

抗生素和低聚半乳糖干预对大鼠行为和神经递质的影响

韩水兵, 刘晓英, 刘子昱, 潘龙*, 慕春龙, 朱伟云

南京农业大学 动物科技学院, 消化道微生物研究室, 江苏省消化道营养与动物健康重点实验, 动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京

韩水兵, 刘晓英, 刘子昱, 潘龙, 慕春龙, 朱伟云. 抗生素和低聚半乳糖干预对大鼠行为和神经递质的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 655-670.

HAN Shuibing, LIU Xiaoying, LIU Ziyu, PAN Long, MU Chunlong, ZHU Weiyun. Effects of antibiotics and galacto-oligosaccharide on behaviors and neurotransmitters in rats[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 655-670.

摘要: 低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)作为益生元可以调节肠道菌群, 改善大脑发育; 相反, 抗生素可以通过干扰肠道菌群影响神经系统。然而, 抗生素和低聚半乳糖如何调节大脑神经递质及动物行为尚不清楚。【目的】以断奶 SD (Sprague-Dawley, SD)大鼠为试验动物, 探究抗生素和低聚半乳糖干预对动物行为和神经递质的影响。【方法】选取 40 只 3 周龄雄性 SD 大鼠, 分为 4 组: 对照组(CON 组)、抗生素组(ABX 组)、低聚半乳糖组(GOS 组)和抗生素+低聚半乳糖组(AG 组)。对照组饮用灭菌水, 其余三组饮用含有抗生素、低聚半乳糖或抗生素+低聚半乳糖的灭菌水, 其中低聚半乳糖浓度为 5 g/L, 抗生素由氨苄青霉素、万古霉素、盐酸环丙沙星、亚胺培南、甲硝唑组成, 试验为期 16 d。【结果】与 GOS 组相比, ABX 组大鼠体重显著降低($P<0.05$); ABX、GOS、AG 三组肝脏指数显著低于 CON 组($P<0.05$); 大鼠行为分析显示, 与 CON 组相比, ABX 组趋光性指数(明暗箱试验中明箱时间占比)和理毛次数显著降低($P<0.05$), GOS 组理毛次数显著低于 CON 组($P<0.05$)。AG 组在旷场的静止时间显著高于其他三组($P<0.05$), 运动距离、时间和运动速度显著低于 ABX 和 GOS 两组($P<0.05$)。与 CON 组相比, ABX 组海马体去甲肾上腺素的浓度显著增加, 左旋多巴浓度显著降低($P<0.05$); 与 CON 组相比, 含有低聚半乳糖的 GOS 和 AG 两组去甲肾上腺素浓度显著增加($P<0.05$), 而左旋多巴和肾上腺素浓度显著下降($P<0.05$)。与 CON 组相比, ABX 和 AG 组的微生物多样性下降($P<0.05$), *Escherichia Shigella* 是 ABX、AG 两组的优势菌, GOS 组的 Chao1 指数显著低于对照组($P<0.05$), GOS 组优势菌主要是厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*); 与 ABX 组相比, AG 组乳杆菌属(*Lactobacillus*)

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1300403); 国家自然科学基金(31902166)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300403) and the National Natural Science Foundation of China (31902166).

*Corresponding author. E-mail: panlong@njau.edu.cn

Received: 2024-03-09; Accepted: 2024-06-07; Published online: 2024-12-26

显著增加($P<0.05$)。【结论】与对照组相比, 抗生素会减少焦虑样行为, 同时降低海马神经递质左旋多巴胺、增加去甲肾上腺素, 并增加潜在致病菌; 低聚半乳糖改善了大鼠生长, 对大鼠行为无明显影响, 但增加了 *Lactobacillus* 丰度, 并减少海马左旋多巴胺和肾上腺素; 联合使用抗生素和低聚半乳糖降低大鼠运动能力, 增加焦虑样行为。

关键词: 抗生素; 低聚半乳糖; 肠道微生物; 社交行为; 神经递质

Effects of antibiotics and galacto-oligosaccharide on behaviors and neurotransmitters in rats

HAN Shuibing, LIU Xiaoying, LIU Ziyu, PAN Long*, MU Chunlong, ZHU Weiyun

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

Abstract: Galacto-oligosaccharides (GOS) as prebiotics can regulate gut microbiota to improve brain development, whereas antibiotics can affect the nervous system by interfering with gut microbiota. The mechanisms of antibiotics and GOS in regulating brain neurotransmitters and animal behaviors remain unknown. **[Objective]** To investigate the effects of antibiotics and GOS on the behaviors and neurotransmitters in weaned Sprague-Dawley (SD) rats. **[Methods]** Forty 3-week-old male SD rats were selected and assigned into four groups: control (CON, sterilized water), antibiotics (ABX), GOS (5 g/L), and antibiotics+GOS (AG). The antibiotics used in the experiment were composed of ampicillin, vancomycin, ciprofloxacin hydrochloride, imipenem, and metronidazole. The experiment lasted for 16 days. **[Results]** The body weight of rats in the ABX group was lower than that in the GOS group ($P<0.05$), and the liver index in the ABX, GOS, and AG groups was lower than that in the CON group ($P<0.05$). Compared with the CON group, the ABX group showcased decreased phototaxis index (percentage of time in bright during bright-dark box test) and reduced times of self-grooming ($P<0.05$), and the GOS group had reduced times of self-grooming ($P<0.05$). The AG group had longer resting time in the open field than the other three groups ($P<0.05$) and shorter distance, shorter time, and slower movement than ABX and GOS groups ($P<0.05$). Compared with the CON group, the ABX group showcased elevated level of norepinephrine and lowered level of levodopa in the hippocampus ($P<0.05$). Compared with the CON group, the GOS and AG groups demonstrated elevated levels of norepinephrine and declined levels of levodopa and epinephrine ($P<0.05$). Compared with the CON group, the ABX and AG groups presented decreased microbial diversity ($P<0.05$), where *Escherichia Shigella* became dominant. The Chao1 index in the GOS group was lower than that in the CON group ($P<0.05$). The dominant bacteria in the GOS group were *Firmicutes* and *Bacteroidota*. Compared with that in the ABX group, the relative abundance of *Lactobacillus* increased in the AG group ($P<0.05$). **[Conclusion]** ABX decreased anxiety-like behaviors compared with CON, while reducing

levodopa and increasing norepinephrine in the hippocampus and enriching potentially pathogenic bacteria. GOS improved growth without influencing the behaviors of rats, and meanwhile it increased the relative abundance of *Lactobacillus* and decreased levodopamine and norepinephrine in the hippocampus. The combined use of ABX and GOS decreased the locomotor activity and increased the anxiety-like behaviors of rats.

Keywords: antibiotics; galacto-oligosaccharides (GOS); gut microbiota; social behavior; neurotransmitters

低聚半乳糖是一种复杂的碳水化合物, 能够到达后肠, 并诱导后肠碳水化合物降解菌的丰度改变^[1], 从而增加有益菌(如乳酸杆菌和双歧杆菌)的相对丰度^[2]。因此, 低聚半乳糖常被作为一种益生元物质广泛使用。Mcevy 等和 Arnold 等发现膳食中补充低聚半乳糖可以改变微生物结构和宿主基因表达, 主要表现为糖酵解菌(拟杆菌和乳酸杆菌)的丰度增加, 并伴随肠道屏障功能的改善^[3-4], 但低聚半乳糖对动物行为的影响尚不清楚。相反, 抗生素能够影响肠道菌群结构。大量研究发现, 抗生素引起的菌群紊乱会通过微生物-肠-脑轴影响行为^[5], 还可以通过影响神经系统导致其他神经疾病的发生^[6]。目前, 关于抗生素与低聚半乳糖的研究主要聚焦于成年动物, 而对于动物早期阶段的相关研究尚显不足。至于低聚半乳糖是否能有效缓解断奶大鼠因菌群紊乱所导致的神经化学及行为变化, 目前尚缺乏明确结论。

抗生素和低聚半乳糖常被添加在饲料或者动物饮水中, 用来治疗和预防动物疾病。抗生素和低聚半乳糖首先进入胃肠道, 调节肠道生理功能。胃肠道的微生物种类复杂^[7], 基因组数量庞大^[8-9]。大量研究表明, 抗生素和低聚半乳糖参与胃肠道微生物组成的调节。例如, 研究发现经过低聚半乳糖和低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS) 2 种益生元联合治疗后, 小鼠肠道中阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)和拟杆菌属丰度增加, 同时大肠中短链脂肪酸

