上^[1]。在单胃动物和人方面, 肠道中产甲烷菌也越来越受到大家关注。最近的研究发现, 肠道产甲烷菌与宿主能量代谢和肥胖症有一定关联, 产甲烷菌对物质代谢和脂肪沉积具有显著性影响。在肥胖体型的人体内几乎检测不到史氏甲烷短杆菌的存在^[2], 而在患厌食症的人体内, 其数量显著高于在体型偏瘦的人^[3]。用无菌小鼠作为实验动物模型的研究发现, 在无菌小鼠体内定植

来自于人体的甲烷短杆菌属和拟杆菌属细菌后, 观测到明显的脂肪沉积^[4]。此外, 瘦肉型长白猪相对于脂肪型的二花脸猪, 肠道内产甲烷菌的数量和多样性均显著偏高^[5]。目前, 以普通单胃动物作为模型研究肠道产甲烷菌对宿主代谢影响的报道尚不多。

甲烷抑制剂溴氯甲烷 (Bromochloromethane, BCM) 是一种甲烷卤化物, 它通过作用于辅酶 B 来抑制产甲烷过程^[6-7]。在反刍动物方面, 口服灌注 BCM 可显著降低瘤胃甲烷的产生, 但对瘤胃菌群及代谢产物无显著影响^[8-9]。在单胃动物方面, 罗玉

基金项目: “国家大学生创新创业训练计划”资助项目 (121030735)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395523; E-mail: yong.su@njau.edu.cn

作者简介: 马力 (1988 -), 男, 江苏如东人, 硕士研究生, 主要从事消化道微生物研究。E-mail: 804737503@qq.com

收稿日期: 2013-07-04; 修回日期: 2013-10-04

衡(2012)通过口服灌注大鼠 BCM,发现大鼠肠道产甲烷菌数量降低并且脂肪代谢受到影响^[10],但是,BCM抑制肠道产甲烷对宿主产生的作用是否受日粮脂肪(能量)水平影响尚不清楚。目前,尽管在不同脂肪水平日粮对单胃动物肠道菌群影响方面已有研究^[11-12],但是,多数研究主要关注厚壁菌门和拟杆菌门细菌,尚未有肠道产甲烷菌与日粮互作影响方面的报道。因此,本试验以小鼠作为动物模型,通过给饲喂高、低脂肪日粮小鼠灌注 BCM,研究其对小鼠肠道菌群及其脂肪代谢的影响,为探索肠道产甲烷菌在宿主能量和脂肪代谢方面所起的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及样品采集:采购 32 只 21 日龄雌性 C57BL/6J 小鼠,适应 1 周后,称量体重,随机分为 4 组:低脂对照日粮组(Low fat)、低脂对照日粮 + BCM 组(Low fat + BCM)、高脂日粮组(High fat)和高脂日粮 + BCM 组(High fat + BCM),每组 8 个重复,分 2 笼饲养,每笼 4 只小鼠。低脂对照日粮和高脂日粮配方见表 1。甲烷菌抑制剂 BCM 通过饮水口服(每天 0.3 mg/100 g 体重),饮水每天更换,并用铝箔包裹水瓶避光。

表 1. 低脂日粮和高脂日粮组成

Table 1. The nutrient component of low fat and high fat diets

ingredients	low fat diet /%	high fat diet /%
casein	20.0	20.0
sucrose	10.0	10.0
wheat starch	40.4	31.3
dextrinised starch	13.2	13.2
cellulose	5.0	5.0
colza oil	7.0	12.4
DL-methionine	0.3	0.3
lard oil	0	3.7
salt	0.2	0.2
calcium hydrophosphate	1.0	1.0
calcium phosphate	1.3	1.3
choline chloride	0.1	0.1
vitamin and mineral premix ^①	1.5	1.5
nutrients		
crude protein	19.4%	19.4%
crude fat	7.0%	16%
metabolisable energy (MJ/Kg)	14.82	16.96

① Referring to the standard AIN93G rodent diet.

