

# 基于宏基因组技术研究哈蟆油对大鼠肠道菌群的影响

张文庆<sup>1</sup>, 谢地<sup>1</sup>, 辛梦茹<sup>1</sup>, 林嫚婷<sup>2</sup>, 张觅<sup>1</sup>, 刘亮<sup>1</sup>, 刘冬玲<sup>3</sup>, 郭珊<sup>4</sup>, 胡汉昆<sup>1</sup>

1. 武汉大学中南医院药学部 (武汉 430071)
2. 复旦大学附属肿瘤医院厦门医院药剂科 (福建厦门 361000)
3. 黄石市中心医院药剂科 (湖北黄石 435001)
4. 武汉大学中南医院生物样本库 (武汉 430071)

**【摘要】目的** 基于宏基因组技术研究哈蟆油 (OR) 对大鼠肠道菌群的影响, 用组学技术表征 OR 的功效。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为对照组和 OR 组。OR 组大鼠以  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 OR 匀浆每日灌胃, 对照组以等体积生理盐水灌胃。14 d 后, 采集大鼠粪便进行宏基因组测序, 对测序结果进行基因预测、丰度分析、物种注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能注释。**结果** 在门水平上 OR 可以显著升高放线菌门相对丰度 ( $P < 0.05$ ), 在纲水平上 OR 可以显著升高放线菌纲相对丰度 ( $P < 0.05$ ), 在目水平上 OR 可以显著升高双歧杆菌目相对丰度 ( $P < 0.05$ )。两组大鼠肠道菌群在门和属水平上的  $\beta$  多样性存在差异。线性判别效应大小分析 (LEfSe) 筛选出两组间 35 种显著差异菌种。KEGG 功能注释结果显示, 在 Level 1 层级上注释到新陈代谢类通路的基因最多。组间差异分析表明, OR 组注释到免疫系统、环境适应及癌症相关通路的相对丰度产生变化。**结论** 改变大鼠肠道菌群相对丰度及多样性、调节脂质及氨基酸代谢通路可能是 OR 营养保健和治疗疾病的潜在机制。

**【关键词】** 哈蟆油; 肠道菌群; 宏基因组; 新陈代谢

## Effect of *Oviductus Ranae* on gut microbiota of rats using macrogenomic technology

Wen-Qing ZHANG<sup>1</sup>, Di XIE<sup>1</sup>, Meng-Ru XIN<sup>1</sup>, Man-Ting LIN<sup>2</sup>, Mi ZHANG<sup>1</sup>, Liang LIU<sup>1</sup>, Dong-Ling LIU<sup>3</sup>, Shan GUO<sup>4</sup>, Han-Kun HU<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

2. Department of Pharmacy, Fudan University Shanghai Cancer Center (Xiamen), Xiamen 361000, Fujian Province, China

3. Department of Pharmacy, Huangshi Central Hospital, Huangshi 435001, Hubei Province, China

4. Department of Biological Repositories, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Han-Kun HU, Email: huhankun@whu.edu.cn; Shan GUO, Email: 903320262@qq.com; Dong-Ling LIU, Email: 824297153@qq.com

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202309007

基金项目: 湖北省科技创新人才及服务专项软科学研究项目 (CXRK2022000184)

通信作者: 胡汉昆, 博士, 主任药师, 副教授, 博士研究生导师, Email: huhankun@whu.edu.cn

郭珊, 博士, 助理研究员, Email: 903320262@qq.com

刘冬玲, 副主任药师, Email: 824297153@qq.com

**【Abstract】Objective** To study the effect of *Oviductus Ranae* (OR) on gut microbiota of rats based on macrogenomic technology, and to characterize the efficacy of OR by histological techniques. **Methods** Male SD rats were randomly divided into the control group and the OR group. Rats in the OR group were gavaged daily with 200 mg·kg<sup>-1</sup> dose of OR homogenate, while rats in the control group were gavaged with an equal volume of saline. After 14 days, rat feces were collected for macro-genome sequencing, and the sequencing results were subjected to gene prediction, abundance analysis, species annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional annotation. **Results** OR significantly increased the relative abundance of *Actinobacteria* at the phylum level and the class level ( $P<0.05$ ), and *Bifidobacteriales* at the order level ( $P<0.05$ ). There were differences in the Beta diversity of the intestinal flora of the two groups of rats at the phylum and genus levels. Linear discriminant analysis found 35 significantly different bacteria between two groups. The KEGG functional annotation results showed that most genes were annotated to metabolic pathways at the Level 1. The analysis of differences between groups showed that the OR group annotated the relative abundance of pathways related to the immune system, environmental adaptation and cancers changed. **Conclusion** Altering the relative abundance and diversity of rat gut microbiota and modulating lipid and amino acid metabolic pathways may be potential mechanisms for OR nutritional care and disease treatment.