(short-chain fatty acids, SCFAs)含量上升, 血浆色氨酸水平降低^[10]。据此推测, 低聚半乳糖可能通过增加 SCFAs 来减少抑郁样和焦虑样行为。无菌动物、抗生素干预^[11]和益生菌干预是试验中调控微生物群的主要手段, 常用于研究微生物-肠-脑轴的双向信号在神经疾病中的调节机制(如自闭症谱系障碍^[12]、帕金森病^[13]、癫痫^[14]等)中的调节机制, 以及肠道疾病与肠道微生物的关系等。研究表明, 抗生素和低聚半乳糖通过微生物介导的途径参与神经炎症免疫激活、迷走神经信号传导^[15]、血清素的调节^[16], 以及具有神经活性潜能代谢物的产生, 进一步影响神经行为。

为了研究早期肠道菌群改变与动物神经行为变化之间的关系, 本研究选用断奶的 SD (Sprague-Dawley) 大鼠作为试验对象。在断奶 1 周后, 这些大鼠饮用含低聚半乳糖和抗生素的灭菌水, 通过分析大鼠的社交行为、运动行为和焦虑行为, 并结合海马神经递质分析, 旨在阐明低聚半乳糖和抗生素干预对大鼠行为表现以及神经递质合成产生的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物和分组

试验动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 共 40 只雄性 3 周龄 SD 大鼠, 于南京农业大学动物医学院试验动物中心饲养, 适应 1 周后按体重平均分配到 4 个组。(1) CON

组；(2) ABX 组，包含氨苄青霉素 1 g/L、万古霉素 500 mg/L、盐酸环丙沙星 20 mg/L、亚胺培南 250 mg/L、甲硝唑 1 g/L，选用多种类型抗生素^[17]减少肠道微生物^[18]，浓度参考 Hoban 等^[19]的方案，并根据 Wong 等^[20]的方案做了试验时间的调整；(3) GOS 组，包括低聚半乳糖 5 g/L，参考 Hong 等^[21]结果，该浓度与母乳和配方奶粉中浓度大致接近^[22]；(4) AG 组，包括氨苄青霉素 1 g/L、万古霉素 500 mg/L、盐酸环丙沙星 20 mg/L、亚胺培南 250 mg/L、甲硝唑 1 g/L、低聚半乳糖 5 g/L，均溶解于灭菌水中，大鼠自由饮用，饲料为协同生物试验鼠维持饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司)。试验期为 16 d，试验期间测定大鼠的体重，分别在第 4 天、第 9 天使用血糖仪测定尾尖静脉血糖，并在试验中进行行为试验测定，动物试验获得南京农业大试验动物福利与伦理委员会审批许可(审核编号：NJAU.No 20211129181)。

1.2 旷场测试(open field test, OFT)

在第 1 天和第 13 天进行旷场测试。旷场测试是一种评估啮齿动物运动能力和焦虑水平的技术手段，广泛应用于精神疾病药物研发，动物在 24 h 内有其活动周期，试验均在白天(12 h 内)进行。测试使用白色中空板制作的 60 cm×60 cm×40 cm 的旷场试验箱，在安静自然光照条件下，试验前使用酒精喷洒并用纸巾擦拭试验箱，确保干净无异味，大鼠提前放于试验箱适应一段时间。将大鼠置于旷场试验箱中心，在安静环境下采集 10 min 行为视频^[19]，使用 Ethovision 软件对动物行为进行分析。

1.3 明暗箱测试(light-dark test, LDT)

试验在第 2 天和第 12 天进行，采用 2 个 50 cm×50 cm×30 cm 的试验箱(黑色和白色)连接组成，中间隔板开一扇门，允许大鼠自由通过，暗箱用盖板遮光，允许大鼠适应 10 min。然后

将大鼠放置在明箱中央，在安静环境下采集第 2 天和第 12 天的视频进行行为分析。

1.4 三箱社交试验(three-chamber sociability test)

试验在第 3 天和第 13 天进行，三室是由 3 个 60 cm×40 cm×40 cm 的矩形盒子组成，中间两块透明隔板，底部各有一扇门允许大鼠通过，两边的盒子放各放一铁丝网小笼，试验主要分 3 个阶段。第一阶段适应期：测试大鼠放于中间盒子 10 min，此时小门关闭记录大鼠理毛行为；第二阶段社交测试：一侧的小笼放入一只陌生大鼠 1，另一侧小笼空置，小门打开使大鼠自由探索 10 min；第三阶段社交偏好测试：在第二阶段空置的小笼放入陌生大鼠 2，让中间测试大鼠自由探索 10 min，采集每个阶段录制的视频进行分析。

1.5 样品采集及处理

在第 16 天试验结束后，采用二氧化碳麻醉，然后断颈处死，在肝静脉使用针管抽取血液，用于测定血糖浓度，剩余血液静置 1–2 h 后，以 3 000 r/min 离心 15 min，吸取上层血清并保存于–80 °C 冰箱中，收集大鼠器官组织样品称重，并采集部分样品进行保存，对海马体组织样品于冰上采集后，立即于–80 °C 冰箱保存。

1.6 血清生化指标测定方法

使用血糖仪[雅培贸易(上海)有限公司]测定静脉血糖浓度，于肝静脉采集的血液经离心后取部分血清，使用 AU5800 全自动生化分析仪(Beckman Coulter 有限公司)测定血清生化指标。

1.7 结肠食糜微生物 16S rRNA 基因测序

使用 EZNA[®] DNA 粪便试剂盒(Omega Bio-Tek 公司)提取结肠食糜 DNA，使用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 907R

(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'), 通过 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区域。PCR 反应体系 (20 μ L): 5 \times FastPfu 缓冲液 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物 (5 μ mmol/L) 各 0.8 μ L, FastPfu 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 然后对扩增产物进行免疫荧光定量, 将扩增得到的产物用于文库构建和测序, 对测序数据进行筛选, 使用 QIIME 2 软件对高质量测序数据进行分析, 利用 RDP 分类器 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 分析每个 16S rRNA 基因序列 (此处称为 amplicon sequence variant, ASV)。与 Silva (SSU132) 16S rRNA 基因数据库比对, 获得相关微生物丰度注释表和序列。最后通过 MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) 在线分析平台进行数据处理, 将得到的数据进行分析作图。

1.8 海马体神经递质检测

海马体神经递质采用 Xu 等^[23]的测定方法: 使用高效液相色谱和质谱联用 (LC-MS/MS) 方法, 并优化色谱分离时间等参数, 以此提高检测的灵敏度, 进而提高神经递质测定的准确性, 该方法用于测定海马体中酪氨酸 (tyrosine, Tyr)、酪胺 (tyramine, TyrA)、左旋多巴 (levodopa, DOPA)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、肾上腺素 (epinephrine, E)、乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 的含量。

1.9 统计分析

数据经过 Excel 计算整理后, 使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析和可视化, 分析方法采用单因素方差分析, LSD 法进行事后多重比较, 使用 Kruskal-Wallis 检验对细菌相

对丰度进行分析, $P < 0.01$ (**) 表示差异极显著, $P < 0.05$ (*) 表示差异显著, 为了显示具有显著差异趋势结果, 将 $0.05 < P < 0.1$ 的数据在图中标注具体 P 值。

2 结果与分析

2.1 体重和器官指数的变化

抗生素和低聚半乳糖对断奶大鼠体重和器官指数的影响如图 1 所示。在整个试验期间, GOS 组大鼠体重高于其他三组, ABX 组大鼠体重显著低于 GOS 组 ($P < 0.05$, 图 1A); 与 CON 组相比, ABX 组大鼠的平均日增重有降低趋势 ($P = 0.07$, 图 1B)。抗生素和低聚半乳糖对心脏、脾脏指数无显著影响 (图 1C、1E)。与 CON 组相比, ABX、GOS、AG 三组的肝脏指数均显著降低 ($P < 0.05$, 图 1D)。GOS 组大脑指数有低于 ABX 组的趋势 ($P = 0.07$, 图 1F)。

2.2 血清生化指标和血糖

血清生化测定结果显示 (图 2A-2E), 抗生素和低聚半乳糖处理对血清中天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、葡萄糖 (glucose, GLU)、钙 (calcium, Ca) 和尿素 (urea) 无明显影响, 抗生素和低聚半乳糖对第 9 天尾尖静脉血糖和第 16 天肝静脉血糖无显著影响 (图 2F、2H), 仅在第 4 天时, 相比于 CON 组, 其他三组处理使得血糖有下降趋势 ($0.05 < P < 0.1$, 图 2G)。

