

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2016.01.18

杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠菌群和免疫功能的影响

邹芙沁^{1*}, 文斌^{2*}, 孙豪¹, 周毅¹, 曾东¹, 倪学勤^{1*}, 汪平^{2*}, 杨明月¹

(1. 四川农业大学 动物医学院动物微生态研究中心, 四川 成都 611130;

2. 四川省草原科学研究院, 四川 成都 611430)

摘要: 为研究杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠菌群和免疫功能的影响, 本研究选用 40 只 28 日龄断奶獭兔, 随机平均分为在基础日粮中添加杆菌肽锌(40 mg/kg)的实验组和不添任何抗生素的对照组。采用聚合酶链式反应 - 变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和荧光定量 PCR (qPCR)方法对断奶獭兔盲肠菌群和 TLR2、TLR4 mRNA 表达水平进行检测, ELISA 对外周血细胞因子进行测定。PCR-DGGE 结果表明, 与对照组比较, 实验组盲肠菌群丰富度、多样性和均匀度等均无显著变化($p>0.05$)。qPCR 检测表明, 实验组的梭菌类群 XIVa 显著降低($p<0.05$)。在免疫功能调节方面, 实验组外周血细胞因子 IL-1、IL-2、IL-4、TNF- α 的浓度显著升高($p<0.05$); TLR2、TLR4 mRNA 的相对表达量总体呈上调趋势。以上结果表明, 杆菌肽锌作为断奶獭兔饲料添加剂, 对盲肠菌群结构没有显著影响, 但能够增强机体免疫力。

关键词: 杆菌肽锌; 獭兔; 盲肠微生物; 细胞因子

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2016)01-0077-05

Effect of zinc bacitracin on cecum microflora and immune function of weaned Rex rabbits

ZOU Fu-qin^{1*}, WEN Bin^{2*}, SUN Hao¹, ZHOU Yi¹, ZENG Dong¹, NI Xue-qin^{1*},
WANG Ping^{2*}, YANG Ming-yue¹

(1. Animal Micro-Ecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611430, China)

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effects of zinc bacitracin on weaned Rex rabbit cecum microflora and immune function. A total of 40 Rex rabbits weaned at 28 days of age were randomly allotted into two groups included experimental group was fed with basal diet supplemented with zinc bacitracin 40 mg/kg and control group was fed with basal diet without any antibiotics. The cecum microflora, mRNA expressions of TLR2 and TLR4, and peripheral blood cytokines in weaned Rex rabbit were detected by PCR-DGGE real-time PCR and ELISA, respectively. PCR-DGGE results showed that compared with control group, richness and evenness and microflora diversity were not significantly changed in experimental group ($p>0.05$). Real-time PCR detection results showed that the *Clostridium* (cluster XIVa) in experimental group was greatly decreased ($p<0.05$). In terms of immune function, the cytokine concentrations in peripheral blood, such as IL-1, IL-2, IL-4 and TNF- α were increased significant in experimental group ($p<0.05$). The relative mRNA expression levels of TLR2 and TLR4 were up-regulated trends in the experimental group. These results indicated that use of zinc bacitracin as a feed additive to weaned Rex rabbit might enhance immune abilities and have no significant effects on cecum microbial community structure.

Key words: zinc bacitracin; Rex rabbit; cecum microflora; cytokines

*Corresponding author; Equal contributors

收稿日期: 2015-07-20

基金项目: 四川省“十二五”畜禽育种公关项目(2011NZ0099-4); 四川省“十二五”国家兔产业技术体系建设(CARS-44-A-4)

共同第一作者: 邹芙沁(1992-), 女, 重庆合川人, 硕士研究生, 主要从事动物微生态学研究;