试验预饲 1 周,正试期为 5 周。期间每周称量小鼠体重,试验期末收集小鼠粪样, -20℃ 保存。处死小鼠,眼球采血,用于分离血清;采集盲肠内容物, -20℃ 保存;采集肝脏组织,液氮保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:丙烯酰胺、尿素(Amersco 产品); Tris、EDTA、APS, SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa); 气相色谱仪(日本岛津公司); PCR 仪(Biometra); FastPrep-24 (MP); Dcode DGGE System, GS-800 灰度扫描仪(Bio-Rad); ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。

1.2 盲肠食糜总 DNA 的提取与 PCR-DGGE

1.2.1 盲肠食糜总 DNA 的提取:称取约 0.3 g 解冻后的食糜至灭菌后的离心管中,加入 1.5 mL 的磷酸盐缓冲液(PBS, PH = 7.0)溶液,涡旋混合, 10000 × g 离心 5 min, 去上清,参照 Zoetendal 等^[13]的方法,先用珠磨机机械破碎样品,而后用酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)提取其总 DNA。

1.2.2 PCR-DGGE:以粪样中总细菌 DNA 作为模板,对细菌的 16S rRNA 基因序列的 V6-V8 区片段进行 PCR 反应,PCR 引物为带有 GC 夹子的 U968GC 和 L1401^[14]。PCR 反应程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 20 s,68℃ 40 s,35 个循环;68℃ 7 min。PCR 产物经 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测。

DGGE 采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺/二丙酰胺 37.5:1、尿素、甲酰胺和甘油),尿素浓度梯度为 38% - 52%。电泳采用 Decode DGGE 系统(Bio-Rad):首先在 220 V 电压下电泳 10 min,随后在 85 V 的固定电压下电泳 12 h。电泳结束后,聚丙烯酰胺凝胶进行硝酸银染色,凝胶显色定影后采用 GS-800 灰度扫描仪(Bio-Rad)扫描。获得的 DGGE 图谱用 Gelcompar II 软件进行相似性分析。通过计算条带间的相似性指数(SD)得到图谱相似性(SD = 2nAB/nA + nB),nA 代表泳道 A 的条带数,nB 代表泳道 B 的条带数,nAB 代表泳道 A 和 B 共有的条带数。

1.3 Real-time PCR 定量菌群

使用 ABI 7500 Real-time PCR 仪对试验期末小鼠粪样中总细菌、产甲烷菌和硫酸盐还原菌进行定量分析^[9,15-16]。分别以总细菌、产甲烷菌、硫酸盐还原菌的 16S rRNA 基因作为模板制作相应细菌定量的标准曲线。引物及 PCR 反应退火温度见表 2。

1.4 粪样挥发性脂肪酸的测定

参照龙黎明等^[17]的方法,采用毛细管气相色谱法测定小鼠粪样中 VFA 的浓度。色谱条件为:柱温 110℃,汽化温度 180℃,采用氢离子火焰检测器,检测温度 180℃,载气为氮气,压力为 0.06 MPa,氢气和氧气压力均为 0.05 MPa,灵敏度(档)为 10^{-1} ,衰减 3.0。

1.5 血清生化指标测定

所采集血液置于 4℃ 下静置 3 h, 2500 × g 离心 15 min, 吸取上清液, 采用奥林巴斯 AU400 全自动生化分析仪检测血清中甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的含量。

1.6 肝脏组织 RNA 提取与基因表达分析

取 1 g 肝脏组织样于灭酶研钵中, 加入液氮研磨成粉状, 转移至 1.5 mL 灭酶离心管中, 添加 1 mL Trizol, 加氯仿, 离心, 取上清, 加异丙醇, 混匀, 离心弃上清, 加 75% 乙醇冲洗 2 次, 最后加 RNase-free 水溶解, Nanodrop 1000 分光光度计测定总 RNA 浓度。参照反转录试剂盒 (Takara) 说明进行 RNA 反转录。