2.3 旷场试验

在试验第 1 天发现, 4 个组之间的运动距离和平均运动速度均无显著差异 (图 3A、3B)。经过抗生素和低聚半乳糖处理后 11 d 时, 行为分析数据分析显示, 与 CON 组比较, ABX、GOS、AG 三组运动距离、平均速度、运动时间均无差异 (图 3C-3E), 但是联合使用抗生素和低

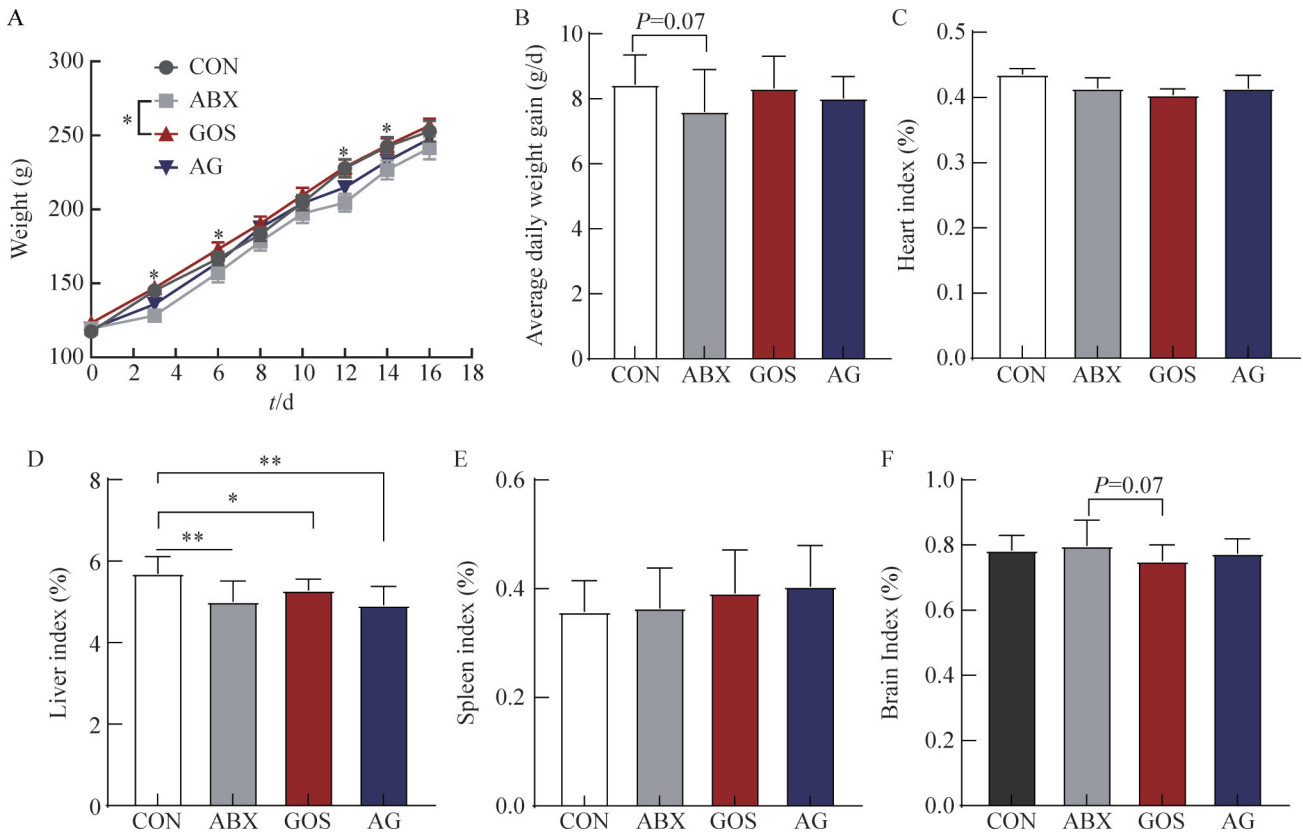


图1 动物试验和大鼠体重、器官指数变化。A: 体重变化; B: 平均日增重; C: 心脏指数; D: 肝脏指数; E: 脾脏指数; F: 大脑指数。所有数值均为平均值 \pm SEM, 进行了单因素方差分析和费歇尔LSD检验的多重比较。星号表示差异具有统计学意义, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。CON: 对照组; ABX: 抗生素; GOS: 低聚半乳糖; AG: 抗生素+低聚半乳糖组; 含量见试验设计, 下同。

Figure 1 Animal testing and changes in body weight and organ indices in rats. A: Body weight change; B: Average daily weight gain; C: Heart index; D: Liver index; E: Spleen index; F: Brain index. All values are means \pm SEM. One-way ANOVA and Fisher's LSD test for multiple comparisons were performed. Asterisks indicate statistically significant differences. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. CON: Control group; ABX: Antibiotics; GOS: Galacto-oligosaccharides; AG: Antibiotics+GOS group; See experimental design for content, the same below.

聚半乳糖的AG组运动距离、平均速度、运动时间都显著低于ABX组和GOS组的大鼠(图3C-3E, $P < 0.05$)。另外AG组大鼠的静止休息时间明显低于其他三组(图3F, $P < 0.05$)，大鼠的移动热图也可以看到AG组大鼠多停留在角落(图3G)。

2.4 明暗箱和三箱社交试验

明暗箱试验中, 试验处理的第2天发现, 各组大鼠穿越明暗箱的频率和趋光性指数(大鼠

停留在明箱和暗箱的时间比值)无显著的差异($P > 0.05$, 图4A、4B)。在试验第12天, 与CON组相比, ABX组的趋光性指数、理毛次数显著降低($P < 0.05$, 图4D、4E), 穿越明暗箱无显著差异; 与CON组相比, GOS组理毛次数下降($P < 0.05$, 图4E), 理毛的时间未见显著变化($P > 0.05$, 图4F); 与CON、GOS组相比, AG组穿越频率和趋光性指数也发生了显著降低($P < 0.05$, 图4C、4D)。大鼠更偏向于有大鼠或者已熟悉

