

研究报告

二氢杨梅素对抗生素应激小鼠血清抗氧化性和肠道微生物多样性的影响

张路千, 方晨昊, 余知和, 王允*

长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

张路千, 方晨昊, 余知和, 王允. 二氢杨梅素对抗生素应激小鼠血清抗氧化性和肠道微生物多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1179-1194.

ZHANG Luqian, FANG Chenhao, YU Zhihe, WANG Yun. Effects of dihydromyricetin on serum antioxidation capacity and intestinal microbial diversity in antibiotic stressed mice[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1179-1194.

摘要:【背景】二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)是一类存在于藤茶中的主要黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎等功能, 其药用价值受到广泛关注, 但其在生物体内的生物活性及肠道中的分解代谢机制尚不清楚。【目的】探究二氢杨梅素对抗生素应激下小鼠的血清抗氧化性和肠道微生物多样性的影响。【方法】将小鼠分为对照组、抗生素组、抗生素+二氢杨梅素组, 检测各组小鼠血清中的抗氧化指标, 利用高通量测序分析组间肠道微生物多样性的差异, 通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)验证特定菌群组间的相对丰度差异。【结果】二氢杨梅素显著提高了抗生素应激小鼠血清中过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活性($P<0.05$), 显著降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量($P<0.05$), 催化一氧化氮(nitric oxide, NO)的合成显著提高了小鼠的总抗氧化能力。二氢杨梅素处理组相较抗生素应激组组间肠道微生物组成种类与结构有明显差异。二氢杨梅素可通过调节厚壁菌门(*Firmicutes*)与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的丰度比例, 促进乳杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)等细菌增殖, 抑制肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌的增殖, 改善小鼠肠道菌群组成, 使小鼠肠道中乳杆菌属、梭菌属等与肠道分解代谢相关的有益菌群相对丰度增加。【结论】二氢杨梅素能够改变肠道菌群结构, 一些益生菌大量参与其代谢过程, 产生有益代谢产物, 提高机体的抗氧化能力并维持肠道健康, 改善抗生素对小鼠肠道产生的负面影响。该结果为二氢杨梅素的功能和分解代谢机制研究提供理论基础。

关键词: 二氢杨梅素; 抗生素; 抗氧化活性; 肠道微生物; 高通量测序

资助项目: 国家自然科学基金青年基金(31601679)

This work was supported by the Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (31601679).

*Corresponding author. E-mail: 1wangyun@yangtzeu.edu.cn

Received: 2022-10-06; Accepted: 2022-11-13; Published online: 2022-12-15

Effects of dihydromyricetin on serum antioxidation capacity and intestinal microbial diversity in antibiotic stressed mice

ZHANG Luqian, FANG Chenhao, YU Zhihe, WANG Yun *

College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China

Abstract: [Background] Dihydromyricetin (DMY) is a major flavonoid compound in Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*), which has antioxidant, anti-inflammatory, and other effects. Its medicinal value has attracted extensive attention, but its biological activity *in vivo* and catabolic mechanism in intestine are still unclear. [Objective] To explore the effects of dihydromyricetin on serum antioxidant capacity and intestinal microbial diversity of mice under antibiotic stress. [Methods] The experimental mice were divided into a control group, an antibiotic group, and an antibiotic+dihydromyricetin group. The antioxidant indexes in the serum of mice in each group were detected. The differences of intestinal microbial diversity between groups were analyzed by high-throughput sequencing. The relative abundance differences between specific bacterial groups were verified by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). [Results] Dihydromyricetin significantly increased the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) in the serum of antibiotic stressed mice ($P<0.05$), significantly decreased the content of malondialdehyde (MDA) ($P<0.05$), catalyzed the synthesis of nitric oxide (NO), and significantly increased the total antioxidant capacity of mice. There were significant differences in the composition and structure of intestinal microorganisms between the antibiotic+dihydromyricetin group and the antibiotic group. Dihydromyricetin improved the composition of intestinal flora in mice by regulating the abundance ratio of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, promoting the proliferation of bacteria such as *Lactobacillus* and *Clostridium*, and inhibiting the proliferation of *Enterobacteriaceae*, so as to increase the relative abundance of beneficial bacteria related to intestinal catabolism such as *Lactobacillus* and *Clostridium* in the intestinal tract of mice. [Conclusion] Dihydromyricetin can change the structure of intestinal flora. Some probiotics are heavily involved in its metabolic process and produce beneficial metabolites to improve the antioxidant capacity of the body and maintain intestinal health. Negative effects of antibiotics on the intestinal tract of mice are thus reduced. These findings provide a theoretical basis for the study of the function and catabolic mechanism of dihydromyricetin.

Keywords: dihydromyricetin; antibiotic; antioxidant activity; intestinal microflora; high-throughput sequencing

多酚是一种广泛存在于茶叶、水果和蔬菜等植物性食物中且具有大量酚羟基结构的植物次生代谢物^[1]。其大致可分为三大类:类黄酮物质、酚酸类和芪类物质^[2]。其中类黄酮可进一步将类黄酮分为黄酮类、异黄酮类、黄酮醇类、黄烷醇

类、黄烷醇类、花色苷混合物等几大亚类^[3]。二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY), 又名蛇葡萄素(ampelopsin, AMP)是一种具有高黄酮成分的黄酮类化合物^[4]。近年来, 随着对多酚的深入研究, 学者们发现植物多酚具有抗氧化、抗肿瘤、

预防心脑血管等疾病的功能,也可以通过调节人体肠道菌群对健康产生积极影响^[5-7]。

人体或动物机体抗氧化性简称抗氧化自由基。科学研究表明,癌症、衰老等病态都与过量的氧化自由基产生有关^[8]。在对植物中多酚类物质的药理研究中发现,多酚可以通过清除体内的自由基,防止脂质过氧化、提高细胞内抗氧化酶的表达来提高机体的抗氧化活性^[9]。肠道微生物有利于促进肠道免疫反应发生,并产生代谢产物,参与正常宿主生理的调控^[10]。通过大量的人群和动物研究显示,不健康的饮食和生活习惯将引起肠道菌群的紊乱^[11]。抗生素作为一种杀菌或抑菌药物,在抑菌消炎的过程中也会对机体带来一定程度的副作用。有关研究表明,长期服用抗生素不仅会导致脂代谢紊乱和肥胖等疾病,也会显著改变肠道菌群的结构和功能,通过使肠道菌群的定殖抗性丧失,导致共生菌丰度大大下降,病原菌无规律地生长,最终引起肠道菌群的紊乱^[12-14]。通过膳食和药物等外界因素可以调节肠道菌群及其微环境的平衡,其中,膳食多酚可以通过刺激有益微生物群的生长并减少有害菌的定殖来调节肠道菌群,维持肠道健康^[15]。

肠道的另一个重要功能在于机体对外界摄取营养物质的消化吸收,但介于肠道对黄酮类物质的不完全吸收和快速排泄导致在血清中很难检测到黄酮类物质的存在,从而很难证明黄酮类物质作为微生态制剂的药用价值。近年来,有关研究证明肠道微生物在对类黄酮物质的降解中发挥了重要作用^[16]。摄入类黄酮物质后,在宿主本身肠道微生物作用下打开其糖苷键分解成杂环物质,进而又被肠道微生物进一步降解成较小的酚类化合物,继而被肠道吸收,这些类黄酮物质的酚类代谢物很容易被肠道吸收进入血液,并在心血管疾病中起到预防和治疗效果^[17]。肠道微生物对摄入营养物质的分解代谢作用具有重要意义。