文斌(1977-), 男, 四川邛崃人, 副研究员, 主要从事獭兔繁殖与遗传育种研究。

* 通信作者: E-mail: xueqinni@foxmail.com; 308119391@qq.com

动物饲料中长期添加抗生素已引发了一系列的食品安全问题和环境污染。但中国养殖业是粗放式集约化模式,使得对抗生素的依赖性大,因此在中国还不能全面禁止抗生素的使用。

杆菌肽(Bacitracin)于1945年首次发现,主要由地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)分泌产生的一种多肽类抗生素^[1-2]。杆菌肽锌(Zinc Bacitracin)是杆菌肽与锌的复合物,是畜禽专用抗生素,具有畜禽吸收量少,排泄迅速,适量添加无残留,无配伍禁忌,不容易产生耐药性,可长期使用等特点^[3],同时具有提高饲料利用率、抑制和杀灭动物肠道有害微生物、促进动物生长,增强机体免疫功能,广泛应用于国内外畜禽养殖^[1]。但有关杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠菌群和免疫功能影响研究较少,因此本实验采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)、荧光定量PCR(qPCR)和ELISA分子方法,研究杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠菌群和免疫功能的影响,为杆菌肽锌在獭兔生产中的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料、仪器及实验动物 组织样品总RNA提取试剂盒、pMD19-T载体、Agarose Gel DNA Purification Kit、SYBR Premix Ex TaqTM等均购自宝生物工程(大连)有限公司;2×Taq Master Mix(含染料)购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;大肠杆菌DH5 α 购自北京博迈德生物技术有限公司;细胞因子ELISA试剂盒购自上海美轩生物科技公司;10%杆菌肽锌预混剂由兴旺动物药业有限公司提供。PCR-DGGE成套仪器、CFX96实时荧光定量PCR扩增仪均为Bio-Rad[®]公司产品。28日龄断奶獭兔,由四川省草原科学研究院提供。

1.2 实验动物饲养管理 选取40只28日龄健康的断奶獭兔,随机平均分为在基础日粮中添加40 mg/kg杆菌肽锌的实验组和不添加任何抗生素的对照组,每组5个重复,每个重复4只,分养于清洗、消毒的獭兔饲养笼内,并对獭兔进行编号。自由采食和饮水。预试期7 d,正试期28 d。参照NRC-ARC(1977)和獭兔饲养标准配制基础全价日粮进行饲养。

1.3 样品的采集与处理 每组各随机选取5只獭兔。颈动脉采血制备血清。同时,摘取脾脏、肝

脏,剔除脂肪以及其他组织,称重并记录;采集脾脏、肝脏、回肠、盲肠组织样品以及盲肠内容物,经液氮速冻后,于-80℃保存备用。

1.4 PCR-DGGE 试验

1.4.1 獭兔盲肠内容物总DNA提取 按照文献[4]的方法提取獭兔盲肠内容物的总DNA,利用1.0%的琼脂糖凝胶电泳和核酸浓度测定仪对DNA进行检测。-20℃冰箱冷冻保存备用。

1.4.2 PCR-DGGE 技术分析断奶獭兔盲肠内容物菌群多样性 根据细菌16S rRNA基因V3片段(339 bp~539 bp)进行PCR扩增。采用文献[5]引物序列(5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'/5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3')和反应条件进行PCR扩增以及PCR-DGGE凝胶电泳。凝胶梯度为35%~65%,变性方向与电泳方向一致。按照100%变性溶液含7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺配制凝胶。使用1×TAE缓冲液,维持温度60℃,恒压100 V电压15 h~16 h^[6]。电泳结束后银染,使用凝胶成像系统对PCR-DGGE图谱进行扫描。

1.5 qPCR 分析盲肠菌群 将各待检菌株的阳性PCR产物纯化后,克隆于pMD19-T载体中,构建重组质粒作为标准品。以标准重组质粒为模板进行10倍梯度稀释,建立标准曲线^[7]。利用Bio-Rad[®] CFX 96荧光定量PCR扩增仪对标准曲线样品和各待测DNA样品进行qPCR分析(表1),每个样品3个平行重复。qPCR反应体系(25.0 μ L):SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L,上下游引物(10 pmol/ μ L)各1.5 μ L;模板1.0 μ L,ddH₂O补足至25.0 μ L。反应程序:95℃ 5 min;95℃ 15 s、T_m 30 s、72℃ 30 s,40个循环;95℃ 1 min,50℃ 1 min,55℃~95℃的梯度增温(每5 s增加0.5℃)。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。根据标准曲线计算待检样品中各细菌的拷贝数。

1.6 脏器指数测定和外周血细胞因子检测 实验组和对照组断奶獭兔器官重与体重比计算脏器指数。公式:脏器指数(g/kg)=器官重(g)/体重(kg)。同时,采用ELISA试剂盒检测其外周血中细胞因子的含量,包括:IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 。

1.7 qPCR 检测TLR2和TLR4 mRNA相对表达量以提取样品总RNA反转录制备的cDNA为模板,

按照文献[15]中的引物和反应条件, 以 GAPDH 作为内参进行 qPCR 扩增, 检测实验组和对照组的断奶獭兔 TLR2 和 TLR4 mRNA 的相对表达量。相对表达量倍数 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.8 数据分析 采用 Quantity One (version 4.6.2; Bio-Rad)软件对 PCR-DGGE 图谱进行分析; SPSS19.0 统计软件对实验数据进行 One-way Anova 显著性分析, 以 $p < 0.05$ 为差异显著有统计学意义。