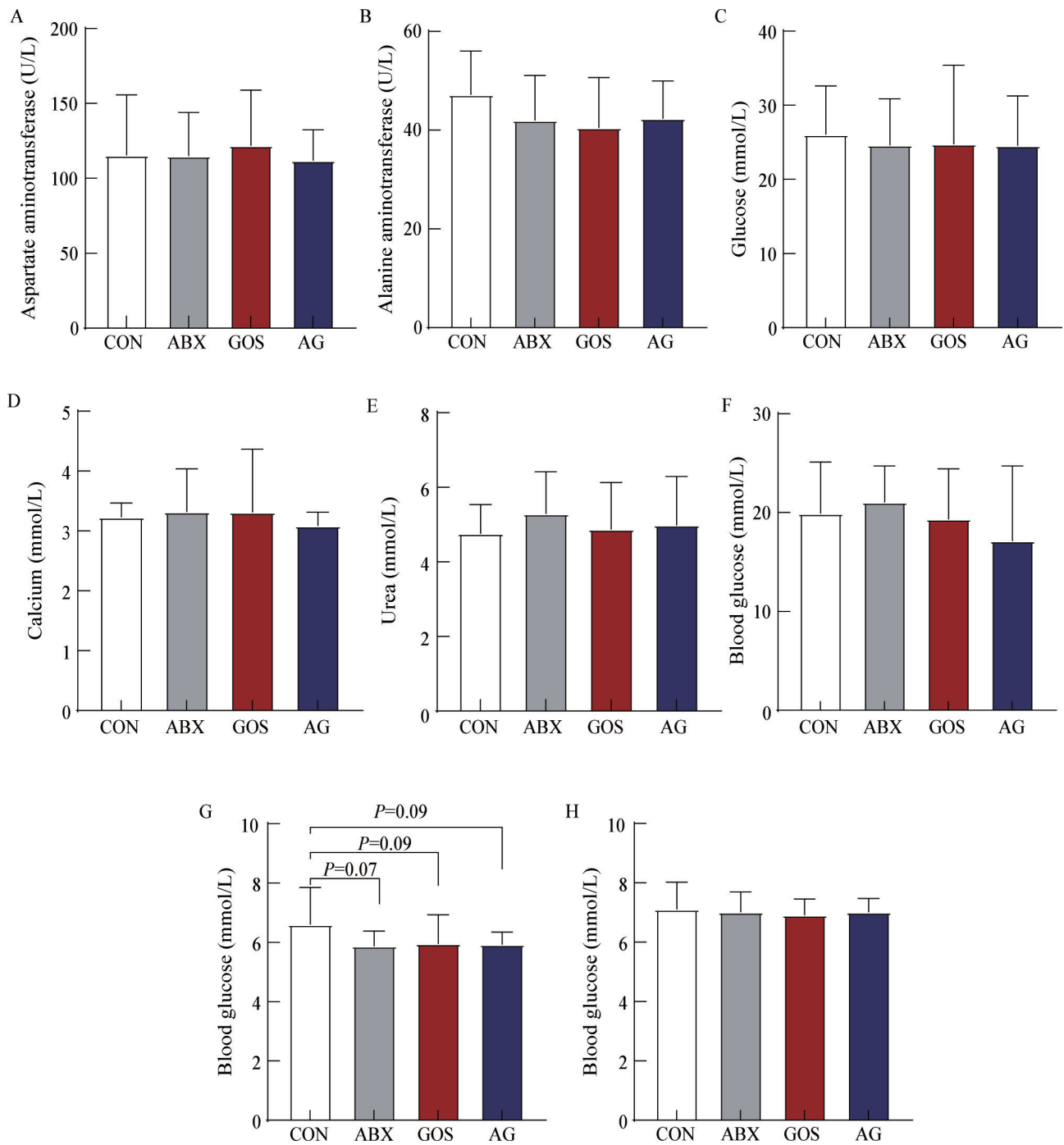


图2 抗生素和低聚半乳糖对大鼠常规血清生化指标的影响。A: 天冬氨酸氨基转移酶, AST; B: 丙氨酸氨基转移酶, ALT; C: 葡萄糖, GLU; D: 钙, Ca; E: 尿素, Urea; F: 第16天肝静脉血糖; G、H: 分别为第4天、第9天尾尖静脉血糖。

Figure 2 Effect of antibiotics and GOS on routine serum biochemical indices in rats. A: Aspartate aminotransferase, AST; B: Alanine aminotransferase, ALT; C: Glucose, GLU; D: Calcium, Ca; E: Urea; F: Hepatic vein glucose on day 16; G, H: Tail-tip vein glucose on day 4, day 9, respectively.

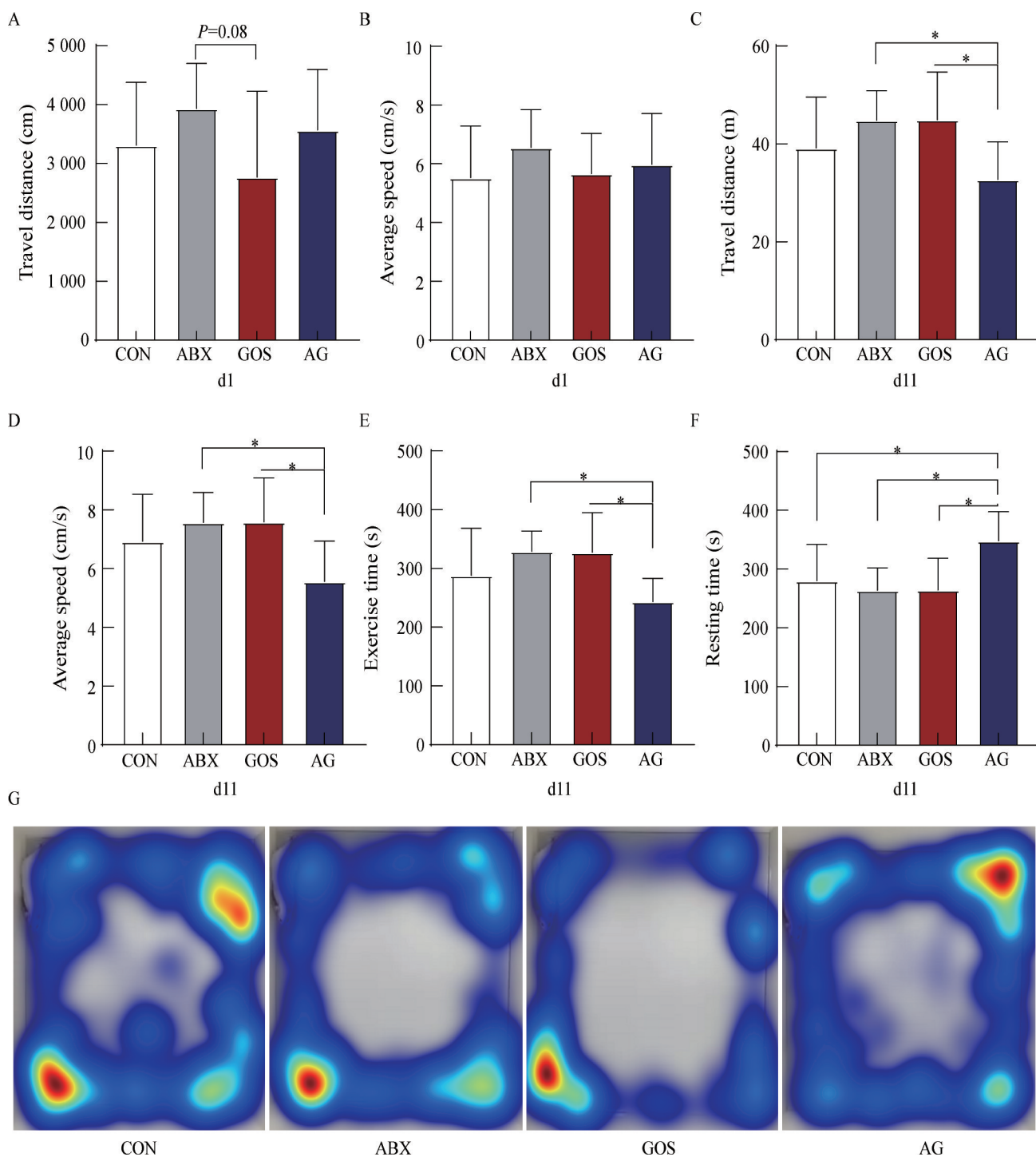


图3 旷场试验。预试验：A：总移动距离；B：平均移动速度。正式试验：C：总移动距离；D：平均移动速度；E：运动时间；F：休息时间；G：运动热图。

Figure 3 Open field test. Pre-experiment: A: Total distance traveled; B: Average speed of movement. Formal experiment: C: Total distance traveled; D: Average moving speed; E: Exercise time; F: Resting time; G: Exercise heat map.