本试验以抗生素应激小鼠为模型^[18],研究二氢杨梅素对小鼠血清抗氧化性和肠道微生物多样性的影响,探究二氢杨梅素与肠道菌群的相互作用关系,以期阐明二氢杨梅素的功能和各种疾病的治疗方法提供依据,为肠道微生物对二氢杨梅素分解代谢的作用研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

土霉素、红霉素、头孢羟氨苄, Macklin 公司; 二氢杨梅素, 上海源叶生物科技有限公司; 血清总蛋白试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)试剂盒、总抗氧化活性(total antioxidant capacity, T-AOC)试剂盒、总一氧化氮合酶(total nitric oxide synthase, T-NOS)试剂盒和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 柱式粪便 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit), Qiagen 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒, TaKaRa 生物技术有限公司; DNA 引物, 苏州金唯智生物科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯。30 只昆明(KM)雄性小鼠, 体重(20±2) g, 由广东省动物实验中心提供(伦理批件号: 长江大学医学部伦理委员会, 2022120043)。

优普系列超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司; 电子分析天平, 梅特勒托利多科技有限公司; 高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 伯乐公司。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物分组及给药

试验于 2021 年 9 月在湖北省长江大学生命

科学院进行。30 只[(20±2) g]体质与健康情况相近的 KM 雄性小鼠, 于温度(24±1) °C、湿度 45%–55%的条件下适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为对照组(N)、抗生素组(A)、抗生素+黄酮组(AF), 每组 10 只, 标记后称重并记录初始体重, 试验期间间隔 4 d 记录 1 次小鼠的体重变化, 每日上午 9 点以灌胃方式给药。首先 AF 组每天给予二氢杨梅素 500 mg/kg 灌胃, N、A 两组每天给予正常去离子水 500 mg/kg 灌胃, 持续 3 周。第 4 周开始, 除了按上述剂量每天用二氢杨梅素给 AF 组灌胃外, 还需每天额外给予 A、AF 组头孢羟氨苄 100 mg/kg、土霉素 300 mg/kg、红霉素 300 mg/kg 的混合抗生素灌胃构建抗生素应激小鼠模型, N 组每天给予正常去离子水 500 mg/kg 灌胃作为对照, 直至试验周期结束, 共 5 周。

1.2.2 样品采集

试验结束后摘除小鼠眼球, 从左右眼眶处采取小鼠原血, 加入 1.5 mL 离心管中, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 分离血清编号备用。采用颈椎脱臼处死小鼠, 解剖取盲肠内容物, 立即放置于冰上的 5 mL 离心管中, 液氮速冻或-80 °C冰箱储藏。

1.2.3 抗氧化指标测定

按照各试剂盒测定小鼠血清总蛋白、MDA 含量, T-AOC、CAT、T-SOD、GSH-Px、T-NOS 和

iNOS 活性, 并按照各试剂盒公式计算指标值。

1.2.4 高通量测序

取每组 4 只小鼠的盲肠内容物交派森诺生物科技有限公司进行肠道菌群测序及分析。流程如下: 提取样本细菌总 DNA, 用 barcode 特异性引物扩增 16S rRNA 基因的 V3–V4 区构建测序文库, 引物为 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3')。利用 Illumina MiSeq 测序平台进行高通量测序, 每组做 4 次重复。

1.2.5 特定肠道菌群的实时荧光定量 PCR

使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取试验结束后的 A 和 AF 组小鼠盲肠内容物中的细菌基因组 DNA。根据特定肠道菌群 16S rRNA 基因序列, 应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 引物(表 1)。反应体系 (20 μL): 2×SYBR Mixture 10 μL, 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。反应条件: 50 °C 5 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 各引物最适退火温度[乳杆菌属(*Lactobacillus*) 58 °C、梭菌属(*Clostridium*) 55 °C、肠球菌属(*Enterococcus*) 60 °C、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*) 54 °C] 30 s, 72 °C 30 s, 读取定量荧光数据, 共 40 个循环。

表 1 特定菌群 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR of specific bacterial populations

Target bacteria	Primer sequence (5'→3')	Sequence length (bp)
<i>Lactobacillus</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	341
<i>Clostridium</i>	F: CCCACAACCTCAAACCTCCTGTAT R: TGCTCCTCACTGATTCACACAGA	260
<i>Enterococcus</i>	F: CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT R: ACTCGTTCTACTTCCCATTGT	144
<i>Enterobacteriaceae</i>	F: GGAGCAAACAGGATTAGATACCC R: AACCCAACATTTACAAACACG	317
All bacteria	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	200

1.2.6 数据处理

实验数据应用 SPSS 12.0 统计学软件分析, 采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 多组之间差异比较采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 其中组间两两比较, 方差齐的采用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)检验, 方差不齐的采用塔姆黑尼(Tamhane's T2)检验。检验水准为 0.05, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。肠道微生物菌群利用 QIIME 软件进行分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)划分及分类地位鉴定, 利用 R 软件进行分类学组成分析, 利用线性判别分析工具(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)对差异组间进行分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠生理及体重变化

适应性喂养阶段至试验第 4 周, 各组小鼠每天稳定进食且保持活跃状态, 粪便黑硬。试验第 5 周至试验周期结束期间, A 组小鼠出现厌食、懒动、嗜睡等症状, 粪便呈米黄色、湿润。AF 组小鼠相较于 A 组小鼠仍保持相对活跃的状态, 少部分小鼠出现厌食的症状。N 组小鼠无明显变化。适应性喂养后的小鼠生长发育情况趋于稳定, 体重指数能够反映小鼠的生理和发育状况。如图 1 所示, 小鼠从试验周期起始前 4 周, 3 组小鼠体重平均值均稳步上升; 从第 5 周至试验周期结束, 3 组小鼠体重平均值趋于稳定, 其中 A 组和 AF 组小鼠体重均值有略微下降的趋势, 可能与抗生素应激有关, 整个试验周期 3 组小鼠体重的变化趋势大致相似。

2.2 二氢杨梅素对小鼠血清抗氧化性的影响

血清总蛋白是反映肝脏合成功能的重要指标, 具有维持血液渗透压、运输多种代谢物、免疫作用、营养作用等功能。如图 2A 所示, AF

组小鼠相较于 N、A 两组血清总蛋白含量显著增多($P < 0.05$)。T-AOC 指机体的总抗氧化能力, 如图 2B 所示, A 组血清 T-AOC 活性显著低于 N 组($P < 0.05$), AF 组与 N 组、A 组相比较, 小鼠血清 T-AOC 活性显著升高($P < 0.05$)。

CAT、SOD、GSH-Px 是生物体内重要的抗氧化防御酶, 如图 2C-2E 所示, AF 组较 A 组小鼠血清 CAT 活性、T-SOD 活性和 GSH-Px 活性均有显著性增加($P < 0.05$)。MDA 是机体脂质氧化的最终产物, 如图 2F 所示, A 组小鼠血清中 MDA 含量显著高于 N 组($P < 0.05$); 而 AF 组 MDA 含量却显著低于 A 组($P < 0.05$), 但仍高于 N 组。

T-NOS 为总一氧化氮合酶, 其中 iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, 由机体组织、细胞受损刺激后诱导合成, iNOS 催化生成 NO 的速度远快于其他类型 NOS, 是 NO 大量生成的主要因素。机体内 NO 可与亲脂性的过氧化自由基(LOO \cdot)反应生成 LOONO, 阻止了脂质的过氧化。根据图 2G 显示, 3 组试验组中 A 组小鼠血清 T-NOS 活力最高($P < 0.05$), AF 组能显著降低小鼠血清 T-NOS 活性, 与 A 组相比显著性下降($P < 0.05$)。iNOS 检测结果见图 2H, 可见 AF 组小鼠血清 iNOS 活性相较于 N、A 组极显著性增加($P < 0.01$)。

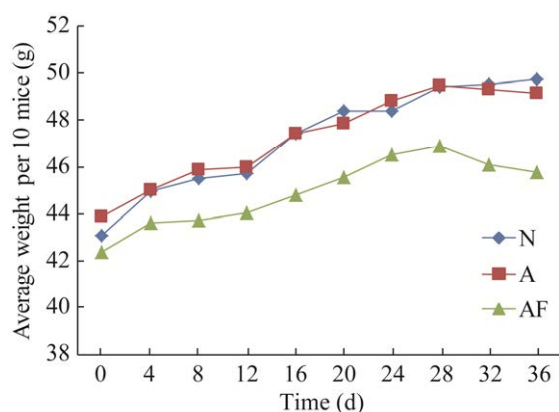


图 1 不同处理组小鼠平均体重变化

Figure 1 Changes of average body weight of mice in different treatment group.