Real-time PCR 方法同上, 对甘油三酯水解酶 (TGH)、激素敏感脂酶 (HSL)、固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)、脂肪酸合成酶 (FAS) 基因的相对表达进行分析^[18] (表 2)。以 β -actin (肌动蛋白) 作为内参基因, $2^{-\Delta Ct}$ 法计算所测基因的相对表达水平。

表 2. 脂肪代谢相关基因 real-time PCR 引物序列与退火温度

of expression of fat associated genes		
genes	primer sequences (5'→3')	$T_m / ^\circ\text{C}$
<i>mcrA</i>	F: TTCGGTGGATCDCARAGRGC R: GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	60.0
<i>aprA</i>	F: CCAGGGCCTGTCCGCCATCAATAC R: CCGGGCCGTAACCGTCTTGA A	60.0
β -actin	F: ACTGCCGCATCCTCTTCTC R: CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	53.8
<i>FAS</i>	F: AGTGTCCACCAACAAGCG R: GATGCCGTCAGTTTCAG	55.9
<i>SREBP-1c</i>	F: CTGGAGACATCGCAAACAAGC R: ATGCTAGACAACAGCCGCATC	59.7
<i>PPARγ</i>	F: ACCACTCGCATTCCTTTGAC R: CCACAGACTCGGCACTCAAT	52.1
<i>HLS</i>	F: GGAGCACTACAACGCAAC R: TCCCGTAGCTCATAGGAGAT	57.9
<i>TGH</i>	F: CTTGGCTCCTTGAGATTTG R: AGTTGGCAATGTTCTCCTG	53.3

1.7 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件的双因素方差分析程序对小鼠相对增重、盲肠菌群数量、粪样挥发性脂肪酸比例及肝脏脂肪相关基因表达水平进行显著性检验, 置信区间为 95%。

2 结果和分析

2.1 小鼠相对增重

由图 1 可见, 试验期间, 低脂日粮组小鼠相对增重最高; 第 1 周高脂日粮处理和 BCM 处理均显著降低了小鼠的相对增重 ($P < 0.05$); 第 2 至第 4 周, BCM 和高脂日粮处理均未显著影响小鼠增重; 第 5 周, 高脂日粮处理对小鼠相对增重无影响, 而 BCM 处理显著降低了小鼠相对体增重 ($P < 0.05$)。

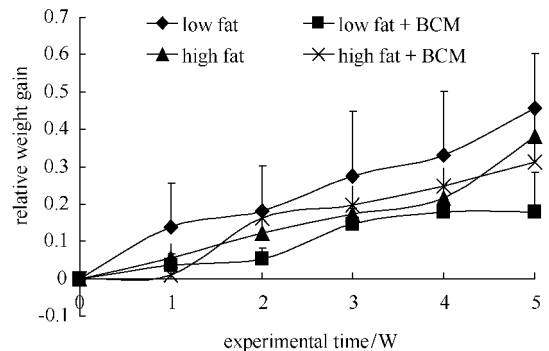


图 1. 小鼠随时间相对增重

Figure 1. The relative weight gain of mice over time ($n = 8$).

2.2 小鼠盲肠中菌群组成

总菌、产甲烷菌和硫还原菌定量结果 (图 2) 显示, 4 个处理组间总菌、硫还原菌和产甲烷菌数量

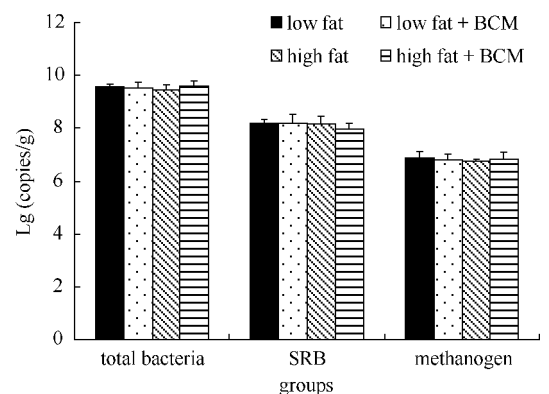


图 2. 小鼠盲肠中总细菌、硫还原菌和产甲烷菌数量

Figure 2. The numbers of total bacteria, sulfate reducing bacteria (SRB) and methanogens in the cecum of the mice ($n = 8$).