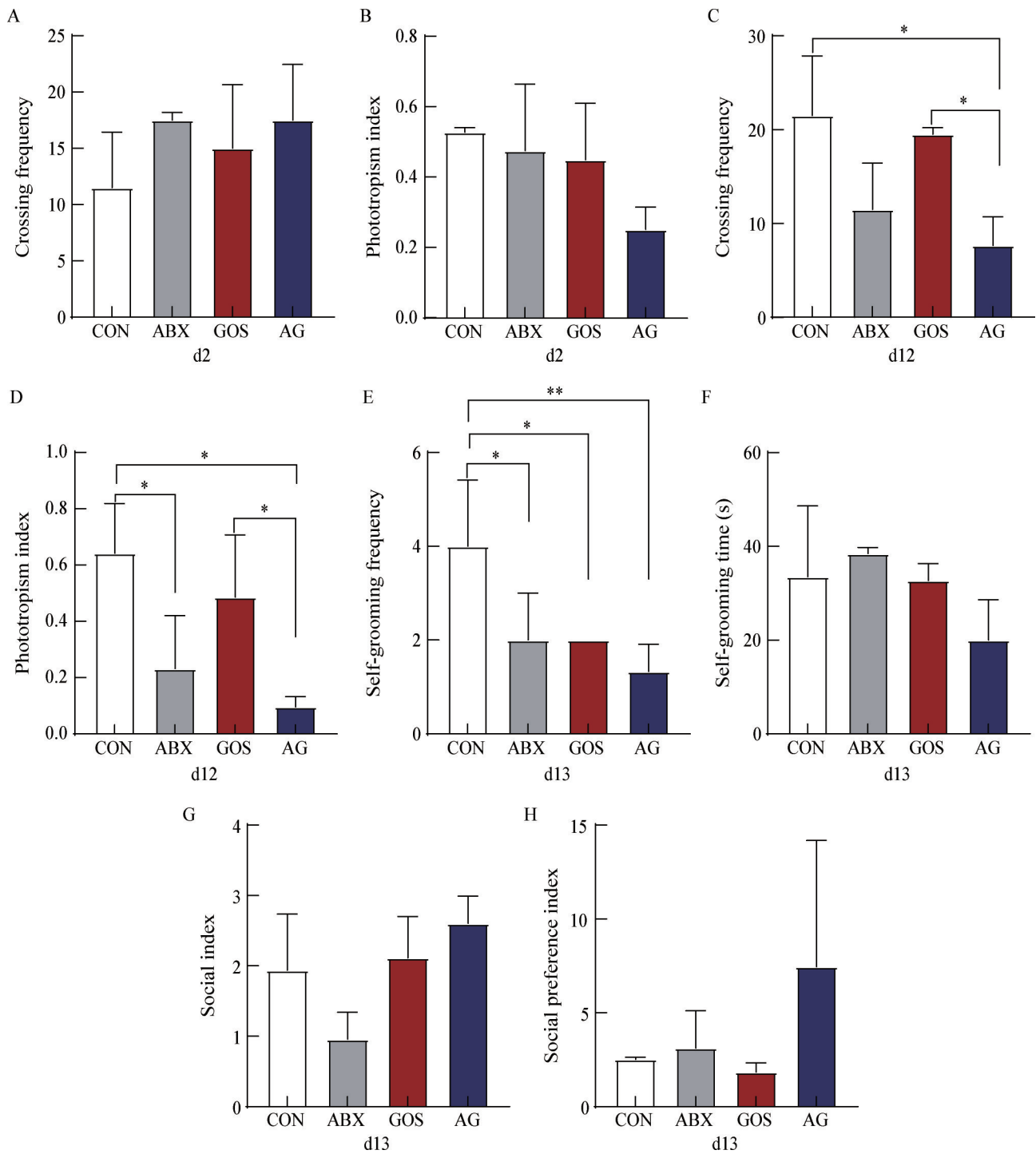


图4 明暗箱试验。预试验：A：穿越频率；B：趋光性指数。正式试验：C：穿越频率；D：趋光性指数；三箱社交测试-E：理毛频率；F：理毛时间；G：社交指数；H：社会偏好指数。

Figure 4 Light and dark box tests. Pre-experiment: A: Crossing frequency; B: Phototropic index. Formal test: C: Crossing frequency; D: Phototropic index; Three-box socialization test-E: Self-grooming frequency; F: Self-grooming time; G: Socialization index; H: Social preference index.

大鼠的箱室，而不是无大鼠的箱室。在社交测试中，社交指数(测试大鼠接触大鼠箱室和空箱室时间比值)在各组之间无显著差异($P>0.05$, 图 4G、4H)。

2.5 海马体神经递质

大鼠海马体神经递质测定结果显示，ABX 组和低聚半乳糖处理组对酪氨酸均无明显的影响($P>0.05$, 图 5A)。与 CON 组相比，GOS 组酪胺浓度呈下降的趋势($0.05<P<0.1$, 图 5B); 与 CON 组相比，ABX、GOS、AG 三组处理显著降低了海马体中左旋多巴含量($P<0.05$, 图 5C)，显著提高了海马体去甲肾上腺素含量($P<0.05$, 图 5D)。与 CON 组相比，GOS 组和 AG 组肾上腺素水平明显降低($P<0.05$, 图 5E)

抗生素对海马体肾上腺素和乙酰胆碱的浓度无明显影响。与 ABX 组相比，低聚半乳糖有降低海马体中乙酰胆碱的浓度的趋势($P=0.08$, 图 5F)。

2.6 结肠食糜微生物组成分析

对 16S rRNA 基因测序结果进行分析显示，与 CON 组相比，含抗生素的 ABX 组和 AG 组 Chao1 指数、

Shannon 指数(图 6A 和 6B)显著下降($P<0.05$)。与 CON 组相比，GOS 组 Chao1 指数显著降低，Shannon 指数无显著影响(图 6A、6B)。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)结果显示，与 CON 组相比，ABX 组、AG 组微生物组成发生了变化，而

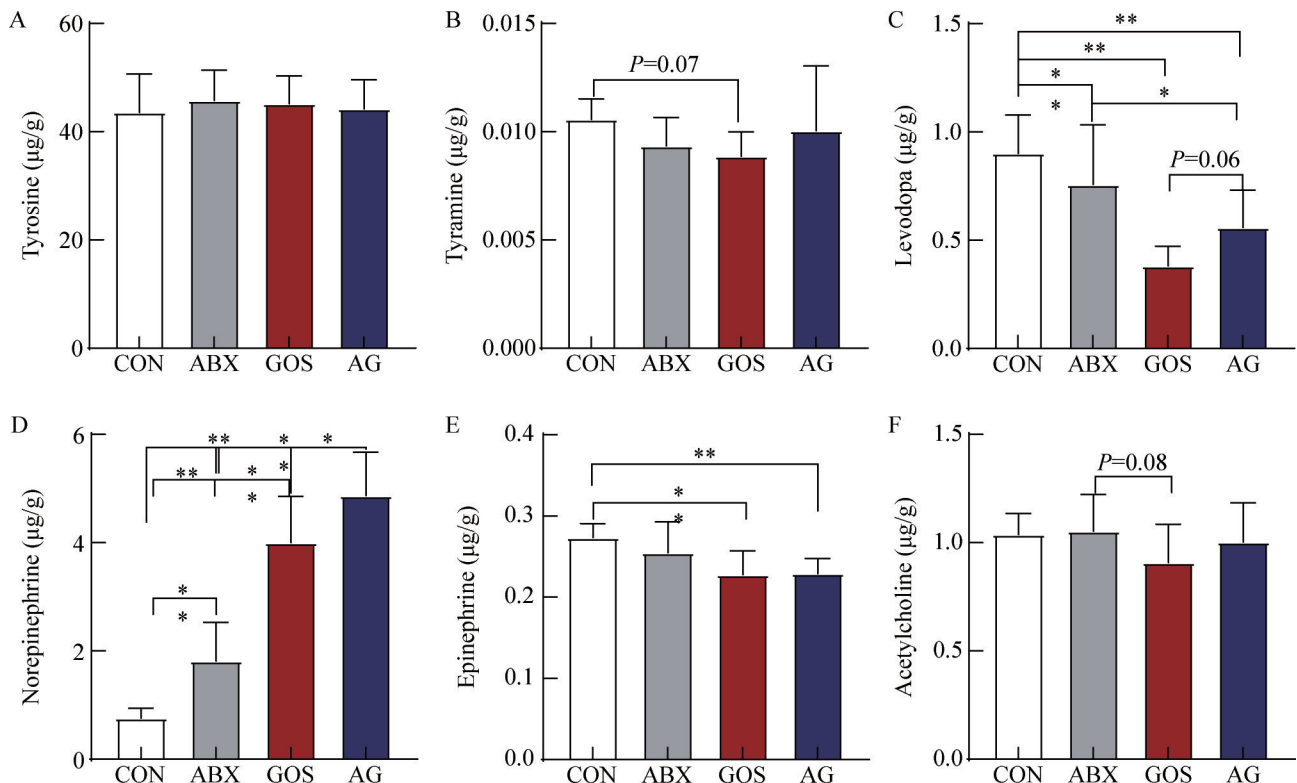


图5 海马体神经递质。A: 酪氨酸; B: 酪胺; C: 左旋多巴; D: 去甲肾上腺素; E: 肾上腺素; F: 乙酰胆碱。

Figure 5 Hippocampal neurotransmitters. A: Tyrosine; B: Tyramine; C: Levodopa; D: Norepinephrine; E: Epinephrine; F: Acetylcholine.