**【Keywords】** *Oviductus Ranae*; Gut microbiotas; Macrogenomic; Metabolism

哈蟆油 (*Oviductus Ranae*, OR) 也被称为林蛙油、雪蛤油等, 是成熟雌性东北林蛙输卵管的干燥品, 首见于宋朝苏颂《本草经》。中国药典自 1985 年版起收载哈蟆油至今, 其功能主治为“补肾益精、润肺养阴。用于病后体弱, 神疲乏力, 心悸失眠, 盗汗, 癆嗽咳血”<sup>[1]</sup>。文献<sup>[2-3]</sup>报道, OR 还具有抗炎、免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、抗衰老、雌激素样、保肝、降血脂和骨质疏松等药理作用。此外, OR 被作为膳食补充剂或营养保健品, 在中国有着数百年的使用历史<sup>[4]</sup>, 被健康或亚健康人群广泛食用。

OR 相关研究<sup>[2,5-6]</sup>包括化学成分的分析、基于细胞或动物模型的药理研究等, 但这些研究大多年代久远, 方法简单, 文献较少, 鲜有学者采用中医药现代化研究方法对其进行持续和深入的关注。中药可以通过调节肠道菌群多样性以及群落结构组成、脑-肠轴等互作机制<sup>[7-8]</sup>, 起到缓解和治疗疾病以及提高药物疗效等作用<sup>[9-11]</sup>。研究中药对肠道菌群的影响, 乃至这些影响与疾病发生发展之间的关系, 已经成为中医药现代化研究的前沿与热点<sup>[12-13]</sup>。宏基因组测序是目前研究肠道菌群的主流方法, 可以解析微生物系统的功

能和分类<sup>[14]</sup>, 并将基因数据与微生物组成和功能联系起来, 是一种研究药物作用机制的组学研究新方法<sup>[15]</sup>。从肠道菌群角度研究 OR 作用机制的文献尚未见报道。

本研究采用宏基因组测序技术, 以健康对照组大鼠和服用 OR 14 d 后大鼠的粪便为研究对象, 比较两组大鼠肠道菌群的物种组成、相对丰度、多样性以及功能的差异, 探究 OR 治疗疾病和营养保健的潜在作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Qubit 2.0 荧光定量仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Covaris S220 超声波核酸破碎仪 (美国 Covaris 公司); Agilent 2100 生物分析仪 (美国 Agilent 公司); Illumina NovaSeq6000 测序仪 (美国 Illumina 公司)。

OR 收购于吉林省长白朝鲜族自治县, 经湖北省药品监督管理局肖凌副主任药师鉴定, 符合中国药典 2020 年版规定。室温条件下, 精密称量 8 g OR 并加入适量蒸馏水, 充分泡发 24 h 后匀浆处理, 定容至 400 mL 继续混匀, 配置成

20 mg · mL<sup>-1</sup> 的 OR 匀浆, 于 0 °C 冰箱保存备用。

磁珠法粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司, 批号: DP180427); NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA 文库制备试剂盒 (美国 NEB 公司, 批号: E7645S)。

## 1.2 动物

SPF 级雄性 SD 健康大鼠 8 只, 体重 (150 ± 15) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 实验动物质量合格证号: SCXK(京)2019-0010。在实验开始前, 将大鼠置于温度 20~25 °C、相对湿度 40%~70%、12 h 暗/光循环、自由饮水及饮食条件下, 适应性饲养 3 d。本研究获得武汉大学中南医院实验动物福利伦理委员会的批准 (批准号: ZN2021244)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 动物分组、给药及样本采集

将 8 只大鼠随机分为对照 (Con) 组和 OR 组, 每组 4 只。中国药典 2020 年版规定哈蟆油每日用量 5~15 g, 根据人与大鼠用药剂量换算公式<sup>[16]</sup>和药材入汤剂煎煮与粉末入药剂量区别换算方法<sup>[17]</sup>, 选定大鼠的 OR 用药剂量为 200 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>。OR 组大鼠每天灌胃给药 1 次, Con 组大鼠以相同体积的生理盐水灌胃, 连续用药 14 d。末次给药 24 h 后, 轻压大鼠下腹部刺激排便, 用灭菌冻存管收集 2~3 颗粪便, 液氮速冻在 -80 °C 条件下保存, 直到运送至实验室进行测序分析。

### 1.3.2 宏基因组检测与分析

#### 1.3.2.1 DNA 提取与质量检测、文库构建及宏基因组测序

使用磁珠法粪便基因组 DNA 提取试剂盒对每个大鼠粪便样本 (0.5 g) 进行单独处理, 提取各样本的总 DNA。使用 1% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的纯度和完整性, 荧光定量仪对 DNA 浓度进行准确定量。其次, 质量检测合格的 DNA 样品用超声波核酸破碎仪随机打断成长度约为 350 bp 的片段, 使用 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA 文库制备试剂盒进行文库制备。文库构建完成后使用 Agilent 2100 生物分析仪对文库的插入片段长度进行检测, 用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量, 以保证文库质量。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求混合建库后进行 Illumina PE150 测序。