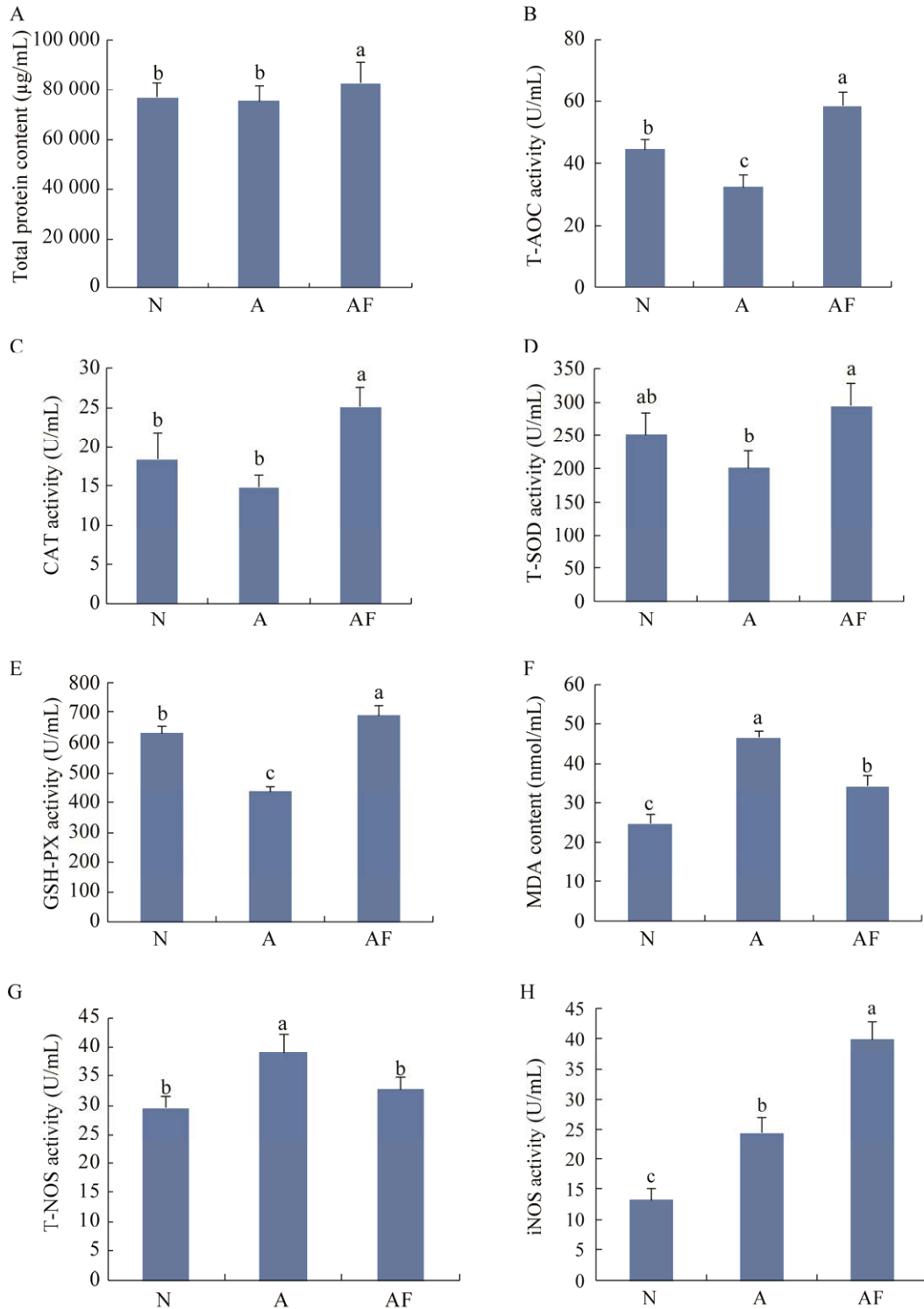


图2 二氢杨梅素对抗生素应激小鼠血清抗氧化性的影响 不同小写字母代表组间差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 Effects of dihydromyricetin on serum antioxidation in antibiotic stressed mice. Different lowercase letters represent significant differences between different groups ($P < 0.05$).

2.3 微生物多样性差异分析

试验选取了 N、A、AF 这 3 组小鼠盲肠内容物为样本进行高通量测序。所有样本(3 组, 每组 4 个, 共 12 个)的 DNA 片段在 Illumina MiSeq 平台测序获得原始序列。过滤和剔除疑问序列及低质量序列后共获得 1 088 561 个有效序列。在序列 97%相似性阈值的条件下对获得的有效序列进行合并和分类(即 OTU 归并划分)用于后续分析。

图 3 为小鼠肠道菌群 OTU 的 Venn 图, 呈现了各组分独有和共有的 OTU 数目。由图 3 可知, N、A、AF 组的独有 OTU 数分别为 2 591、206、98; A、AF 两组的共有 OTU 数为 315, 两样本各自独有 OTU 数目均占总体 OTU 数目很大比例, 说明两样本经过不同处理之后肠道菌群组成种类之间存在显著差异。

对于微生物群落, 有多种指数来反映其 α 多样性。常用的 α 多样性指数包含 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数, 其中 Chao1 和 ACE 指数侧重反映群落丰富度, Shannon 和 Simpson 指数则在反映群落丰富度的同时兼顾了群落均匀度。如表 2 所示, A、AF 两组样本相比 N 组样本, 4 种指数均显著降低, 而且 A 和 AF 两组样本无显著差异。

为探究不同样本间肠道菌群组成成分的差异性, 采用基于 UniFrac 距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)来反映不同样本间微生物群落的相似度。其中, UniFrac 距

离分为 unweighted 和 weighted 两组, 前者仅侧重于 OTU 种类不同而导致的样本差异, 后者则兼顾了群落间的系统发育关系和在各自样本中的丰度。如图 4A 所示, unweighted UniFrac 主坐标上第 1 主成分(PC1)在 50.05%的差异解释比上将 N 组与 A、AF 两组分开, 第 3 主成分(PC3)在 7.74%的差异解释比上将 A 组与 AF 组分开。如图 4B 所示, weighted UniFrac 主坐标上第 1 主成分(PC1)在 83.58%的差异解释比上将 N 组与 A、AF 两组分开, 第 3 主成分(PC3)在 3.89%的差异解释比上 A 组与 AF 组未完全分开。说明 N 组与 A、AF 两组样本间菌群组数和丰度存在显著性差异; A 组与 AF 组在菌群组成上存在显著差异, 菌群丰度也存在略微差异。

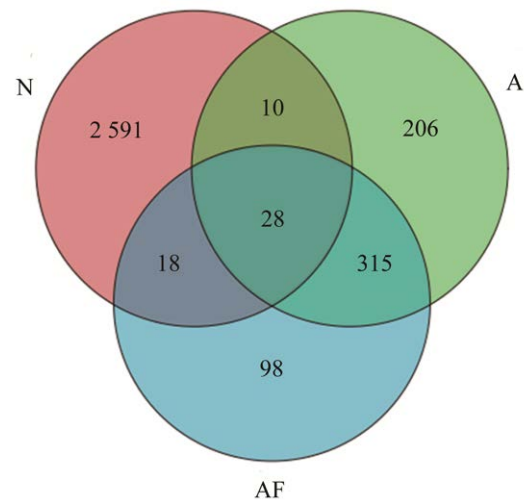


图 3 小鼠肠道菌群 OTU 的 Venn 图

Figure 3 Venn map of intestinal microflora in mice.