GOS 组微生物组成未分开(图 6C)。在门水平上, *Firmicutes* 是 CON 组优势菌门, 变形菌门 (*Proteobacteria*) 是 ABX 组、AG 组的优势菌, GOS 组优势菌门主要是 *Firmicutes* 和 *Bacteroidota* (图 6D); 属水平上, 选出丰度前 20 的菌属(图 6E、6F), 含抗生素的两组埃希氏菌属 (*Escherichia_Shigella*) 显著高于 CON 组, 与 ABX 组相比, AG 组 *Lactobacillus* 丰度显著升高(图 6E, $P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 抗生素和低聚半乳糖影响大鼠生长状况和血清生化指标影响

在本研究中, 相较于 GOS 组, 抗生素降低了大鼠体重和日增重, 同时降低肝脏器官指数; 低聚半乳糖则增加了大鼠的体重, 并降低了大鼠的肝脏指数。研究发现, 大鼠摄入的食物在肠胃中吸收消化不完全, 会导致其体重下降^[24], 食物通过咀嚼、消化酶等分解消化以及肠道的蠕动等运动, 在肠胃中被吸收, 而抗生素和低聚半乳糖不会改变大鼠的采食量^[25]。在 Ge 等^[26]的研究中, 接受抗生素治疗的小鼠展现出更重的盲肠组织和粪便, 说明抗生素可能影响肠道的蠕动和吸收, 因此推测抗生素和低聚半乳糖可能会影响肠道的营养代谢吸收, 进而改变大鼠的生长和体重。在血清生化指标中, 抗生素对肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)无显著影响, 表明抗生素可能是通过改变营养素的利用和代谢, 进而影响器官的重量。Silva 等^[27]研究发现, 低聚半乳糖通过调节肠道菌群平衡, 降低胰岛素抵抗、甘油三酯和胆固醇^[28]。这些结果表明, 低聚半乳糖可能通过减少脂肪生成来降低肝脏重量。

抗生素和低聚半乳糖对葡萄糖代谢的影响

较弱。Canfora 等^[29]通过在饮食中添加低聚半乳糖干预肥胖人群, 并未观察到空腹血糖、胰岛素、甘油以及脂多糖结合蛋白或其他炎症标志物的明显改变。在本试验中, 测定肝静脉血糖时由于未对大鼠进行空腹处理, 结果可能受到了大鼠采食时间的影响, 因此并未观察到有明显改变。此外, 在第 4 天时, ABX 组和 GOS 组大鼠的尾尖血液葡萄糖浓度都呈现出降低趋势, 可能是因为大鼠处于适应抗生素和低聚半乳糖的时期, 肠道对碳水化合物的吸收发生了改变, 同时低聚半乳糖也能够影响微生物和肠道对糖的代谢。以上结果表明, 抗生素和低聚半乳糖都会导致肠道菌群的改变, 进而影响消化代谢, 最终影响大鼠的肝脏和机体代谢。

3.2 早期抗生素和低聚半乳糖干预对焦虑抑郁样行为的影响

本研究结果显示, 抗生素和低聚半乳糖都具有一定的抗焦虑作用。相较于抗生素和低聚半乳糖的单独效应, 联合使用这两者显著降低了大鼠的运动距离和运动速度, 而在明暗箱试验中, 仅抗生素组表现了对光暴露区域的回避行为, 这提示抗生素可能会导致大鼠对光敏感性的改变。同时, 抗生素和低聚半乳糖均降低了大鼠的理毛频率, 表明它们具有一定的抗焦虑样行为作用。Desbonnet 等^[30]发现, 长期抗生素治疗导致小鼠肠道微生物缺失, 焦虑样行为减少, 但伴有社交行为的缺陷, 这可能与抗生素的种类、作用时间长短等因素有关。然而, 在本研究的三箱测试中, 并未观察到抗生素和低聚半乳糖对大鼠社交行为产生显著影响, 这与 Champagne-Jorgensen 等^[31]的研究结果一致。Perez-Burgos 等^[32]研究发现, 补充低聚半乳糖和益生菌鼠李糖乳杆菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus*) JB-1 可以逆转长期抗生素治疗导致

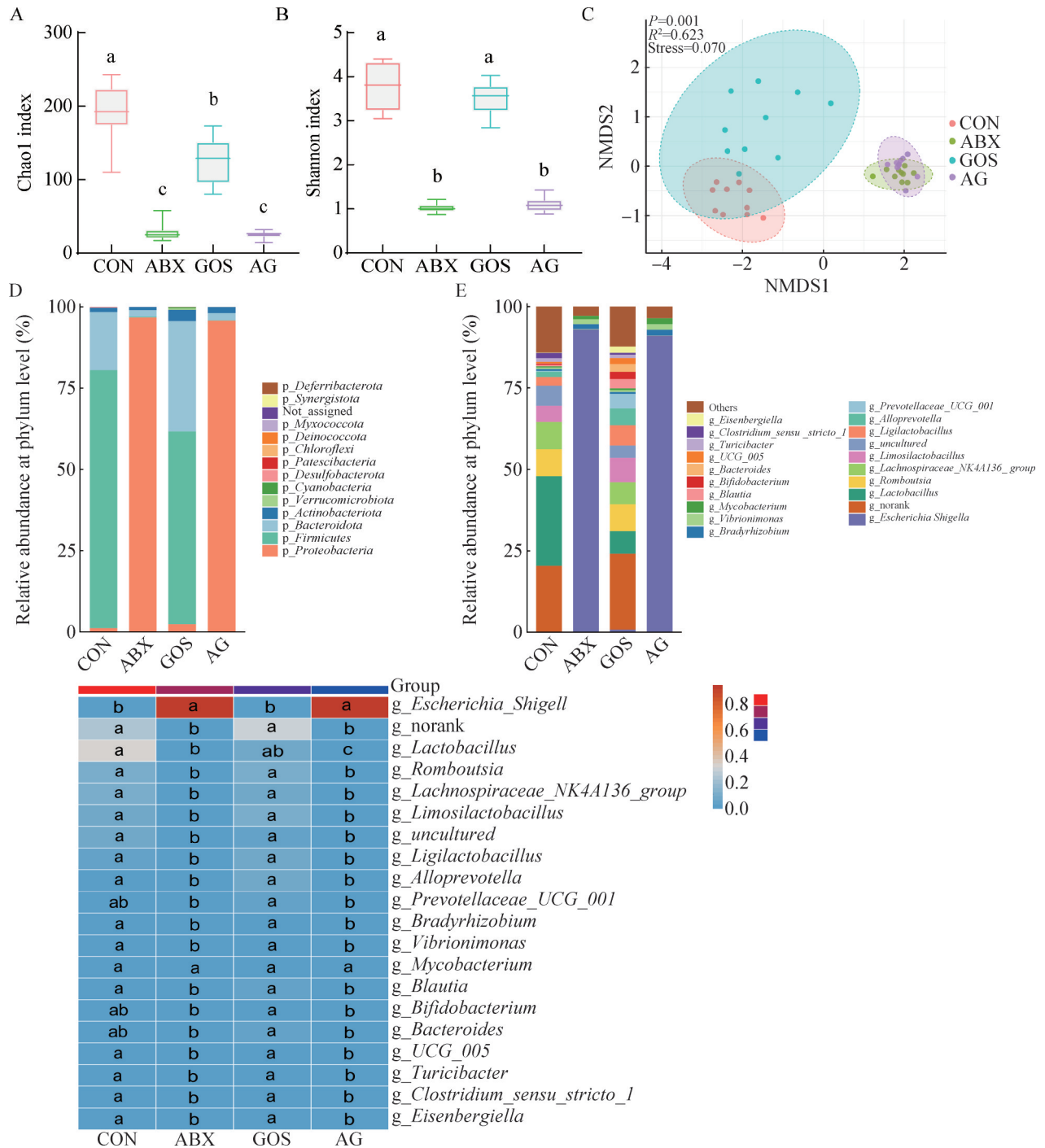


图6 结肠微生物16S rRNA基因测序。A: Chao1指数; B: Shannon指数; C: 非度量多维尺度分析 NMDS; D: 门水平上的结肠菌群堆积条形图; E: 属水平上的结肠菌群堆积条形图; F: 前20丰度差异菌属。

Figure 6 16S rRNA gene sequencing of colonic microorganisms. A: Chao1 index; B: Shannon index; C: Non-metric multidimensional scaling analysis NMDS; D: Colonic enterobacterial colony stacked bars at the phylum level; E: Colonic enterobacterial colony stacked bars at the genus level; F: Top 20 abundance-differentiated genera.