差异均不显著,且硫还原菌较产甲烷菌在数量上占有优势。对小鼠盲肠总菌 DGGE 图谱进行相似性分析表明(图 3),低脂日粮组样品和高脂日粮组样

品聚于不同簇,饲喂低脂日粮小鼠样品聚于一簇,并且相似性高于 60%,而 BCM 处理未使不同组样品一致聚类。

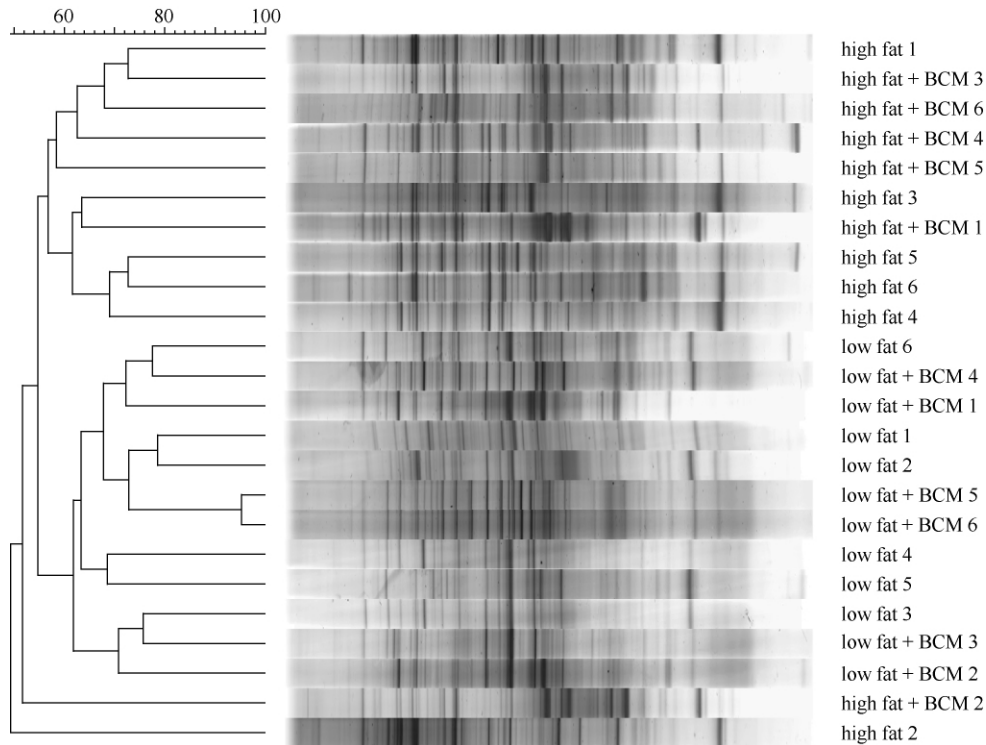


图 3. 小鼠盲肠中细菌 DGGE 图谱相似性聚类图

Figure 3. Clustering of similarity of DGGE profiles of bacteria from cecal digesta of the mice ($n = 6$).

2.3 小鼠粪样中挥发性脂肪酸组成

由表 3 可见,高脂日粮处理显著影响了小鼠粪样中的乙酸和丁酸比例,而 BCM 处理显著影响丙酸和丁

酸比例($P < 0.05$);与对照日粮组相比,高脂日粮组小鼠粪样乙酸比例显著下降,丁酸比例显著上升($P < 0.05$);BCM 处理显著增加了丙酸比例($P < 0.05$)。

表 3. 小鼠粪样中各挥发性脂肪酸比例(%)