表 2 各处理组小鼠肠道微生物 α 多样性指数

Table 2 Alpha diversity indexes of intestinal microorganisms in each treatment group

Group	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index
N	1 362.44±230.00	1 412.16±245.54	7.71±0.77	0.97±0.24
A	333.75±32.44	346.72±35.63	3.70±0.45	0.74±0.14
AF	273.12±58.07	282.29±56.87	3.38±0.47	0.75±0.09

数据表示为平均数±标准差($n=4$)

The data are expressed as mean±standard deviation ($n=4$).

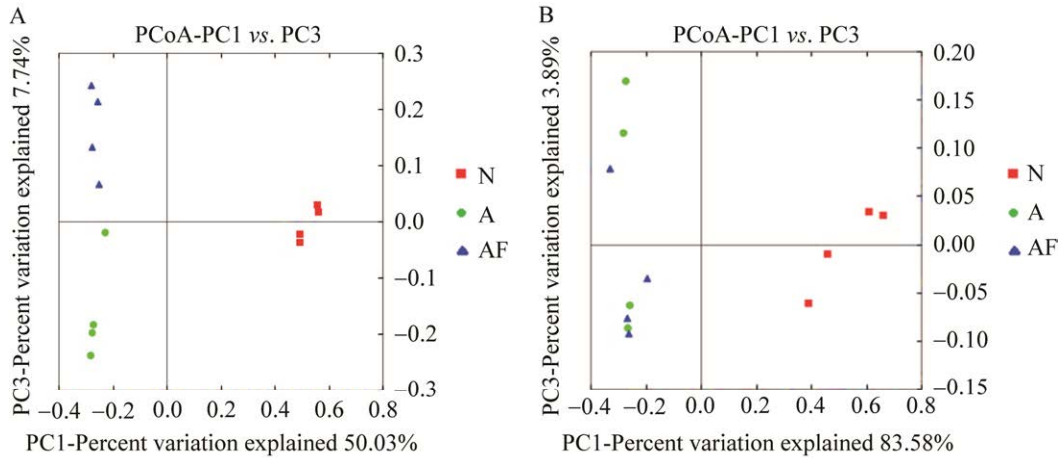


图 4 小鼠肠道菌群 unweighted UniFrac 距离(A)和 weighted UniFrac 距离(B)的主坐标分析

Figure 4 Principal coordinate analysis (PCoA) plots of unweighted UniFrac distance values (A) and weighted UniFrac distance values (B) of intestinal microflora in mice.

2.4 小鼠肠道微生物差异分析

如图 5A 所示,在门分类水平上,A、AF 两组相较于对照组菌群组成发生显著变化,放线菌门(*Actinobacteria*)、TM7 门、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)几乎消失,A 组和 AF 组间厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度比值也发生了变化。如图 5B 所示,在

科分类水平上,对照组微生物组成种类丰富且均一,而 A、AF 组相对单一,其中肠球菌科(*Enterococcaceae*)称为优势菌科,AF 组相较于 A 组在科水平下肠球菌科、梭菌科(*Clostridiaceae*)、莫拉菌科(*Moraxellaceae*)相对丰度显著上升,而肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)相对丰度则显著下降至几乎消失。

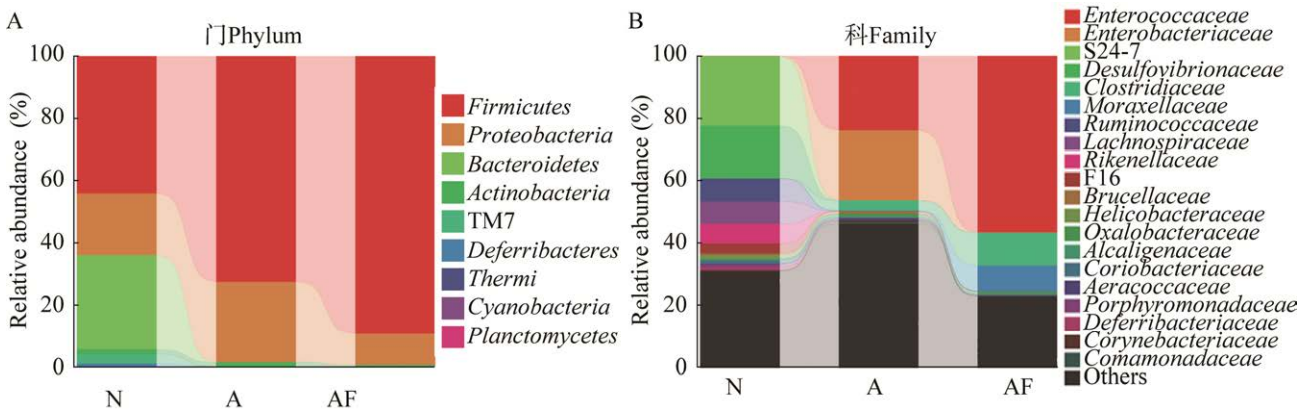
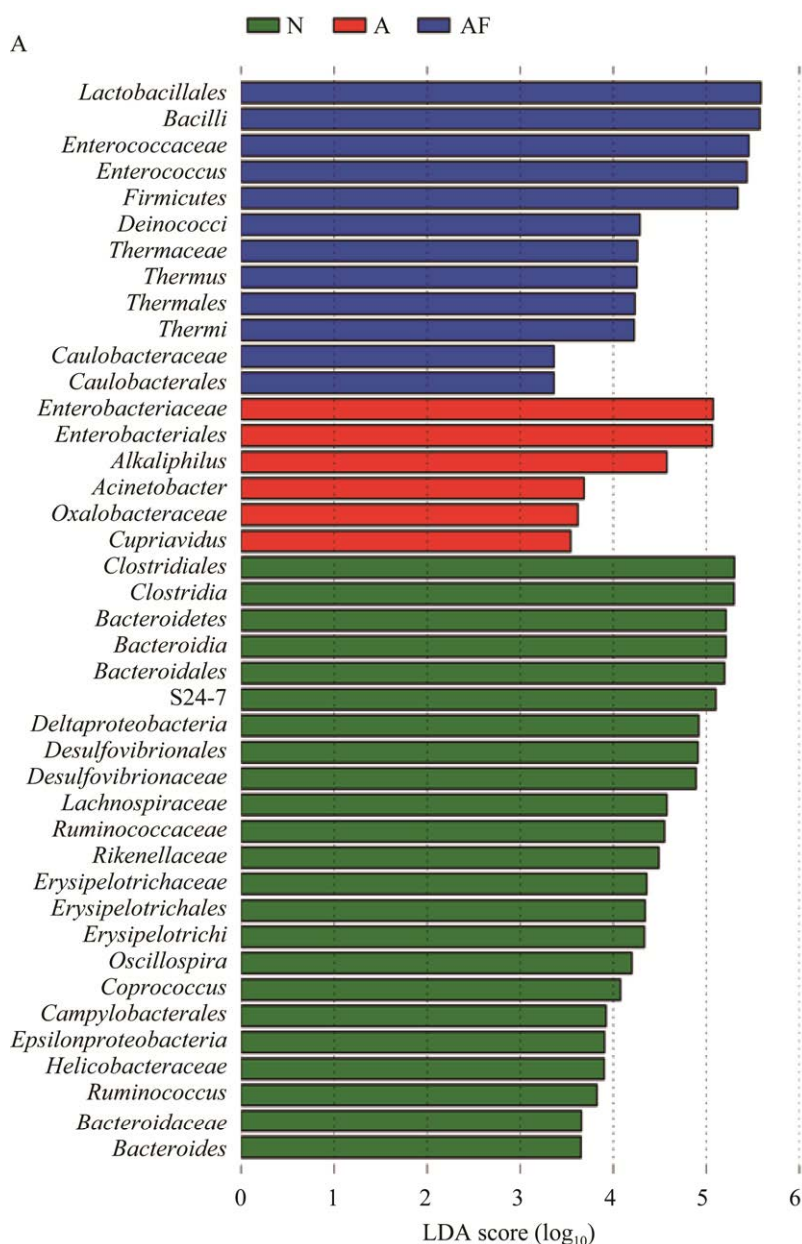