#### 1.3.2.2 宏基因组数据预处理和组装

使用 readfq 对 Illumina HiSeq 测序平台获得的原始数据 (Raw Data) 进行预处理, 获取用于后续分析的有效数据 (Clean Data)。使用 SOAPdenovo 软件, 对有效数据进行组合, 以获得不连续长序列 (Scaffolds)。将组装得到的 Scaffolds 从 N 连接处打断, 得到不含 N 的序列片段, 称为 Scaffigs, 过滤掉 500 bp 以下的片段, 并进行统计分析和后续基因预测。

#### 1.3.2.3 基因预测、丰度分析、物种及功能注释

使用 MetaGeneMark 软件对每个样本的 Scaffigs (≥ 500 bp) 进行开放阅读框 (ORF) 预测, 然后使用 CD-hit 程序从预测的 ORF (≥ 100 nt) 中去除冗余部分, 以获得每个样品的非冗余的初始基因目录。继续使用 Bowtie2 软件将每个样本的读数与初始基因目录重新对齐获得最终用于后续分析的基因序列集合 (Unigenes)。基因的相对丰度通过使用测序序列的数量和基因长度进行计算。使用 Diamond 软件将 Unigenes 与从 NR\_Meta 数据库中抽提出的细菌、真菌、古菌和病毒序列进行比对注释 (采用生物大分子序列比对搜索工具, E 值 ≤ 1 × 10<sup>-5</sup>)。结合美国国家生物技术信息中心的物种分类系统, 获得了不同分类学层次的物种注释信息。同样, 通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库获得了 Unigenes 的功能注释。

## 1.4 统计学分析

使用 R 软件 (Version 4.1.2) 绘制主坐标分析 (PCoA) 和非度量多维尺度分析 (NMDS) 图。PCoA 使用 R 软件的 stats 和 ggplot2 软件包, NMDS 使用 R 软件的 vegan 软件包。使用 R 软件进行 β 多样性指数组间差异分析, 选用 *t* 检验和 Wilcoxon 检验。线性判别效应大小分析 (LEfSe) 用于寻找样本的生物标志物, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 数据质量控制

通过测序仪获得的原始数据存在一定比例低质量数据, 为了保证后续分析结果准确可靠, 需要对原始的测序数据进行预处理, 获取用于后续分析的有效数据, 预处理结果见表 1。Con 组的

表1 测序数据预处理结果

Table 1. Pre-processing results of sequencing data

样品名称	原始数据	原始基因片段	有效数据	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C碱基数量 (%)
OR <sub>1</sub>	6 949.98	46 333 196	6 896.37	97.29	92.31	47.32
OR <sub>2</sub>	6 300.87	42 005 814	6 258.83	97.39	92.56	47.27
OR <sub>3</sub>	6 614.17	44 094 498	6 586.11	97.56	93.00	47.83
OR <sub>4</sub>	6 555.53	43 703 530	6 530.78	97.34	92.47	47.49
Con <sub>1</sub>	6 603.91	44 026 076	6 566.92	97.35	92.50	46.48
Con <sub>2</sub>	6 265.83	41 772 174	6 238.98	97.48	92.85	48.78
Con <sub>3</sub>	7 012.35	46 748 990	6 989.09	97.44	92.70	46.53
Con <sub>4</sub>	6 580.61	43 870 710	6 562.33	97.38	92.39	46.66

每个样本平均有 6 615.68 个原始数据，经过质量控制平均获得了 6 589.33 个有效数据。OR 组的每个样本平均有 6 605.14 个原始数据，经过质量控制平均获得了 6 568.02 个有效数据。G+C 碱基数量占比约 47.00%，在所有文库中某一碱基质量值占全部碱基数的 20% (Q20) 不小于 97.20%，某一碱基质量值占全部碱基数的 30% (Q30) 不小于 92.30%，说明数据质量较好，可用于后续分析。

## 2.2 Con组和OR组大鼠肠道菌群组成

菌群组成可以直观反映菌群的基本特征。如图 1-A 所示，在门水平上本实验的两组大鼠肠道菌群组成相同，相对丰度排名前 10 的优势物种包括：厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、软壁菌门 (*Tenericutes*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、衣原体门 (*Chlamydiae*)、螺旋体门 (*Spirochaetes*)、迷踪菌门 (*Elusimicrobia*)、梭杆菌门 (*Fusobacteria*)。厚壁菌门是两组中相对丰度最高的物种，在 Con 组中占 44.40%，OR 组中占 50.29%；拟杆菌门是两组中第 2 丰富的物种，分别占 38.57% 和 32.00%；变形菌门是门水平上两组大鼠肠道中第 3 丰富的物种，分别占 0.81% 和 1.08%。虽然两组间丰度前 10 的菌门组成类别相同，但各菌门相对丰度存在差异。其中，与 Con 组大鼠相比，服用 OR 可以显著升高大鼠肠道放线菌门 (*Actinobacteria*) 相对丰度 ( $P < 0.05$ )。

在纲水平上，如图 1-B 所示，拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)、梭菌纲 (*Clostridia*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、厚壁菌纲 (*Negativicutes*)、 $\delta$ -