Table 3. The proportion (%) of each VFA in feces of the mice ($n = 8$)

groups		acetate	propionate	isobutyrate	butyrate	isovalerate	valerate
low fat	control	54.51	12.69	9.51	13.64	6.55	2.75
	BCM	56.84	13.85	9.12	15.39	4.24	0.85
high fat	control	36.80	11.45	11.19	36.79	3.72	0.64
	BCM	39.55	21.92	16.73	15.16	5.16	1.25
SEM		13.62	5.73	6.98	12.71	3.25	2.35
effect (P value)	fat	0.001	0.067	0.114	0.008	0.488	0.404
	BCM	0.591	0.004	0.366	0.019	0.761	0.539
	fat \times BCM	0.965	0.016	0.303	0.007	0.186	0.230

2.4 小鼠血清中脂肪代谢相关指标

由表 4 可见,与低脂对照日粮组相比,高脂日粮处理组小鼠血清 HDL-C、LDL-C 和总胆固醇含量均

有极显著升高($P < 0.01$),而甘油三酯含量无显著变化;BCM 处理对小鼠血清各项指标影响均不显著($P > 0.05$)。

表 4. 小鼠血清相关指标浓度 (mmol/L)

groups		TC	HDL-C	LDL-C	TG
low fat	control	1.142	2.233	0.300	2.933
	BCM	1.122	2.19	0.298	2.876
high fat	control	1.105	3.203	0.557	4.133
	BCM	1.457	3.087	0.462	3.942
SEM		0.366	0.600	0.187	0.698
	fat	0.334	0.000	0.005	0.000
effect (P value)	BCM	0.283	0.630	0.478	0.483
	fat \times BCM	0.231	0.825	0.496	0.703

TC, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol; TG, triglyceride.

2.5 小鼠肝脏脂肪代谢相关基因的表达

由表 5 可见, 高脂肪日粮处理上调了 *TGH* 基因的表达 ($P < 0.05$), 对 *HSL*、*SREBP-1c*、*PPAR γ* 和 *FAS* 基因表达无显著影响; BCM 处理对 *TGH*、*HSL*、*SREBP-1c* 和 *FAS* 基因的表达有影响趋势 ($P < 0.10$)。

表 5. 肝脏脂肪代谢相关基因表达

groups		<i>TGH</i>	<i>HSL</i>	<i>SREBP-1c</i>	<i>PPARγ</i>	<i>FAS</i>
low fat	control	0.042	0.003	0.013	0.011	0.029
	BCM	0.074	0.006	0.035	0.016	0.057
high fat	Control	0.079	0.005	0.020	0.015	0.038
	BCM	0.094	0.010	0.098	0.020	0.104
SEM		0.032	0.005	0.059	0.009	0.062
	fat	0.037	0.172	0.155	0.368	0.305
effect (P value)	BCM	0.081	0.052	0.050	0.270	0.096
	fat \times BCM	0.502	0.483	0.256	0.929	0.483

3 讨论

本研究以小鼠作为动物模型, 通过口服产甲烷菌抑制剂 BCM, 研究抑制肠道产甲烷菌对采食高、低脂肪日粮小鼠肠道微生物和代谢的影响。研究发现, BCM 处理除了对小鼠粪样的挥发性脂肪酸组成有影响, 对其他指标无显著作用。有研究报道, 灌注 BCM 可抑制反刍动物瘤胃中的甲烷菌数量及甲烷产量, 但对瘤胃细菌发酵无显著影响^[8-9]。在单胃动物方面, 罗玉衡 (2012) 首次在大鼠上进行了研究^[10], 发现 BCM 可抑制肠道产甲烷菌数量并且影响大鼠脂肪代谢。这与本研究结果不一致, 其原因可能与本研究中小鼠肠道中产甲烷菌的数量偏低有关, 在正常反刍动物瘤胃和大鼠肠道中产甲烷菌达