图 5 小鼠肠道微生物在门(A)和科(B)水平下微生物种类分布图

Figure 5 Microbial species distribution of mouse gut microbiota at the phylum (A) and family (B) level.

采用 LEfSe 分析工具对各组微生物菌群进行差异比较, 在此选择 $P < 0.05$ 和 $LDA > 5$ 的菌群进行展示和比较, 如图 6 所示, A 组小鼠与 N 组小鼠相比, 其肠道菌群中肠杆菌目 (*Enterobacteriales*)、肠杆菌科组间相对丰度有显著差异 ($LDA > 5$) 且明显增加, 而梭菌纲 (*Clostridia*)、梭菌目 (*Clostridiales*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)、拟杆菌

目 (*Bacteroidales*)、拟杆菌门 S24-7 菌科相对丰度差异显著 ($LDA > 5$) 且明显降低。AF 组小鼠与 A 组小鼠相比, 其乳杆菌目 (*Lactobacillales*)、杆菌纲 (*Bacilli*)、肠球菌科 (*Enterococcaceae*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 组间相对丰度有显著差异 ($LDA > 5$) 且明显增加, 肠杆菌目 (*Enterobacteriales*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 相对丰度差异显著 ($LDA > 5$) 且明显降低。



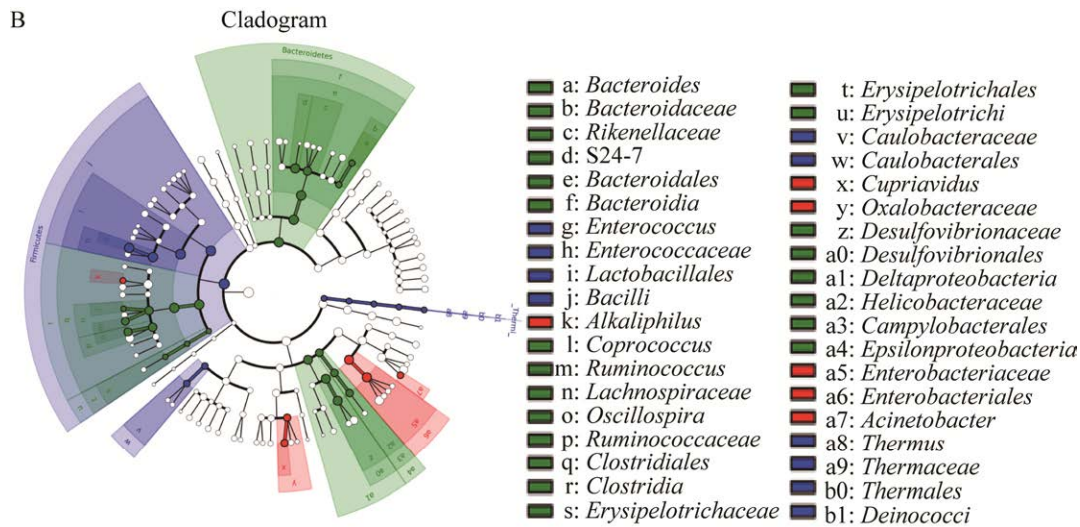


图 6 LEfSe 菌群组间差异分析图 A: 显示了 3 组中相对丰度具有显著差异的微生物分类单元物种, 其中柱状图的长度代表了该分类单元物种的差异影响大小(即 LDA 值), 条形图的不同颜色指示了该分类单元所对应的丰度较高的样本组. B: 将差异映射到已知层级结构的分类树上得到进化分支图, 在进化分支图中, 由内至外辐射的圆圈代表了由门至属的分类级别

Figure 6 Analysis of differences among bacterial groups based on LEfSe software. A: The microbial taxon species with significant differences in relative abundance among the three groups. The length of the histogram represents the magnitude of the difference in the taxon species (i.e. LDA value), and the different colors of the bar graph indicate the sample group with higher abundance corresponding to the taxon. B: The difference is mapped to a classification tree with known hierarchical structure to get the evolutionary branching diagram. In the evolutionary branching diagram, the circle radiating from inside to outside represents the classification level from phylum to genus.

2.5 特定菌群的微生物丰度差异分析

为探究二氢杨梅素的功能及与肠道菌群间的相互作用关系, 基于微生物差异分析结果, 在差异显著的菌群中选取了乳杆菌属、梭菌属、肠球菌属、肠杆菌科 4 种科属水平典型的典型益生菌群和条件致病菌群, 通过荧光定量 PCR 测定了其在 A、AF 两组样本中的相对丰度。结果如图 7 所示, 4 种微生物菌群的组间相对丰度均存在显著性差异($P < 0.05$), 其中 AF 组相较 A 组样本中乳杆菌属细菌丰度增加了 1.96 倍, 梭菌属细菌丰度增加了 2.22 倍, 肠球菌属细菌增加了 2.30 倍, 而肠杆菌科细菌丰度显著降低了 91.2%。该结果与基于 16S rRNA 基因测序结果基本一致。

3 讨论与结论

3.1 二氢杨梅素对抗生素应激小鼠生长发育和抗氧化活性的影响

二氢杨梅素是藤茶中主要的黄酮类物质, 具有广泛的药理活性。近年来研究表明, 其在抗氧化、抗炎等方面有显著效果, 在对病原微生物、预防心血管疾病、缓解疲劳等方面具有较大临床应用潜力, 而二氢杨梅素在机体中的药理特征和作用机制等问题还需进一步研究和确证。根据本试验结果, 3 组小鼠在前 4 周的体重变化趋势均稳步上升, 进食状态积极, 活跃好动; 第 4 周后抗生素组(A)和二氢杨梅素+抗生素组(AF)小鼠体重出现负增长现象, 其中抗生素组部分小鼠出