变形菌纲 (*Deltaproteobacteria*)、丹毒丝菌纲 (*Erysipelotrichia*)、放线菌纲 (*Actinobacteria*)、柔膜菌纲 (*Mollicutes*)、红蜻菌纲 (*Coriobacteriia*) 及  $\epsilon$ -变形菌纲 (*Epsilonproteobacteria*) 是两组大鼠肠道菌群相对丰度前 10 的优势物种，两者组成也相同。除拟杆菌纲和芽孢杆菌纲外，与 Con 组相比，OR 组大鼠肠道中上述优势物种相对丰度均升高，其中放线菌纲 (*Actinobacteria*) 相对丰度差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

如图 1-C 所示，在目水平上，拟杆菌目 (*Bacteroidales*)、梭菌目 (*Clostridiales*)、乳酸杆菌目 (*Lactobacillales*) 及氨基酸球菌目 (*Acidaminococcales*) 在两组中检出的相对丰度总和达 70% 以上。与 Con 组相比，OR 组肠道中双歧杆菌目 (*Bifidobacteriales*) 的相对丰度显著升高 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 Con组和OR组大鼠肠道菌群的多样性分析

$\beta$  多样性分析显示，两组大鼠的肠道菌群存在差异。PCoA 得出的结果如图 2-A 所示，在门水平上可以将两组实验动物的肠道菌群很好地分开，NMDS 在属水平上可以将两组大鼠的肠道菌群分开，如图 2-B 所示。提示 OR 改变了大鼠的肠道菌群结构。

## 2.4 Con组和OR组大鼠肠道菌群差异显著菌种

为了进一步探索组间肠道菌群的差异，使用 LEfSe 分析在各分类水平上寻找两组间在丰度上有显著差异的菌种，线性判别分析 (LDA) 阈值设为 3,  $P < 0.05$ ，共筛选出 35 个差异显著菌种。如图 3-A 所示，Con 组仅在种水平上找到了显著

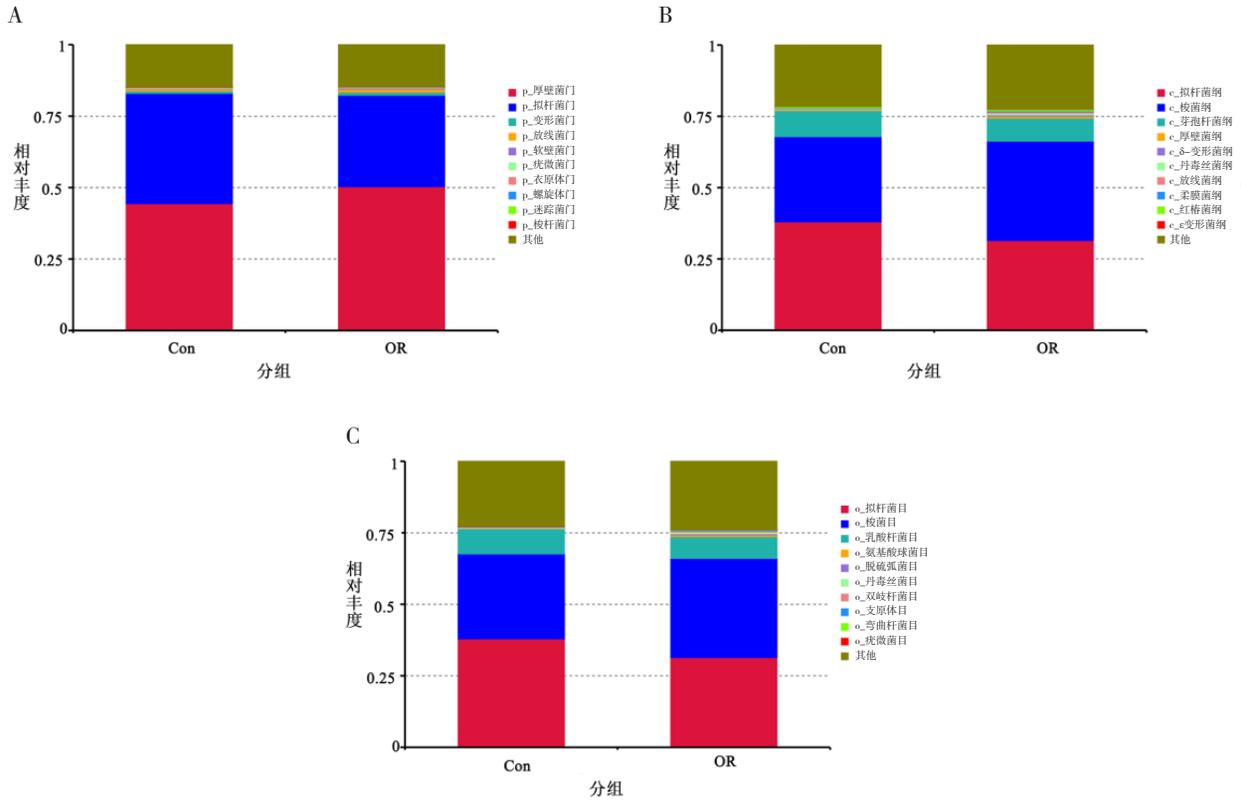


图1 门 (A)、纲 (B) 及目 (C) 水平两组物种相对丰度柱状图

Figure 1. Histograms of relative species abundance for the two groups: phylum (A), class (B) and order (C) levels