到每克食糜 $10^{8.5}$ 个^[9-10], 但本研究中小鼠产甲烷菌的数量仅约为 10^7 。本研究还发现, 小鼠消化道中另一种氢利用菌—硫还原菌的数量显著高于产甲烷菌, 说明产甲烷菌通过氢转移作用对其他菌群代谢影响相对较小。同时, 在本研究设定的高低脂肪 (能量) 水平日粮下未发现 BCM 处理的差异, 这可能与所设两个日粮为标准能量及高能量有关, 根据罗玉衡的研究结果 BCM 可促进大鼠增重和脂肪沉积推测, 如动物采食低于标准能量的日粮, BCM 处理更有可能显示对动物机体脂肪代谢的影响。尽管本研究中 DGGE 和 real-time PCR 分析结果显示, BCM 未影响小鼠肠道菌群, 但是在 VFA 组成方面却有作用, 这可能是因为 DGGE 和 real-time PCR 均只能分析肠道微生物中的优势菌群。除了上述原因外, 可能还与本研究主要分析试验末期的样本有关, 报道表明, BCM 的抑制产甲烷菌的作用只是短暂的, 一定时间后肠道菌群会对其产生耐受力^[19]。

日粮除了影响动物生长代谢, 也是影响动物消化道菌群及其代谢的重要因素, 高脂肪日粮可以改变小鼠肠道菌群多样性, 显著性增加厚壁菌门和变形菌门的数量, 减少拟杆菌门的数量^[11-12]。虽然本研究中各处理组在总菌、硫还原菌和产甲烷数量上无显著差异, 但 DGGE 分析结果显示, 采食高、低脂肪日粮的小鼠样品聚于不同簇, 这提示高脂肪日粮改变了小鼠的肠道菌群, 并进而影响了微生物的代谢产物—VFA 的组成。摄入高脂肪日粮的小鼠, 粪样中乙酸比例显著降低、丁酸比例显著升高, 该结果与前人报道一致^[20], 这可能是由于肠道内脂肪氧化增加, 生成的乙酸向丁酸的转化比较活跃, 导致丁酸含量显著升高^[21]。

本研究中, 饲喂高脂肪日粮并未显著增加小鼠体增重, 这与早前的报道不一致, 推测可能原因是所用小鼠处于刚断奶阶段, 并未完全适应高脂日粮, 然而, 从小鼠血清生化指标可见, HDL-C、LDL-C 和总胆固醇含量均显著升高, 这与相关报道一致^[11]。饲喂高脂肪日粮小鼠肝脏组织中, 甘油三酯水解酶基因的表达显著升高。TGH 最先发现于肝脏微粒体中, Soni 等^[22] 研究发现, TGH 在小鼠脂肪细胞中发挥脂解作用, 当小鼠摄入的能量多于消耗的能量时, 能量便以甘油三酯的形式储存在脂肪组织中, 而当机体需要能量时, 储存在脂肪组织的甘油三酯在 TGH 作用下分解为游离脂肪酸和甘油, 过多的脂肪

摄入促进了甘油三脂的积累和代谢过程,因此高脂肪日粮与 TGH 的活跃表达存在必然联系。本研究中,BCM 处理显著增加了 *SREBP-1c* 基因的表达,而 *SREBP-1c* 可以促进脂肪酸合成酶等脂质合成相关基因的表达^[23]、增加肝细胞生成过程对胰岛素和葡萄糖作用的响应^[24]。BCM 处理未显著改变血液指标,其原因有待进一步研究。