表 1 细菌特异性引物
Table 1 Specific primers of bacterial

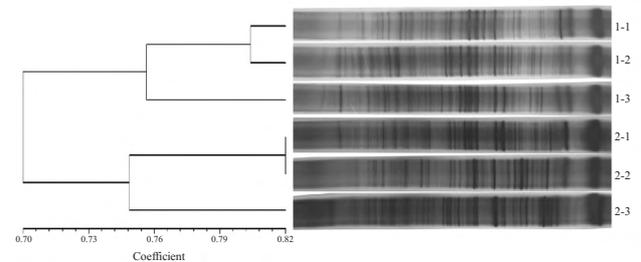
细菌种属 (Bacterial species)	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	退火温度(°C) TM(°C)	参考文献 Reference
总细菌(200 bp) Total bacteria	F-CGGCAACGAGCGCAACCC R-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	60	[8]
梭菌类群 IV (230 bp) <i>Clostridium</i> cluster IV	F-GCACAAGCAGTGGAGT R-CTTCCTCCGTTTTGTCAA	60	[9]
梭菌类群 XIVa (440 bp) <i>Clostridium</i> cluster XIVa	F-AAATGACGGTACCTGACTAA R-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	60	[10]
普雷沃氏菌属(140 bp) <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	F-GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT R-CGGAYGTAAGGGCCGTGC	68	[11]
肠杆菌科(230 bp) <i>Enterobacteriaceae</i> family	F-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC R-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	52	[12]
肠球菌属(144 bp) <i>Enterococcus</i> spp.	F-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT R-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	52	[11]
链球菌属(485 bp) <i>Streptococcus</i> spp.	F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R-GTTAGCCGTCCTTCTGG	60	[13-14]

2 结果

2.1 獭兔 PCR-DGGE 电泳图谱分析 在为期 28 d 的实验结束后, 提取实验组和对照组盲肠内容物总 DNA, 进行 16S rDNA V3 区基因组 PCR 扩增和 PCR-DGGE。结果显示实验组和对照组盲肠内容物平均条带数分别为 49 和 46, 菌群多样性指数、均匀度和丰富度分别为 3.90、0.94、49.33 和 3.82、0.92、45.67, 两组之间无显著差异 ($p > 0.05$) (图 1)。PCR-DGGE 图谱聚类分析结果显示, 实验组和对照组组内样品均各自聚为一簇, 并且所有样品的相似性系数均高达 74%。表明实验组和对照组盲肠微生物菌群极其相似, 杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠微生物菌群多样性和相似性影响不显著(图 1)。

2.2 qPCR 分析獭兔盲肠内容物菌群 以 qPCR 方法检测断奶獭兔盲肠总菌、梭菌类群 IV、梭菌类群 XIVa、普雷沃氏菌属、肠杆菌科、肠球菌属、链球菌属, 结果显示, 实验组与对照组总菌数量无显著差异 ($p > 0.05$), 实验组盲肠梭菌类群 XIVa 的含量显著降低 ($p < 0.05$), 梭菌类群 IV 和肠杆菌科数量有下降趋势, 普雷沃氏菌属数量有增加趋势, 但均无显著差异 ($p > 0.05$) (表 2)。表明杆菌肽锌不改变獭兔盲肠总菌数量, 但使各菌数量处于动态平衡的状态。

2.3 獭兔脏器指数测定和外周血细胞因子检测 无



注: 图中 1-1、1-2、1-3 分别表示对照组的 3 个样品; 2-2、2-2、2-3 分别表示实验组的 3 个样品。
Note: In figure, the 1-1, 1-2 and 1-3 represent three samples in control group; the 2-1, 2-2 and 2-3 represent three samples in experimental group.

图 1 獭兔盲肠内容物 PCR-DGGE 图谱及聚类分析
Fig. 1 PCR-DGGE profile and cluster analysis of the rex rabbits cecum contents

菌采集实验组和对照组肝脏、脾脏, 观察发现两组的肝脏、脾脏外观均表现正常。实验组脾脏、肝脏指数分别是 0.59、29.10; 对照组脾脏、肝脏指数分别是 0.39、31.52。实验组脾脏指数升高, 肝脏指数降低, 但差异均不显著 ($p > 0.05$)。采用 ELISA 试剂盒检测外周血细胞因子, 结果显示, 实验组外周血细胞因子 IL-1、IL-2、IL-4、TNF- α 表达水平显著升高 ($p < 0.05$); IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ 的表达水平升高, 但差异不显著 ($p > 0.05$) (表 3)。表明杆菌肽锌的使用可能增加獭兔细胞因子表达量, 使抗炎因子和促炎因子保持动态平衡。