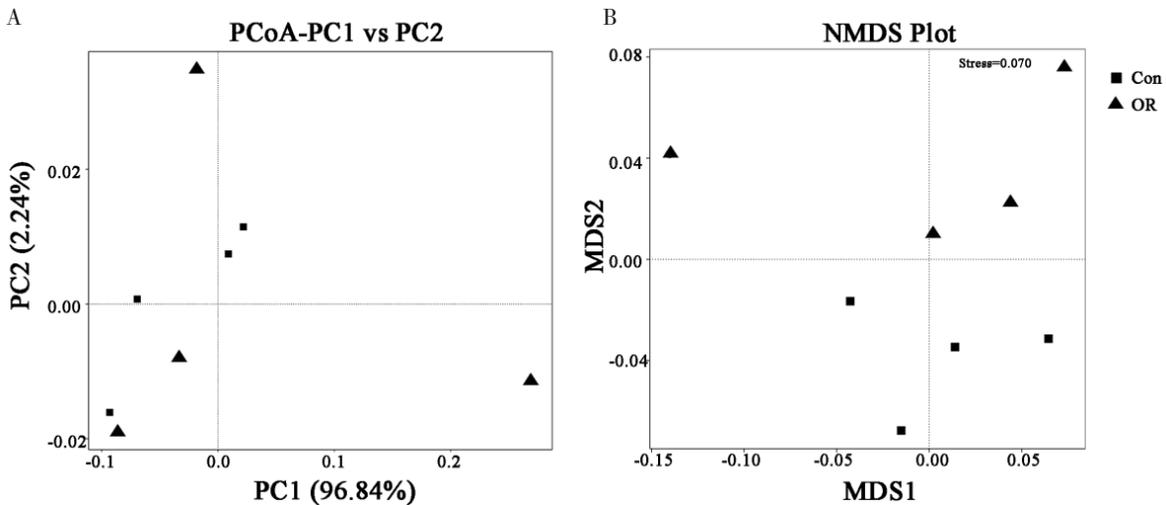


图2 两组的肠道菌群的多样性分析

Figure 2. Diversity analysis of the intestinal flora of the two groups

注：A为门水平上PCoA分析；B为属水平上NMDS分析

差异菌，而 OR 组在纲、属及种水平上均存在显著差异菌。其中 Con 组的显著差异菌主要包括普雷沃菌和产乙酸嗜蛋白质菌。OR 组的显著差异菌包括放线菌纲、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、

双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、孢杆菌属 (*Sporobacter*) 及种水平上的双歧杆菌、厚壁菌、沙门菌等，进化分支树显示放线菌纲是在 OR 组中起重要作用的菌群，如图 3-B 所示。