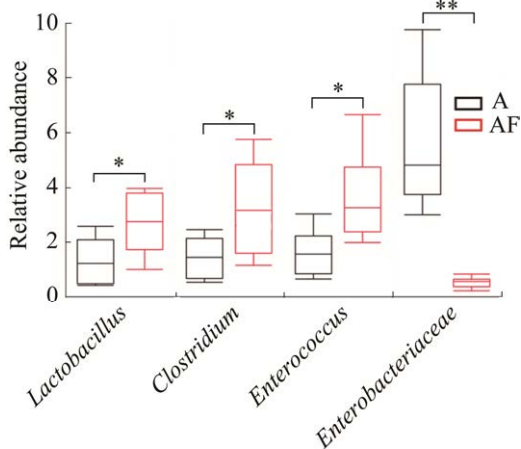


图 7 抗生素组和抗生素+二氢杨梅素组小鼠肠道特定菌群的组间相对丰度 结果以 16S rRNA 基因扩增 DNA 的 ΔCt 表示特定肠道菌群丰度, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算特定肠道菌群在各组间的相对丰度. 数据分析采用配对样本 t 检验, 数据以均值 \pm 标准差表示, *: $P < 0.05$ 表示差异显著, **: $P < 0.01$ 表示差异极显著

Figure 7 Relative abundance of specific intestinal microflora of mice in antibiotic group and antibiotic+dihydromyricetin group. Results: ΔCt of DNA amplified by 16S rRNA was used to express the abundance of specific intestinal flora, and the relative abundances of specific intestinal flora among the groups were calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The paired sample t test is used for data analysis, and the data are expressed in mean \pm standard deviation and *: $P < 0.05$ means significant difference, **: $P < 0.01$ means highly significant difference.

现厌食、嗜睡和懒动的症状, 而饲喂二氢杨梅素+抗生素组的小鼠依然能够保持一定的进食量和活跃状态。据报道长期大量服用抗生素对生长发育有影响, 长期服用抗生素使机体产生耐药性, 导致机体免疫功能低下, 更能破坏肠道微生物稳态, 影响机体的消化吸收^[19]。饲喂二氢杨梅素在一定程度上缓解了上述影响。

T-AOC 直接反映机体的总抗氧化能力, 是各种抗氧化物质和抗氧化酶构成的总抗氧化水

平, 其活性直观地体现了生物机体代谢活力与生命进程。CAT、SOD、GSH-Px 是生物体内重要的酶类抗氧化剂。CAT 可以分解机体内的 H_2O_2 ; SOD 能够清除体内多余的氧离子自由基, 以防止自由基对机体的损伤; GSH-Px 能催化 GSH 变为谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG), 还原有毒的过氧化物, 促进 H_2O_2 的分解, 保护机体细胞免受氧化损伤。本试验中, 抗生素组小鼠在经过 2 周抗生素灌胃处理后, 其总抗氧化能力(T-AOC)明显下降, 说明大量服用抗生素会影响机体抗氧化系统的运行, 如抗氧化酶的活性和非酶类抗氧化剂的合成, 进而导致过多的氧化自由基无法清除, 血液脂质过氧化水平升高, 引起病态的发生。然而使用二氢杨梅素能够显著提高血清中 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶活性, 并超过对照组水平, 并且在总体抗氧化水平上依然呈现该趋势。有关研究表明二氢杨梅素能通过提高 CAT 活性、抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成来减弱偶氮二异丁脒盐酸盐 (2,2'-azobis [2-methylpropionamide] dihydrochloride, AAPH) 引起的红细胞溶血和 $CuCl_2$ 诱导的血浆脂质过氧化水平^[20]。陈丽等^[21]研究发现, 藤茶中的二氢杨梅素和黄酮能使腹泻小鼠模型血清 SOD 活性和小鼠血清体外的抗活性氧单位提高。史宁等^[22]在研究二氢杨梅素对 $^{60}Co-\gamma$ 辐射小鼠氧化应激损伤的保护作用中也发现, 高剂量二氢杨梅素处理小鼠血清中 GSH-Px 活性显著升高。结合本试验说明小鼠在摄入二氢杨梅素一段时间后, 能够通过提高酶类抗氧化剂活性来降低抗生素带来的负面影响, 增强血清抗氧化能力。

非酶类抗氧化剂主要有维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽、一氧化氮等, 其中一氧化氮是生物体内重要的信使分子, 参与多种生理和病理过程, 如清除自由基、调节血管张力防止动脉硬化、消除血管炎症等, 在肠道系统中具有保护胃黏膜的

作用^[23-24]。本试验中,小鼠在抗生素应激条件下,血清中的一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性增强,伴随的炎症损伤或病理状态诱导 iNOS 产生大量的 NO,在二氢杨梅素的干预下,小鼠血清 iNOS 活性继续攀升,快速生成大量 NO 来参与氧化应激,降低抗生素应激的负面影响。但 NO 局部浓度过高会产生细胞毒性,造成细胞损伤,二氢杨梅素抑制其他类型 NOS 活性,防止持续的 NO 输出,将总一氧化氮合酶活性维持在正常水平。

MDA 是机体脂质过氧化的最终产物,具有细胞毒性,会引发一系列细胞膜结构和功能的破坏,其含量反映了氧化应激状态下机体细胞受损伤的程度。本试验中,抗生素的作用使小鼠血清中 MDA 含量急剧升高,抗生素的长期使用是导致细胞氧化受损的重要原因。王丹等^[25]给大鼠灌胃不同剂量的二氢杨梅素,测定其对大鼠细胞内 MDA 含量的影响,结果显示在二氢杨梅素的作用下大鼠血清中的 MDA 含量下降,而且与二氢杨梅素浓度呈正相关,表现出优良的抗氧化活性。本研究与该结论相符,小鼠饲喂二氢杨梅素后,抗生素应激状态下的小鼠血清中 MDA 含量显著降低,缓解了抗生素带来的脂质过氧化导致的细胞损伤。

3.2 二氢杨梅素对小鼠肠道微生物多样性的影响

肠道不仅是哺乳动物消化吸收的重要场所,也是发挥免疫防御功能的重要器官,其中肠道微生物不仅通过代谢为机体提供维生素、必需氨基酸和多肽等营养物质,在维持肠道微环境的稳定和调节宿主肠道健康中发挥重要作用^[26]。本试验通过对小鼠肠道微生物的 16S rRNA 基因高通量测序和 OTU 聚类分析,在测序深度足够的条件下发现抗生素的使用导致小鼠肠道微生物种类丰度锐减,二氢杨梅素作用并未改变该现象,

但各处理组在肠道微生物菌群组成结构和成分上存在差异。肠道微环境失衡将会导致机体代谢失调,引发各种代谢疾病的发生,而抗生素滥用正是导致肠道菌群多样性急剧降低和诱发疾病、炎症的主要因素。本研究中二氢杨梅素处理后的小鼠在病症表现上有所缓解,其作用并不体现在将肠道微生物种类丰度回归至正常水平,而是通过改变肠道中菌群的组成和结构来调节肠道微环境。

通过小鼠肠道微生物差异分析发现,二氢杨梅素处理后的抗生素应激小鼠肠道中厚壁菌门与拟杆菌门的相对丰度比值显著升高。厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*, F/B)值可以反映肠道微生态的情况,已被认为是肠道健康状态的代表性指标,该指标的增加已被证实与肥胖和 2 型糖尿病相关^[27]。范莉研究发现,藤茶中的二氢杨梅素能够降低大鼠肠道中 F/B 值来调节改善肠道菌群的结构^[28]。这表明二氢杨梅素能够通过改变 F/B 值来调节抗生素应激造成的小鼠肠道菌群失调的情况。