的焦虑样行为和认知行为的改善,但短期内效果并无明显差异。尽管目前已有研究表明抗生素会导致社交行为缺陷^[5],而低聚半乳糖有助于社交行为的增加^[33],但本实验并未发现这些结果,原因可能有两方面,一方面,本实验的处理时间较短,从而抗生素组大鼠社交行为略有降低,与抗生素组和 GOS 联合组相比,低聚半乳糖可能通过增加乳酸菌(例双歧杆菌)的数量来缓解抗生素诱导的社交行为减少。另一方面,断奶大鼠的神经系统处于发育期间,其社交行为在这段时间内可能无法明显体现^[34]。以上结果表明,抗生素和低聚半乳糖对大鼠社交行为的影响与作用时间有关,这还需要进行更多的研究。

3.3 抗生素和低聚半乳糖对海马体神经递质的影响

抗生素和低聚半乳糖可能通过改变肠道微生物,进而影响机体功能。本研究结果显示,抗生素和低聚半乳糖增加了大鼠海马体中的去甲肾上腺素。有研究表明,微生物和植物体内含有的去甲肾上腺素和多巴胺含量通常高于动物体内^[35-36],但细菌产生的神经递质能否穿越血脑屏障进入中枢神经系统,目前尚不确定。肠道微生物来源的神经递质可能通过刺激外周神经系统,经迷走神经传递信息到中枢神经系统,从而影响大脑功能。同时,本研究还发现,低聚半乳糖降低了肾上腺素含量,而并未改变酪氨酸和酪胺的含量。Nankova 等研究显示,细菌产生的短链脂肪酸能够上调酪氨酸羟化酶的表达,酪氨酸羟化酶是调节去甲肾上腺素合成的关键限速酶^[37],这与本试验结果相似,即短链脂肪酸可能促进去甲肾上腺素的合成。然而,目前关于短链脂肪酸在大脑中浓度及其功能调节的研究仍然匮乏^[38]。此外,大脑各个部分协同完成各项功能,还需要更多关于微生物代谢

物与大脑功能之间关系的数据来进一步证实。

3.4 抗生素和低聚半乳糖对结肠食糜微生物组成的影响

抗生素和低聚半乳糖都可以影响胃肠道微生物群落^[39],进而对肠-脑轴的形态和功能发育产生影响^[40-41]。本研究发现,抗生素和低聚半乳糖均降低了结肠微生物的多样性。在属水平上,抗生素增加了潜在致病菌 *Escherichia_Shigella* 的丰度,而低聚半乳糖则增加了有益菌 *Lactobacillus* 的丰度。肠道微生物可以通过肠道迷走神经和微生物代谢物这两条途径和中枢神经进行交流^[42-43]。例如,抗生素诱导潜在致病菌的增加,可能导致炎症的产生,而炎症因子诱导的神经炎症会影响中枢神经系统的行为改变。相反,低聚半乳糖可以诱导双歧杆菌丰度的增加^[2]。当肠道发生炎症时,迷走神经会被激活,而迷走神经的活性也会对肠道内的有益微生物产生积极影响^[43]。低聚半乳糖通过细菌的无氧发酵产生短链脂肪酸^[44],这些短链脂肪酸是调节肠道和大脑中枢神经系统的重要代谢物,能够有效减少炎症的发生^[45-46]。低聚半乳糖诱导肠道益生菌的增加,有助于机体免疫细胞吞噬作用增强和抗炎因子 IL-10 的含量增加,同时减少促炎细胞因子(IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α)的产生^[47]。此外,低聚半乳糖还能增加短链脂肪酸的产生,从而减少神经炎症的发生,对中枢神经系统产生有益影响。Seelbinder 等^[48]研究发现,抗生素对中等丰度的细菌物种影响最大,且对肠道真菌的影响比肠道细菌更加持久;另外,短期使用环丙沙星和甲硝唑治疗大鼠增加了大脑中五羟色胺(5-HT)的含量^[24],这可能是大鼠焦虑样行为减少的原因。

4 结论

综上所述,使用抗生素和低聚半乳糖对大

鼠进行治疗干预时, 抗生素会减少大鼠的焦虑样行为, 同时降低海马神经递质左旋多巴胺的含量, 增加去甲肾上腺素的含量, 并增加潜在致病菌的丰度; 而低聚半乳糖能够改善大鼠的生长状况, 对大鼠行为无明显影响, 但会增加 *Lactobacillus* 的丰度, 并伴减少左旋多巴胺和肾上腺素的含量。此外, 联合使用抗生素和低聚半乳糖也会降低大鼠运动能力, 增加焦虑抑郁样行为。

作者贡献声明

韩水兵: 试验设计、试验数据收集和分析、论文撰写等; 刘晓英: 试验和数据分析; 刘子昱: 试验和数据分析; 潘龙: 论文撰写和审核; 慕春龙: 试验方案设计、试验数据收集和协助分析以及论文修改; 朱伟云: 试验指导、论文审核修改等。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] van TRIJP MPH, RÖSCH C, ANR, KESHTKAR S, LOGTENBERG MJ, HERMES GDA, ZOETENDAL EG, SCHOLS HA, HOOIVELD GJEJ. Fermentation kinetics of selected dietary fibers by human small intestinal microbiota depend on the type of fiber and subject[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(20): e2000455.
- [2] AZCARATE-PERIL MA, ALTERMANN E, GOH YJ, TALLON R, SANZKY-DAWES RB, PFEILER EA, O'FLAHERTY S, BUCK BL, DOBSON A, DUONG T, MILLER MJ, BARRANGOU R, KLAENHAMMER TR. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4610-4625.
- [3] MCVEY NEUFELD KA, O' MAHONY SM, HOBAN AE, WAWORUNTU RV, BERG BM, DINAN TG, CRYAN JF. Neurobehavioural effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galacto-oligosaccharide in male rats exposed to early-life stress[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2019, 22(6): 425-434.
- [4] ARNOLD JW, ROACH J, FABELA S, MOORFIELD E, DING SL, BLUE E, DAGHER S, MAGNESS S, TAMAYO R, BRUNO-BARCENA JM, AZCARATE-PERIL MA. The pleiotropic effects of prebiotic galacto-oligosaccharides on the aging gut[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 31.
- [5] HAO WZ, LI XJ, ZHANG PW, CHEN JX. A review of antibiotics, depression, and the gut microbiome[J]. *Psychiatry Research*, 2020, 284: 112691.
- [6] GÎLCĂ-BLANARIU GE, ȘCHIOPU CG, ȘTEFĂNESCU G, MIHAI C, DIACONESCU S, AFRĂSĂNIE VA, LUPU VV, LUPU A, BOLOȘ A, ȘTEFĂNESCU C. The intertwining roads between psychological distress and gut microbiota in inflammatory bowel disease[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2268.
- [7] RAJILIĆ -STOJANOVIĆ M, de VOS WM. The first 1 000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 996-1047.
- [8] GILL SR, POP M, DEBOY RT, ECKBURG PB, TURNBAUGH PJ, SAMUEL BS, GORDON JI, RELMAN DA, FRASER-LIGGETT CM, NELSON KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [9] QIN JJ, LI RQ, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, NIELSEN T, PONS N, LEVENEZ F, YAMADA T, MENDE DR, LI JH, XU JM, LI SC, LI DF, CAO JJ, WANG B, LIANG HQ, ZHENG HS, XIE YL, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [10] BUROKAS A, ARBOLEYA S, MOLONEY RD, PETERSON VL, MURPHY K, CLARKE G, STANTON C, DINAN TG, CRYAN JF. Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice[J]. *Biological Psychiatry*, 2017, 82(7): 472-487.
- [11] LYNCH CMK, COWAN CSM, BASTIAANSEN TFS, MOLONEY GM, THEUNE N, van de WOUW M, FLORENSA ZANUY E, VENTURA-SILVA AP, CODAGNONE MG, VILLALOBOS-MANRÍQUEZ F, SEGALLA M, KOC F, STANTON C, ROSS P, DINAN TG, CLARKE G, CRYAN JF. Critical windows of early-life microbiota disruption on behaviour, neuroimmune function, and neurodevelopment[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2023, 108: 309-327.
- [12] KANG DW, PARK JG, ILHAN ZE, WALLSTROM G, LABAER J, ADAMS JB, KRAJMALNIK-BROWN R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68322.
- [13] FORSYTH CB, SHANNON KM, KORDOWER JH, VOIGT RM, SHAIKH M, JAGLIN JA, ESTES JD, DODIYA HB, KESHAVARZIAN A. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28032.