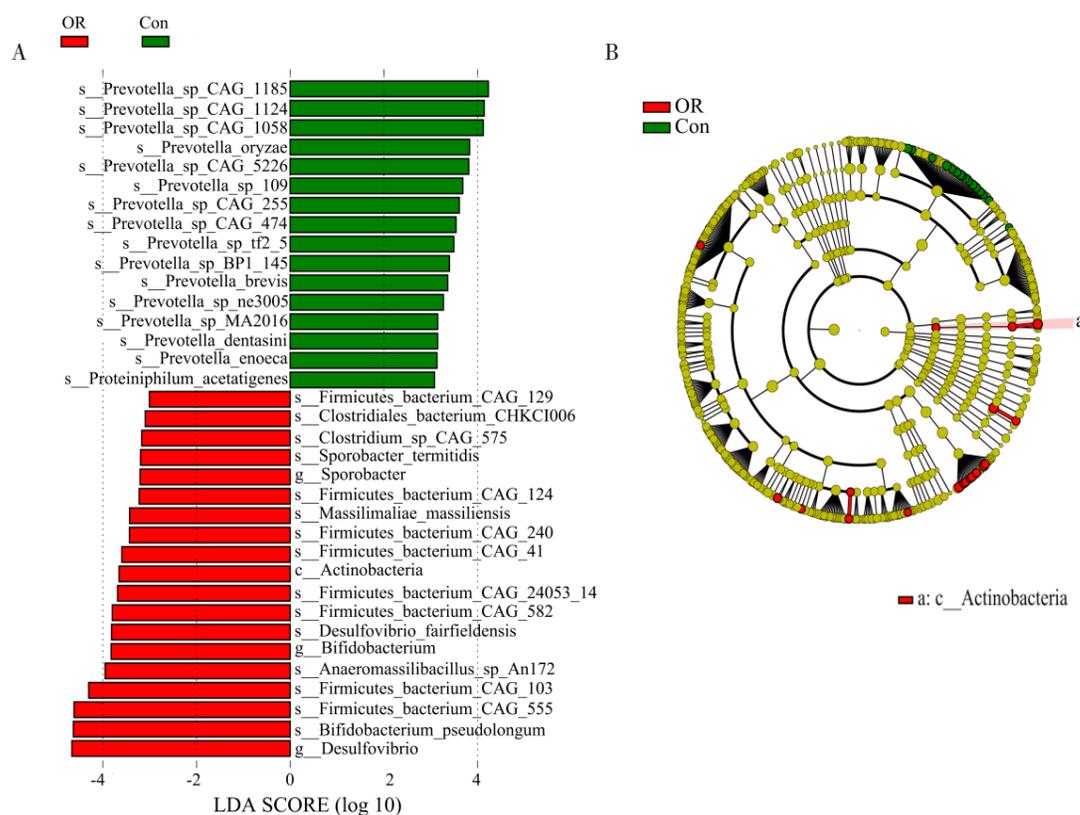


图3 两组LEfSe差异分析

Figure 3. Analysis of the differences in LefSe between two groups

注：A为LDA值分布柱状图；B为进化分支图

### 2.5 Con组和OR组大鼠肠道菌群KEGG数据库功能注释及富集分析

图 4-A 显示，在 Con 组和 OR 组中共检测到 1 596 634 个基因，其中 OR 组特有基因 212 022 个，Con 组特有基因 145 223 个。从 Unigenes 注释结果出发，绘制 KEGG 数据库中的注释基因数目统计图，如图 4-C 所示，被注释到信号转导（signal transduction）、复制和修复（replication and repair）以及折叠、分类和降解（folding, sorting and degradation）的基因数量排名前 3。此外，在 Level 1 水平上注释到新陈代谢类通路的基因最多，提示大鼠肠道内的菌群主要与能量获取相关。在 Level 2 水平上，绘制相对丰度前 35 通路的热图，如图 4-B 所示，两组大鼠肠道菌群主要富集到脂质代谢（lipid metabolism）、氨基酸代谢（metabolism of other amino acids）等通路。两组间差异分析显示，OR 组大鼠肠道菌群注释到免疫系统（immune system）、环境适应（environmental adaptation）及癌症（cancers）相关通路的相对丰度产生了变化。

## 3 讨论

### 3.1 OR可以改变大鼠肠道菌群结构及多样性

本研究在门、纲、目水平分析 Con 组与 OR 组大鼠肠道菌群组成，发现两组大鼠相对丰度排名前 10 的菌群种类相同，但是排名前 10 的菌群相对丰度值发生了变化，在门水平上 OR 可以显著升高放线菌门相对丰度，在纲水平上 OR 可以显著升高放线菌纲相对丰度，在目水平上 OR 可以显著升高双歧杆菌目相对丰度，表明 OR 是通过调节菌群的丰度变化进而影响大鼠肠道菌群的结构。放线菌是天然药物的重要来源，其代谢活性物质具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等活性，放线菌是新抗生素产生的主要来源<sup>[18]</sup>。此外放线菌也参与肠道的能量供应<sup>[19]</sup>、抗性淀粉的降解以及亚油酸转化为共轭亚油酸的过程，具有潜在的疾病治疗作用，如抗癌、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗肥胖和增强免疫功能<sup>[20]</sup>。双歧杆菌目归属于放线菌门下的放线菌纲，其可以从碳水化合物发酵