表2 实验组和对照组的qPCR定量检测结果(单位: Log copies/g)
Table 2 qPCR detection of the experimental group and control group (Unit: Log copies/g)

细菌种属 Bacterial species	总菌 Total bacteria	梭菌类群 IV (<i>Clostridium</i> cluster IV)	梭菌类群 XIVa (<i>Clostridium</i> cluster XIVa)	普雷沃氏菌属 <i>Bacteroides-Prevotella- Porphyromonas</i>	肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i> family	肠球菌属 <i>Enterococcus</i> spp.	链球菌属 <i>Streptococcus</i> spp.
实验组(n=5)	11.46±0.027	10.77±0.051	10.33±0.057*	10.19±0.083	9.94±0.034	7.96±0.093	7.85±0.088
对照组(n=5)	11.39±0.053	10.93±0.053	10.60±0.049	10.10±0.131	10.09±0.132	7.91±0.063	7.82±0.046

注: *表示与对照组比较差异显著($p<0.05$)。

Note: *Mean the significant difference compared with control group ($p<0.05$).

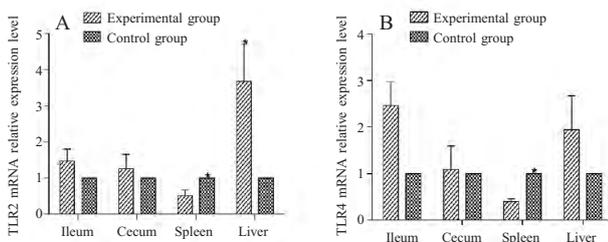
表3 杆菌肽锌对獭兔外周血细胞因子的影响
Table 3 Effect of zinc bacitracin on the rex rabbits peripheral blood cytokines

细胞因子 Cytokines	实验组 Experimental group	对照组 Control group
IL-1	87.765±6.786*	52.815±7.662
IL-2	14.172±0.382*	10.162±0.055
IL-4	25.134±1.110*	11.502±2.910
IL-6	132.063±27.176	78.333±13.126
IL-10	63.477±5.327	52.815±4.376
IL-12	49.679±1.554	44.041±3.782
IFN- γ	65.016±4.017	64.838±5.633
TNF- α	68.756±2.566**	45.966±5.491

注: **表示与对照组比较差异极显著($p<0.01$)。

Note: **Mean the significant extremely difference compared with control group ($p<0.01$).

2.4 qPCR检测獭兔TLR2和TLR4 mRNA相对表达量 采用qPCR方法检测实验组和对照组回肠、盲肠、脾脏和肝脏组织中TLR2和TLR4 mRNA相对表达量。结果显示,实验组肝脏TLR2 mRNA相对表达量显著升高($p<0.05$),回肠和盲肠TLR2、TLR4 mRNA相对表达量均升高,但不显著($p>0.05$),脾脏TLR2和TLR4 mRNA相对表达量显著降低($p<0.05$);对照组回肠、盲肠、脾脏和肝脏组织中TLR2和TLR4 mRNA表达水平一致。表明杆菌肽锌可能使獭兔免疫功能增加(图2A、B)。



注: A表示TLR2 mRNA相对表达量;

B表示TLR4 mRNA相对表达量

Note: A showed TLR2 mRNA relative expression level;

B showed TLR4 mRNA relative expression level

图2 杆菌肽锌对獭兔TLR2和TLR4 mRNA表达的影响
Fig. 2 Effect of zinc bacitracin on TLR2 and TLR4 mRNA expression in the rex rabbits

3 讨论

兔是草食性动物,纤维素的消化主要依靠盲肠微生物,盲肠的正常生理功能主要由稳定的微生物结构决定,因此盲肠正常菌群结构被破坏后,会导致整个消化道病理反应,影响消化吸收功能,甚至引起全身性病理反应。兔断奶后,盲肠微生物菌群结构容易紊乱,使得胃肠道特别容易受到细菌和病毒感染,增加肠道疾病和死亡率^[16]。所以在此阶段,抗生素的合理使用就很有必要,可以有效防治因断奶导致的疾病。因此,本研究选择该阶段獭兔盲肠菌群作为研究对象。