- [14] MU CL, NIKPOOR N, TOMPKINS TA, CHOUDHARY A, WANG M, MARKS WN, RHO JM, SCANTLEBURY MH, SHEARER J. Targeted gut microbiota manipulation attenuates seizures in a model of infantile spasms syndrome[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(12): e158521.
- [15] BERCIK P, COLLINS SM, VERDU EF. Microbes and the gut-brain axis[J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2012, 24(5): 405-413.
- [16] LIU ZY, LING YD, PENG Y, HAN SB, REN YT, JING YJ, FAN WL, SU Y, MU CL, ZHU WY. Regulation of serotonin production by specific microbes from piglet gut[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2023, 14(1): 111.
- [17] XU J, XU HM, PENG Y, ZHAO C, ZHAO HL, HUANG WQ, HUANG HL, HE J, DU YL, ZHOU YJ, ZHOU YL, NIE YQ. The effect of different combinations of antibiotic cocktails on mice and selection of animal models for further microbiota research[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(4): 1669-1681.
- [18] TAO CL, ZHANG Q, ZENG WJ, LIU GL, SHAO HW. The effect of antibiotic cocktails on host immune status is dynamic and does not always correspond to changes in gut microbiota[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4995-5009.
- [19] HOBAN AE, MOLONEY RD, GOLUBEVA AV, MCVEY NEUFELD KA, O' SULLIVAN O, PATTERSON E, STANTON C, DINAN TG, CLARKE G, CRYAN JF. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat[J]. *Neuroscience*, 2016, 339: 463-477.
- [20] WONG KR, SGRO M, YAMAKAWA GR, LI C, MCDONALD SJ, SUN MJ, SHULTZ SR, BRADY RD, MYCHASIUK R. Gut microbiome depletion and repetitive mild traumatic brain injury differentially modify bone development in male and female adolescent rats[J]. *Bone Reports*, 2021, 15: 101123.
- [21] HONG KB, KIM JH, KWON HK, HAN SH, PARK Y, SUH HJ. Evaluation of prebiotic effects of high-purity galacto-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2016, 54(2): 156-163.
- [22] JANTSCHER-KRENN E, MARX C, BODE L. Human milk oligosaccharides are differentially metabolised in neonatal rats[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2013, 110(4): 640-650.
- [23] XU HR, WANG ZR, ZHU L, SUI ZY, BI WC, LIU R, BI KS, LI Q. Targeted neurotransmitters profiling identifies metabolic signatures in rat brain by LC-MS/MS: application in insomnia, depression and Alzheimer's disease[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2375.
- [24] MENG C, FENG SY, HAO ZK, DONG C, LIU H. Antibiotics exposure attenuates chronic unpredictable mild stress-induced anxiety-like and depression-like behavior[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2022, 136: 105620.
- [25] MacFARLANE NG. Digestion and absorption[J]. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2018, 19(3): 125-127.
- [26] GE XL, DING C, ZHAO W, XU LZ, TIAN HL, GONG JF, ZHU MS, LI JS, LI N. Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2017, 15(1): 13.
- [27] SILVA RSD, MENDONÇA IP, PAIVA IHR, SOUZA JRB, PEIXOTO CA. Fructo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides improve hepatic steatosis via gut microbiota-brain axis modulation[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2023, 74(7): 760-780.
- [28] WANG J, TIAN SY, WANG J, ZHU WY. Early galacto-oligosaccharide intervention alters the metabolic profile, improves the antioxidant capacity of mitochondria and activates the AMPK/Nrf2 signaling pathway in suckling piglet liver[J]. *Food & Function*, 2020, 11(8): 7280-7292.
- [29] CANFORA EE, van der BEEK CM, HERMES GDA, GOOSSENS GH, JOCKEN JWE, HOLST JJ, van EIJK HM, VENEMA K, SMIDT H, ZOETENDAL EG, DEJONG CHC, LENAERTS K, BLAAK EE. Supplementation of diet with galacto-oligosaccharides increases bifidobacteria, but not insulin sensitivity, in obese prediabetic individuals[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(1): 87-97.e3.
- [30] DESBONNET L, CLARKE G, TRAPLIN A, O' SULLIVAN O, CRISPIE F, MOLONEY RD, COTTER PD, DINAN TG, CRYAN JF. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, 48: 165-173.
- [31] CHAMPAGNE-JORGENSEN K, MIAN MF, KAY S, HANANI H, ZIV O, MCVEY NEUFELD KA, KOREN O, BIENENSTOCK J. Prenatal low-dose penicillin results in long-term sex-specific changes to murine behaviour, immune regulation, and gut microbiota[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2020, 84: 154-163.
- [32] PEREZ-BURGOS A, WANG BX, MAO YK, MISTRY B, MCVEY NEUFELD KA, BIENENSTOCK J, KUNZE W. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 304(2): G211-G220.
- [33] LEMOINE A, TOUNIAN P, ADEL-PATIENT K, THOMAS M. Pre-, pro-, syn-, and postbiotics in infant formulas: what are the immune benefits for infants? [J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1231.
- [34] HARSHAW C, KOJIMA S, WELLMAN CL, DEMAS GE, MORROW AL, TAFT DH, KENKEL WM, LEFFEL JK, ALBERTS JR. Maternal antibiotics disrupt microbiome, behavior, and temperature regulation in unexposed infant mice[J]. *Developmental Psychobiology*, 2022, 64(6): e22289.
- [35] ROSHCHINA VV. New trends and perspectives in the evolution of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 874: 25-77.
- [36] TAJ A, JAMIL N. Bioconversion of tyrosine and tryptophan derived biogenic amines by neuropathogenic bacteria[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(1): 10.
- [37] NANKOVA BB, AGARWAL R, MacFABE DF, La GAMMA EF. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-

- dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells: possible relevance to autism spectrum disorders[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103740.
- [38] MacFABE DF, CAIN NE, BOON F, OSSENKOPP KP, CAIN DP. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorder[J]. *Behavioural Brain Research*, 2011, 217(1): 47-54.
- [39] GAO K, PI Y, PENG Y, MU CL, ZHU WY. Time-course responses of ileal and fecal microbiota and metabolite profiles to antibiotics in cannulated pigs[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(5): 2289-2299.
- [40] 高仁, 田时祎, 汪晶, 朱伟云. 低聚半乳糖对脂多糖刺激哺乳仔猪盲肠微生物区系、肠道炎症和屏障功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(1): 177-189.
GAO R, TIAN SY, WANG J, ZHU WY. Effects of galacto-oligosaccharides on cecal microflora, intestinal inflammation and barrier function of suckling piglets stimulated by lipopolysaccharides[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(1): 177-189 (in Chinese).
- [41] 田时祎, 王珏, 汪晶, 朱伟云. 早期低聚半乳糖干预对哺乳仔猪回肠形态、功能发育相关基因及回肠菌群的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 917-924.
TIAN SY, WANG J, WANG J, ZHU WY. The effect of early intervention with galacto-oligosaccharides on the morphological structure, functional development, and microbial community in ileum of suckling piglets[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 917-924 (in Chinese).
- [42] VICKERS NJ. Animal communication: when I'm calling you, will you answer too? [J]. *Current Biology*, 2017, 27(14): R713-R715.
- [43] WANG HX, WANG YP. Gut microbiota-brain axis[J]. *Chinese Medical Journal*, 2016, 129(19): 2373-2380.
- [44] XIE T, JIA XK, CHEN MB. Gut mobility attenuation induced by antibiotics is associated with overactivation of enteric glial cells in mice[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2019, 35(3): 199-205.
- [45] ERNY D, HRABĚ de ANGELIS AL, JAITIN D, WIEGHOFER P, STASZEWSKI O, DAVID E, KEREN-SHAUL H, MAHLAKOIV T, JAKOBSHAGEN K, BUCH T, SCHWIERZECK V, UTERMÖHLEN O, CHUN E, GARRETT WS, McCOY KD, DIEFENBACH A, STAEHELI P, STECHER B, AMIT I, PRINZ M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18: 965-977.
- [46] RÍOS-COVIÁN D, RUAS-MADIEDO P, MARGOLLES A, GUEIMONDE M, de LOS REYES-GAVILÁN CG, SALAZAR N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 185.
- [47] VULEVIC J, DRAKOULARAKOU A, YAQOUB P, TZORTZIS G, GIBSON GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 88(5): 1438-1446.
- [48] SEELBINDER B, CHEN JR, BRUNKE S, VAZQUEZ-URIBE R, SANTHAMAN R, MEYER AC, de OLIVEIRA LINO FS, CHAN KF, LOOS D, IMAMOVIC L, TSANG CC, LAM RPK, SRIDHAR S, KANG K, HUBE B, WOO PCY, SOMMER MOA, PANAGIOTOU G. Antibiotics create a shift from mutualism to competition in human gut communities with a longer-lasting impact on fungi than bacteria[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 133.