综上所述,高、低脂肪日粮可明显改变小鼠肠道菌群结构以及脂肪代谢,但是 BCM 处理影响较小。关于 BCM 的作用机理和最佳使用方案需要在后续研究中进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Monteny GJ, Groenestein CM, Hilhorst MA. Interactions and coupling between emissions of methane and nitrous oxide from animal husbandry. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2001, 60: 123-132.
- [2] Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D. Obesity associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity*, 2012, 36(6): 817-825.
- [3] Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7125.
- [4] Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(26): 10011-10016.
- [5] Luo Y, Su Y, Wright ADG, Zhang LL, Smidt H, Zhu WY. Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs. *Archaea*, 2012: 605289.
- [6] Wood JM, Kennedy FS, Wolfe RS. The reaction of multihalogenated hydrocarbons with free and bound reduced vitamin B12. *Biochemistry*, 1968, 7(5): 1707-1713.
- [7] Chalupa W. Manipulating rumen fermentation. *Journal of Animal Science*, 1977, 45(3): 585-599.
- [8] Tomkins NW, Hunter RA. Methane reduction in beef cattle using a novel antimethanogen. *The Australian Society of Animal Production*, 2004, 25: 329.
- [9] Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS. Quantitation and diversity analysis of ruminal, methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(3): 313-322.
- [10] 罗玉衡. 甲烷菌抑制剂对 SD 大鼠脂肪代谢的影响. 南京农业大学博士论文, 2011.
- [11] Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1716-1724.
- [12] Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47713.
- [13] Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [14] Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(19): 5636-5643.
- [15] Suzuki MT, Beja O, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4605-4614.
- [16] Ben-Dov E, Brenner A, Kushmaro A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial Ecology*, 2007, 54(3): 439-451.
- [17] Long L, Mao S, Su Y, Zhu W. Isolation and *in vitro* metabolic characterization of a lactate-utilizing bacterium from goat rumen. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1571-1577. (in Chinese)
龙黎明,毛胜勇,苏勇. 一株瘤胃源乳酸利用菌的分离鉴定及其体外代谢特性. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1571-1577.
- [18] Jiang DF, Zhang XG, Yang HL, Sun C. Differential expression of lipid metabolism genes in the liver and adipose tissue of mice treated with evodiamine. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(2): 1501-1510.
- [19] Guo Y, Hu L, Liu J. Methanogens and manipulation of

methane production in rumen. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (1) : 144-148. (in Chinese)

郭燕秋, 胡伟莲, 刘建新. 瘤胃甲烷菌及甲烷生成的调控. *微生物学报*, 2005, 45 (1) : 144-148.

[20] Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, Clarke SF, O'Toole PW, Quigley EM, Stanton C, Ross PR, O'Doherty RM, Shanahan F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 2010, 59 (12) : 1635-1642.

[21] Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Function food science and

gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 1998, 80: S147-S171.

[22] Soni KG, Lehner R, Metalnikov P, O'Donnell P. Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (39) : 40683-40689.

[23] Weickert MO, Piferiffer AFH. Signalling mechanism linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*, 2006, 49 (8) : 1732-1741.

[24] Dridi S, Buyse J, Decuyper E, Taouis M. Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005, 29 (4) : 646-660.

Influences of high-fat diet and methanogens inhibitor on the cecal microbiota and fat metabolism in C57BL/6J mice

Li Ma, Xinyi Zhang, Chengcheng Ba, Mingwei Gao, Yong Su^{*}, Weiyun Zhu

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim of the study was to investigate the influences of high-fat diet and methanogens inhibitor (bromochloromethane, BCM) on the gut microbiota and fat metabolism in mice. [Methods] Thirty two female C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups: fed respectively by Low-fat diet, Low-fat diet + BCM, High-fat diet and High-fat diet + BCM. BCM was administrated through drinking water for six weeks. The body weight of mice was recorded every week. At the end of experiment, the blood was collected for serum biochemical analysis. Bacterial communities in cecal digesta were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real-time PCR. VFA (volatile fatty acid) concentrations in feces were determined by gas chromatography. Expressions of fat-related genes in liver were analyzed using real-time PCR. [Results] DGGE analysis shows that samples from mice fed with high-fat diet gathered together, and separated with samples from low-fat diet group. However, both the fat level in diet and BCM treatment had no effect on the numbers of total bacteria, sulfate reducing bacteria and methanogens. The acetate proportion in feces was significantly decreased ($P < 0.05$) when fed high-fat diet to mice ($P < 0.05$). BCM treatment significantly increased the propionate proportion ($P < 0.05$). High-fat diet also significantly increased the levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and total cholesterol (TG) in blood ($P < 0.05$). High-fat diet up-regulated the expression of *TGH* gene ($P < 0.05$). [Conclusion] High-fat diet affected cecal microbiota and fat metabolism of mice, whereas BCM treatment had little effect.

Keywords: bromochloromethane, high fat diet, gut microbiota, fat metabolism

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (121030735)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: yong.su@njau.edu.cn

Received: 4 July 2013/Revised: 4 October 2013