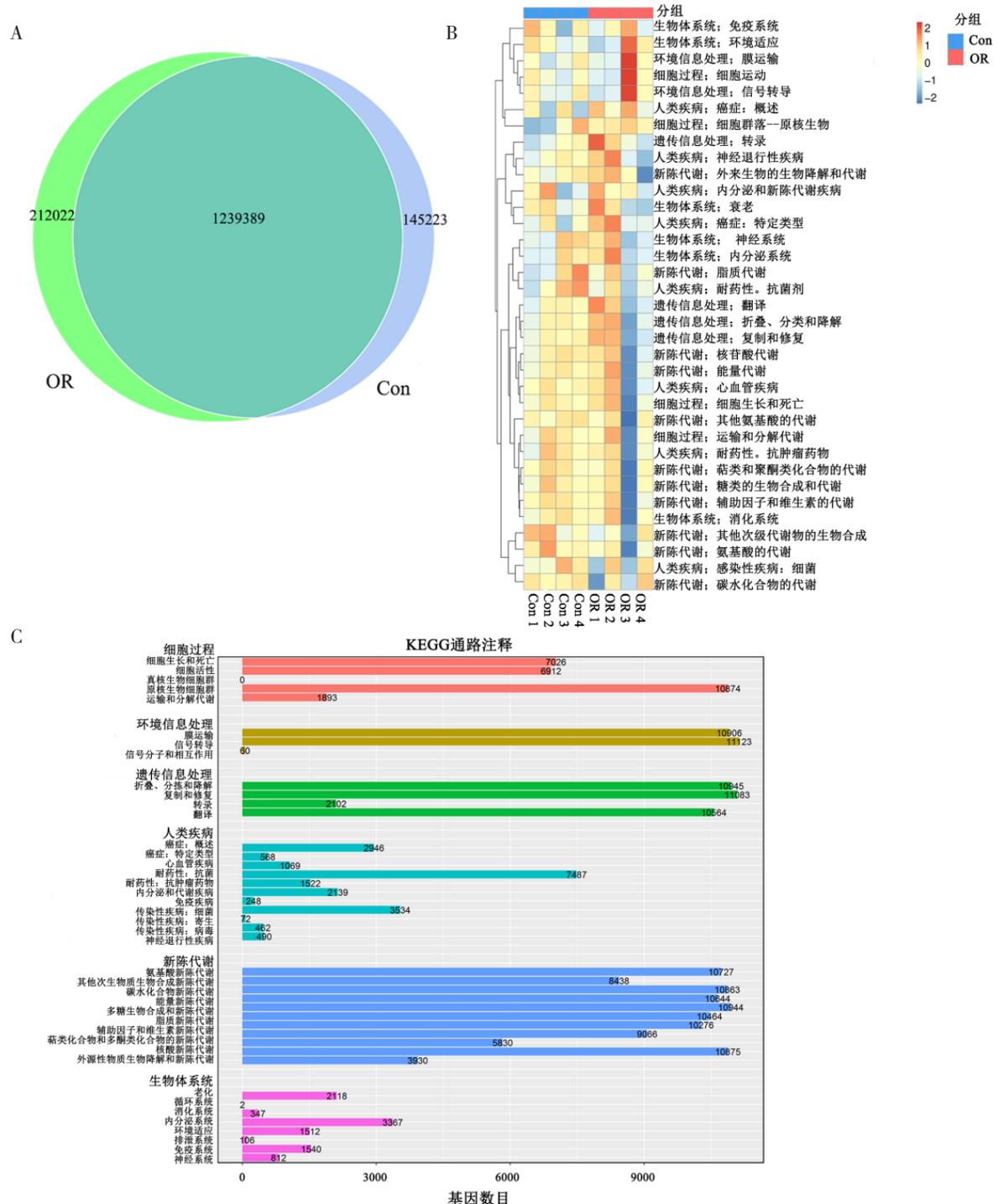


图4 两组KEGG功能注释及富集分析

Figure 4. Functional annotation and enrichment analysis of KEGG in both groups

注：A为韦恩图；B为聚类热图；C为KEGG数据库中的注释基因数目统计图

中产生短链脂肪酸<sup>[21]</sup>，进而获得乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐，高浓度的乙酸盐可以保护宿主免受肠道致病性感染。本研究提示OR可能通过升高大鼠肠道放线菌门、放线菌纲及双歧杆菌目的相对丰度，进而调节代谢、免疫抗炎相关功能使大鼠获益。

组间肠道菌群的LeFSe分析表明，Con组的显著差异菌是普雷沃菌和产乙酸嗜蛋白质菌，OR组的显著差异菌是放线菌纲、双歧杆菌属等。有报道<sup>[22]</sup>指出，普雷沃菌具有较强的复杂性多糖降解能力，可以增进宿主对单糖的吸收。产乙酸嗜蛋白质菌是一种厌氧、可水解蛋白的细菌。进一

步组间分析显示, OR 组普雷沃菌的相对丰度较高, 提示 OR 发挥作用可能是通过提高普雷沃菌丰度, 从而增强大鼠对糖类的降解与吸收能力。

### 3.2 OR可能调节免疫、环境适应及癌症相关通路

除了对大鼠肠道菌群进行物种注释及丰度分析外, 本研究还在 KEGG 数据库中对肠道菌群进行功能注释。KEGG 功能注释结果表明, 两组大鼠的肠道菌群均注释到与新陈代谢相关的基因, 通过影响脂质代谢、氨基酸代谢等与新陈代谢相关的通路发挥作用。进一步组间差异分析显示, 服用 OR 后注释到免疫系统、环境适应及癌症相关通路的相对丰度产生了变化, 提示 OR 的诸多生物学功能可能与上述通路有关, 但是本研究未能深入阐释 OR 调节大鼠代谢的分子生物学机制, 仍有待进一步深入研究。

综上所述, 本研究基于宏基因组学技术发现, OR 可以调节大鼠肠道菌群的结构和多样性, 并影响机体脂质及氨基酸代谢相关通路的功能, 这些影响可能是 OR 营养保健和治疗疾病的潜在机制。此外, 服用 OR 后大鼠的免疫系统、环境适应及癌症相关通路发生变化, 但 OR 与上述通路变化之间的具体关联尚不明确, 在后续研究中将会对此进行深入分析。