本实验结果显示杆菌肽锌对断奶獭兔盲肠菌群结构无显著影响,但能够针对肠道某些特定的菌群进行调节,例如使有益菌数量增加和有害菌数量减少,呈现此消彼长的变化,使得细菌总数始终保持在稳定水平。qPCR检测结果显示,杆菌肽锌的应用使普雷沃氏菌属呈增加趋势,肠杆菌呈下降趋势。刘祥等研究表明,随着脂肪的积累拟杆菌数量则显著升高,肠杆菌数量呈下降趋势^[17]。因此,可以推测杆菌肽锌的使用增加脂肪的积累促进生长。在本实验中,实验组的梭菌类群IV和梭菌类群XIVa下降,表明动物机体内丁酸盐的含量可能降低,可能带给动物机体不利的影响,但仍然需要进一步研究才能确定梭菌类群IV和梭菌类群XIVa下降对动物机体的影响。总体来看,杆菌肽锌有利于獭兔生长,但不可长期大剂量添加饲喂,以免产生耐药性和扰乱肠道菌群结构,不利于獭兔健康和疾病的预防。

在本实验中,实验组TLR2和TLR4 mRNA的相对表达量总体呈上升趋势;实验组外周血细胞因子浓度均上升。可能是因为Toll样受体表达上调导致细胞因子浓度增加。本实验结果显示,实验组回肠、盲肠组织TLR2和TLR4 mRNA的相对表达量均比对照组高,可能是杆菌肽锌对肠道内细菌杀伤

作用强, 使得细菌裂解暴露出配体, 并与肠组织细胞的 TLR2 和 TLR4 mRNA 受体结合, 增强肠道免疫功能。刘崇海等研究发现肠道菌群的变化会影响机体免疫功能。因此推测可能是肠道菌群此消彼长的变化, 使机体免疫功能处于动态平衡水平, Toll 样受体相对表达量和外周血细胞因子浓度的变化, 可能有利于提高机体免疫功能, 抑制细菌移位, 使肠道菌群保持动态平衡, 使机体向有益的方向发展^[18]。该推论与郭志强等研究结果一致。综合以上实验结果表明, 这可能是由于杆菌肽锌刺激机体免疫系统, 促进 TLR2、TLR4 和抗炎细胞增殖, 提高獭免免疫功能的作用。

本研究表明杆菌肽锌作为饲料添加剂使用, 可能具有促进机体生长和增强机体免疫力以及预防疾病的作用。但对于杆菌肽锌的耐药水平以及对獭免盲肠优势菌群定植的影响还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周臣飞, 李俊辉, 季朝金. 杆菌肽类饲料添加剂在畜禽养殖中的应用[J]. 中国动物保健, 2011, 12(8): 8-11.
- [2] 张平, 陆惠新. 日粮添加 3 种抗生素对断奶仔猪和生长猪生产性能的影响[J]. 中国畜禽种业, 2013, (10): 75-77.
- [3] 吴凡. 杆菌肽锌作为饲料添加剂的主要优点及其在畜禽饲养中的应用前景[J]. 浙江畜牧兽医, 2012, (2): 18-19.
- [4] 杨德君, 吴襟, 刘毅, 等. 一种快速提取肠道微生物总 DNA 的方法[J]. 动物微生态学杂志, 2006, 18(2): 91-93.
- [5] Walter J C, Hertel G W, Tannock, et al. Detection of lactobacillus, pediococcus, leuconostoc, and weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(6): 2578-2585.
- [6] 倪学勤, Joshua Gong, Hai Yu, 等. 采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 29(7): 955-961.
- [7] Guo Xiu-lan, Xia Xin-jie, Tang Ren-yong, et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs [J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47(5): 367-373.
- [8] Denman S E, Mc Sweeney C. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 58(3): 572-582.
- [9] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12): 7220-7228.
- [10] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(11): 5445-5451.
- [11] Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. J Appl Microbiol, 2004, 97(6): 1166-1177.
- [12] Hooper L V, Wong M H, Thelin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. Science, 2001, 291(5505): 881-884.
- [13] Franks A H, Harmsen H J, Raangs G C, et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(9): 3336-3345.
- [14] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. J Bacteriol, 1996, 178(19): 5636-5643.
- [15] Chen Chen, He Zi-biao, Zhang Ming, et al. Expression pattern of Toll-like receptors (TLRs) in different organs and effects of lipopolysaccharide on the expression of TLR2 and 4 in reproductive organs of female rabbit [J]. Dev Comp Immunol, 2014, 46: 341-348.
- [16] 李丛艳, 李勤, 郭志强. 断奶对家兔消化道形态和机体功能的影响[J]. 中国养兔, 2014, (2): 22-29.
- [17] 刘祥, 张朝武, 潘素华, 等. 不同体脂人群肠道主要菌群的定量分析[J]. 卫生研究, 2005, 34(6): 724-725.
- [18] 刘崇海, 杨锡强, 刘恩梅, 等. 抗生素诱导小鼠肠道菌群失调对免疫功能和 Toll 样受体 2、4 基因表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(8): 839-842.

(本文编辑: 李 爽)