在肠道中,益生菌能够有效地维持肠道微环境的稳态,而某些条件致病菌的大量繁殖是引发各类疾病的根源。乳杆菌属(*Lactobacillus*)作为机体重要的益生菌群,不仅帮助机体转化营养物质,还参与了机体的免疫系统,通过自身的增殖占位,形成生物屏障,拮抗病原微生物的定殖,防止肠道菌群的紊乱^[29-30]。梭菌属细菌能够调节肠道内 5-羟色胺的含量来促进消化吸收,其中梭菌属的酪酸梭菌(*Clostridium butyricum*)能够分泌酪酸修复肠黏膜,同时酪酸梭菌在肠道中能产生酶和维生素类物质促进消化吸收^[31]。本次试验中在抗生素应激条件下受二氢杨梅素处理的小鼠肠道菌群中梭菌科和乳杆菌目细菌丰度显著增加,而且在进一步的定量验证中显示乳杆菌属、梭菌属两类有益菌属丰度升高,说明二氢

杨梅素的代谢过程能促进了肠道益生菌增殖,进而调控整个肠道微环境。不仅如此,二氢杨梅素对一些条件致病菌也显现抑制繁殖的作用。肠球菌是人与动物肠道菌群的一部分,是常见的条件致病菌,不仅易于引发各种感染,还能导致败血症和其他危及生命的炎症^[32]。但介于其强大的耐药性,本试验中在二氢杨梅素的调节下小鼠肠道中肠球菌属仍保持相对较高的丰度。肠杆菌科为变形菌门下属细菌,少数肠杆菌易引起人类胃肠道疾病和炎症反应,其中大肠埃希菌可引起腹泻或肠道内感染,沙门氏菌是胃肠炎和菌血症的主要致病菌,志贺菌属可引起细菌性痢疾,常伴随有腹痛、腹泻、腹胀等现象的发生^[33]。在本研究中,受二氢杨梅素处理的小鼠肠道内肠杆菌科菌群丰度极显著降低,说明二氢杨梅素能够通过抑制肠杆菌科细菌的过度增殖达到预防肠道疾病和炎症的发生。

3.3 小鼠肠道微生物对二氢杨梅素代谢的影响

小鼠在抗生素应激条件下,其肠道微生物多样性锐减,受二氢杨梅素处理小鼠的肠道菌群组成与结构存在明显差异,说明二氢杨梅素的存在对小鼠肠道菌群有调节作用,介于肠道微生物对类黄酮物质的分解代谢作用,二氢杨梅素的分解代谢机制可能与上述差异菌群存在协同效应。Tong 等^[34]利用液相色谱-质谱联用测定二氢杨梅素在血浆、组织、尿液和粪便中的含量,结果显示二氢杨梅素口服给药后血药浓度极低,生物利用性差,其粪便中的含量远大于尿液含量,在后续对研究二氢杨梅素在大鼠肠道的代谢物研究中发现,血浆中几乎没有检测到二氢杨梅素的代谢产物。说明二氢杨梅素在胃肠道里被大量代谢,原型二氢杨梅素及其代谢产物能够共同作用于肠道菌群或肠黏膜系统,从而发挥二氢杨梅素的作用。Fan 等^[35]通过体外粪便孵育法研究证明

了二氢杨梅素可被大鼠肠道菌群代谢,代谢途径主要为还原和脱羟基反应,而且脱羟基代谢物是最主要的代谢物。说明肠道微生物并不能促进二氢杨梅素的吸收,但对其分解代谢具有重要作用,被分解的代谢产物可能作为关键因子参与机体的抗氧化过程和疾病的治疗与防控。有相关研究报告,某些益生菌群能够参与到类黄酮物质的分解代谢过程中。Wei 等^[36]利用乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)体外发酵豆乳,测定大豆异黄酮的转化情况并进行定量分析,结果表明约有 62%–96%的大豆异黄酮糖苷被转化成游离型异黄酮苷元,提高了大豆异黄酮的活性价值。Yang 等^[37]研究发现了一种可代谢黄酮类化合物的肠道菌——解黄酮梭菌(*Clostridium orbiscijdens*),该菌能分泌一种黄酮还原酶催化黄酮的降解和转化生产功能各异的活性物质,对机体产生积极影响。结合本研究结果,二氢杨梅素通过提高抗生素应激小鼠肠道内乳杆菌属和梭菌属等益生菌的相对丰度,并参与到二氢杨梅素的分解代谢过程,代谢产物被吸收提高了小鼠的抗氧化活性。但这些益生菌群是否是分解二氢杨梅素的关键菌群或有更多菌群参与到二氢杨梅素的代谢过程,还有待进一步研究证实,该结果为二氢杨梅素在肠道中的分解代谢机制和功能研究提供了方向。

综上所述,抗生素的滥用不仅对小鼠机体带来大量负面影响,也打破了小鼠肠道微生物的稳态,提高了疾病发生的风险。二氢杨梅素的使用能显著提高小鼠血清中抗氧化酶类的活性和抗氧化物质的含量,提高氧化自由基和脂质过氧化产物的清除效率,使小鼠的总抗氧化能力增强。因此,二氢杨梅素在治疗心血管疾病和抗衰老等方面有明显效果。抗生素的长期大量使用导致肠道微生物菌群的丰度和多样性显著降低,而二氢杨梅素能够通过提高厚壁菌门与拟杆菌门的丰

度比值,显著提高乳杆菌属、梭菌属丰度和降低肠杆菌科丰度来调控肠道微生态平衡,而且乳杆菌属、梭菌属细菌能够参与二氢杨梅素的代谢过程,产生有益代谢产物来提高机体的抗氧化能力和维持肠道健康,进而预防和治疗相关疾病。

REFERENCES

- [1] 任彩君, 吴黎明, 王凯. 膳食多酚对肠道菌群影响研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 400-409.
REN CJ, WU LM, WANG K. Research progress about the effects of dietary polyphenols on the intestinal microbiota[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 400-409 (in Chinese).
- [2] 刘冬敏, 黄建安, 刘仲华. 肠道微生物与茶及茶多酚的相互作用在调节肥胖及并发症中的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(9): 1640-1648.
LIU DM, HUANG JA, LIU ZH. The regulation effect of interaction between gut microbiota and tea and tea polyphenols in obesity and comorbidity[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(9): 1640-1648 (in Chinese).
- [3] 李浩, 彭喜洋, 吴湃莹, 戴智勇, 汪家琦, 湛艳红, 何湘丽. 植物多酚对肠道微生态影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 222-226, 236.
LI H, PENG XY, WU PX, DAI ZY, WANG JQ, ZHAN YH, HE XL. Progress on effects of plant polyphenols on intestinal microecology[J]. Food & Machinery, 2019, 35(6): 222-226, 236 (in Chinese).
- [4] 徐静娟, 姚茂君, 许钢. 二氢杨梅素抗氧化功能的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 43-45.
XU JJ, YAO MJ, XU G. Study on antioxidant activities of dihydromyricetin[J]. Food Science, 2007, 28(9): 43-45 (in Chinese).
- [5] GUO Y, SUN Q, WU FG, DAI Y, CHEN X. Polyphenol-containing nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic delivery[J]. Advanced Materials, 2021, 33(22): e2007356.
- [6] LANDETE JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(10): 936-948.
- [7] ANHÊ FF, VARIN TV, LE BARZ M, DESJARDINS Y, LEVY E, ROY D, MARETTE A. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts[J]. Current Obesity Reports, 2015, 4(4): 389-400.
- [8] 肖露平. 迷迭香叶非精油组分清除自由基、抗氧化及抗人肝细胞 HL7702 氧化损伤作用的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2010.
XIAO LP. Study on the effects of the components from nonessential oils in *Rosmarinus officinalis* L. leaves on scavenging free radical, antioxidation and protection of human hepatocyte HL7702 against oxidative damage[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2010 (in Chinese).
- [9] CORCUERA LA, AMÉZQUETA S, ARBILLAGA L, VETTORAZZI A, TOURIÑO S, TORRES JL, LÓPEZ de CERAIN A. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2012, 50(3-4): 989-995.
- [10] BULL MJ, PLUMMER NT. Part 1: the human gut microbiome in health and disease[J]. Integrative Medicine (Encinitas, Calif), 2014, 13(6): 17-22.
- [11] NYLUND L, SATOKARI R, SALMINEN S, de vos WM. Intestinal microbiota during early life-impact on health and disease[J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2014, 73(4): 457-469.
- [12] JIN YX, WU Y, ZENG ZY, JIN CY, WU SS, WANG YY, FU ZW. From the cover: exposure to oral antibiotics induces gut microbiota dysbiosis associated with lipid metabolism dysfunction and low-grade inflammation in mice[J]. Toxicological Sciences, 2016, 154(1): 140-152.
- [13] SCOTT FI, HORTON DB, MAMTANI R, HAYNES K, GOLDBERG DS, LEE DY, LEWIS JD. Administration of antibiotics to children before age 2 years increases risk for childhood obesity[J]. Gastroenterology, 2016, 151(1): 120-129.
- [14] LOOFT T, ALLEN HK. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes[J]. Gut Microbes, 2012, 3(5): 463-467.
- [15] 卢烽, 廖小军, 胡小松, 张燕. 多酚对肠道微生物影响的研究进展及对多酚指示菌的探讨[J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 330-335.
LU F, LIAO XJ, HU XS, ZHANG Y. Research advances in the effect of polyphenols on the gut microbes and the discuss about microbes which will appear as

- polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 330-335 (in Chinese).
- [16] ATKINSON C, BERMAN S, HUMBERT O, LAMPE JW. *In vitro* incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production[J]. The Journal of Nutrition, 2004, 134(3): 596-599.
- [17] WANG D, XIA M, YAN X, LI D, WANG L, XU Y, JIN T, LING W. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b[J]. Circulation Research, 2012, 111(8): 967-981.
- [18] JIN MJ, KIM IS, KIM DH, YOO HH. Effects of intestinal microbiota on the bioavailability of geniposide in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9632-9636.
- [19] UZAN-YULZARI A, TURTA O, BELOGOLOVSKI A, ZIV O, KUNZ C, PERSCHBACHER S, NEUMAN H, PASOLLI E, OZ A, BEN-AMRAM H, KUMAR H, OLLILA H, KALJONEN A, ISOLAURI E, SALMINEN S, LAGSTRÖM H, SEGATA N, SHARON I, LOUZOUN Y, ENSENAUER R, RAUTAVA S, KOREN O. Neonatal antibiotic exposure impairs child growth during the first six years of life by perturbing intestinal microbial colonization[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 443.
- [20] LIAO W, NING Z, MA L, YIN X, WEI Q, YUAN E, YANG J, REN J. Recrystallization of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* and its anti-oxidant activity evaluation[J]. Rejuvenation Research, 2014, 17(5): 422-429.
- [21] 陈丽, 孙云子. 藤茶提取物对小鼠生长性能、腹泻率及抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1027-1031.
- CHEN L, SUN YZ. Effect of *Ampelopsis grossedentata* extract on growth performance, diarrhea rate and anti-oxidation function in mice[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(4): 1027-1031 (in Chinese).
- [22] 史宁, 郭宏举, 王欢, 常李荣. 二氢杨梅素对⁶⁰Co- γ 辐射小鼠氧化应激损伤的保护作用[J]. 解放军药学报, 2017, 33(4): 353-355.
- SHI N, GUO HJ, WANG H, CHANG LR. Protective effects of dihydromyricetin on ⁶⁰Co- γ -induced oxidative stress in mice[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese PLA, 2017, 33(4): 353-355 (in Chinese).
- [23] GANTNER BN, LAFOND KM, BONINI MG. Nitric oxide in cellular adaptation and disease[J]. Redox Biology, 2020, 34: 101550.
- [24] SZLACHCIC A, KRZYSIEK-MACZKA G, PAJDO R, TARGOSZ A, MAGIEROWSKI M, JASNOS K, DROZDOWICZ D, KWIECIEN S, BRZOZOWSKI T. The impact of asymmetric dimethylarginine (*ADAMA*), the endogenous nitric oxide (NO) synthase inhibitor, to the pathogenesis of gastric mucosal damage[J]. Current Pharmaceutical Design, 2013, 19(1): 90-97.
- [25] 王丹, 郁建平, 刘灏. 藤茶二氢杨梅素抗氧化活性研究[J]. 山地农业生物学报, 2013, 32(3): 243-246.
- WANG D, YU JP, LIU H. The *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of dihydromyricetin isolated from *Ampelopsis grossedentata*[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2013, 32(3): 243-246 (in Chinese).
- [26] TAKO E. Dietary plant-origin bio-active compounds, intestinal functionality, and microbiome[J]. Nutrients, 2020, 12(11): 3223.
- [27] GRIGOR'EVA IN. Gallstone disease, obesity and the firmicutes/bacteroidetes ratio as a possible biomarker of gut dysbiosis[J]. Journal of Personalized Medicine, 2020, 11(1): 13.
- [28] 范莉. 中药藤茶的质量评价及其活性成分二氢杨梅素的代谢相关研究[D]. 武汉: 华中科技大学硕士学位论文, 2018.
- FAN L. Quality evaluation of *Ampelopsis grossedentata* and metabolic-related study of its bioactive ingredient dihydromyricetin[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [29] 唐京, 陈明, 柯文灿, 王丽娜, 张娟, 丁武蓉. 乳酸菌在疾病防治和人体保健中的应用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4): 98-107.
- TANG J, CHEN M, KE WC, WANG LN, ZHANG J, DING WR. Advances in lacto-bacteria in disease control, prevention and health care[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(4): 98-107 (in Chinese).
- [30] CHEN RC, XU LM, DU SJ, HUANG SS, WU H, DONG JJ, HUANG JR, WANG XD, FENG WK, CHEN YP. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant promotes intestinal barrier function, balances T_{reg} and T_H17 cells and ameliorates hepatic injury in a mouse model of chronic-binge alcohol feeding[J]. Toxicology Letters, 2017, 37(4): 98-107 (in Chinese).

- 2016, 241: 103-110.
- [31] SEKI H, SHIOHARA M, MATSUMURA T, MIYAGAWA N, TANAKA M, KOMIYAMA A, KURATA S. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI[J]. *Pediatrics International*, 2003, 45(1): 86-90.
- [32] TORRES C, ALONSO CA, RUIZ-RIPA L, LEÓN-SAMPEDRO R, DEL CAMPO R, COQUE TM. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(4): DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
- [33] ZHANG J, HUANG Y, XUE P, ZHAN Z, HUANG Z, LI J, DIAO B, KAN B. A duplex droplet digital PCR assay for *Salmonella* and *Shigella* and its application in diarrheal and non-diarrheal samples[J]. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2022, 120: 210-216.
- [34] TONG Q, HOU X, FANG J, WANG W, XIONG W, LIU X, XIE X, SHI C. Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 114: 455-461.
- [35] FAN L, TONG Q, DONG WW, YANG GJ, HOU XL, XIONG W, SHI CY, FANG JG, WANG WQ. Tissue distribution, excretion, and metabolic profile of dihydromyricetin, a flavonoid from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) after oral administration in rats[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(23): 4597-4604.
- [36] WEI QK, CHEN TR, CHEN JT. Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(1): 120-124.
- [37] YANG GH, HONG S, YANG PJ, SUN YW, WANG Y, ZHANG P, JIANG WH, GU Y. Discovery of an ene-reductase for initiating flavone and flavonol catabolism in gut bacteria[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 790.