### 参考文献

- 1 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 247.
- 2 Zhang Y, Wang Y, Li M, et al. Traditional uses, bioactive constituents, biological functions, and safety properties of *Oviductus Ranae* as functional foods in China[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4739450. DOI: 10.1155/2019/4739450.
- 3 郭宪一, 范红艳. 林蛙油的药理作用研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(3): 209–211. [Guo XY, Fan HY. Progress of research on the pharmacological effects of forest frog oil[J]. *Journal of Jilin College of Medicine*, 2020, 41(3): 209–211.] DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2020.03.022.
- 4 姜大成, 高雅, 肖井雷, 等. 本草辨误——哈士蟆与《本草图经》山蛤渊源考证 [J]. 中药材, 2021, 44(6): 1516–1521. [Jiang DC, Gao Y, Xiao JL, et al. The origin of the mountain clam in the *Materia Medica* and the *Materia Medica Tujing*[J]. *Chinese Medicinal Materials*, 2021, 44(6): 1516–1521.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.06.041.
- 5 逯通, 周博宇, 孟令仪, 等. 人参、林蛙油的营养功效研究进展 [J]. 中国卫生工程学, 2019, 18(6): 958–960. [Lu T, Zhou BY, Meng LY, et al. Research progress on the nutritional efficacy of ginseng and forest frog oil[J]. *China Health Engineering*, 2019, 18(6): 958–960.] DOI: 10.19937/j.issn.1671-4199.2019.06.064.
- 6 张傲, 张悦, 陈缘, 等. 东北林蛙油研究进展 [J]. 养殖与饲料, 2020, (1): 68–71. [Zhang A, Zhang Y, Chen Y, et al. Progress of research on northeastern forest frog oil[J]. *Farming and Feeding*, 2020, (1): 68–71.] DOI: 10.13300/j.cnki.cn42-1648/s.2020.01.025.
- 7 Teng M, Zhao X, Wang C, et al. Polystyrene nanoplastics toxicity to zebrafish: dysregulation of the brain–intestine–microbiota axis[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(5): 8190–8204. DOI: 10.1021/acsnano.2c01872.
- 8 Zhang HY, Tian JX, Lian FM, et al. Therapeutic mechanisms of traditional Chinese medicine to improve metabolic diseases via the gut microbiota[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110857. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110857.
- 9 Zhang S, Lin L, Liu W, et al. Shen–Ling–Bai–Zhu–San alleviates functional dyspepsia in rats and modulates the composition of the gut microbiota[J]. *Nutr Res*, 2019, 71: 89–99. DOI: 10.1016/j.nutres.2019.10.001.
- 10 Wu C, Zhao Y, Zhang Y, et al. Gut microbiota specifically mediates the anti–hypercholesterolemic effect of berberine (BBR) and facilitates to predict BBR's cholesterol–decreasing efficacy in patients[J]. *J Adv Res*, 2022, 37: 197–208. DOI: 10.1016/j.jare.2021.07.011.
- 11 Yin S, Sun C, Ji Y, et al. Herbal medicine WangShiBaoChiWan improves gastrointestinal health in mice via modulation of intestinal tight junctions and gut microbiota and inhibition of inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111426. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111426.
- 12 Gong X, Li X, Bo A, et al. The interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional Chinese medicines: a review[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104824. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104824.
- 13 Chen YZ, Yuan MY, Chen YL, et al. The gut microbiota and traditional Chinese medicine: a new clinical frontier

- on cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(11): 1222–1231. DOI: 10.2174/1389450122666210412141304.
- 14 Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project[J]. *Nature*, 2017, 550(7674): 61–66. DOI: 10.1038/nature23889.
- 15 New FN, Brito IL. What is metagenomics teaching us, and what is missed?[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2020, 74: 117–135. DOI: 10.1146/annurev-micro-012520-072314.
- 16 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069–1072. [Huang JH, Huang XH, Chen ZY, et al. Equivalent dose conversion between animals and between animals and humans in pharmacological tests[J]. *Chinese Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 9(9): 1069–1072.] DOI: 10.3969/j.issn.1009-2501.2004.09.026.
- 17 成金乐, 赖智填, 彭丽华. 中药破壁饮片研究 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2014, 16(2): 254–262. [Cheng JL, Lai ZF, Peng LH. Research on wall-broken drinking tablets of Chinese medicine[J]. *World Science and Technology - Modernization of Chinese Medicine*, 2014, 16(2): 254–262.] DOI: 10.11842/wst.2014.02.008.
- 18 Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(1): 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.
- 19 Rivière A, Gagnon M, Weckx S, et al. Mutual cross-feeding interactions between bifidobacterium longum subsp. longum NCC2705 and Eubacterium rectale ATCC 33656 explain the bifidogenic and butyrogenic effects of arabinoxylan oligosaccharides[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(22): 7767–7781. DOI: 10.1128/AEM.02089-15.
- 20 Kim JH, Kim Y, Kim YJ, et al. Conjugated linoleic acid: potential health benefits as a functional food ingredient[J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016, 7: 221–244. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033028.
- 21 Hardy H, Harris J, Lyon E, et al. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology[J]. *Nutrients*, 2013, 5(6): 1869–1912. DOI: 10.3390/nu5061869.
- 22 Tang S, Xin Y, Ma Y, et al. Screening of microbes associated with swine growth and fat deposition traits across the intestinal tract[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 586776. DOI: 10.3389/fmicb.2020.586776.

收稿日期: 2022年11月01日 修回日期: 2023年05月24日  
本文编辑: 钟巧妮 周璐敏