

基于 16sRNA 测序分析亚油酸对小鼠肠道菌群的影响

李宗恒^{1,2,3,4}, 张雪芳³, 陈延华³, 尚靖^{1,2,3}, 骆莺⁵, 殷佩浩^{1,2,3,4}

摘要 目的 探究亚油酸(LA)对小鼠肠道菌群多样性和结构的影响。方法 将7周12只SPF级雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组(CTRL组)和亚油酸组(LA组)。在补充LA饮食前1d,对LA组撤去正常粮食,禁食一晚,以便LA组小鼠更易接受LA饮食,且于实验记录当天给予LA,随时保持饲料更新,保证小鼠能自由饮食到造模结束。于造模12周后收集小鼠粪便,每2只小鼠粪便进行混合采样,后续进行16sRNA高通量测序分析肠道菌群结构、Alpha多样性、Beta多样性等分析。结果 通过16sRNA高通量测序发现,LA干预后肠道菌群的丰富度及多样性受损;主成分分析结果表明,CTRL组与LA组菌群组成相差较多。在门水平中,LA组放线菌门相对丰富度增加($P < 0.01$);在属水平中,LA组杜氏乳杆菌属相对丰富度下降($P < 0.05$),双歧杆菌、粪杆菌属和丹毒丝菌属相对丰富度升高(均 $P < 0.01$)。结论

LA干预后降低小鼠肠道菌群的丰富度与多样性,且调整肠道菌群的结构。LA干预后的肠道菌群中有益菌及致病菌存在差异,为LA的生物活性化合物的疗法和以肠道微生物为靶点的治疗调整提供一定的依据。

关键词 高通量测序;亚油酸;肠道菌群;代谢;多样性

中图分类号 R 372

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1116-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.002

使用天然生物活性食品化合物的饮食干预已成为治疗代谢性疾病及肿瘤有希望的方式之一,且对人体不良的副作用有限^[1]。饮食的组成成分可能影响代谢和各种信号通路的激活,从而产生不同的生物学效应。饮食中膳食脂肪的数量和类型是影响全身代谢的重要因素,对健康有重要影响^[2]。亚油酸(linoleic acid, LA)属于多不饱和脂肪酸家族,是

人体无法合成的必需脂肪酸。在过去的50年,西方饮食一直在使用LA,目前我国饮食结构也在转向西方饮食结构,呈现出高LA饮食。研究^[3]指出,LA具有较高的促炎特性,可能会导致炎症反应和肿瘤的发生。肠道微生物群是一个与人体息息相关的复杂微生物群落,存在于人体的消化道中与宿主共生^[4]。因此,该研究探讨LA对肠道菌群的作用,通过12周喂食C57BL/6J小鼠LA,以小鼠粪便中Alpha、Beta多样性分析小鼠粪便中LA对肠道菌群发挥的作用,为LA的生物活性化合物的疗法和以肠道微生物为靶点的治疗调整提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 本课题采用健康的雄性C57BL/6J小鼠,7周龄,体质量(20 ± 2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,将12只小鼠随机分组,分为对照组(CTRL组)6只和LA组6只。在本次造模中,小鼠适应生长1周后,在喂食LA造模前1d禁止小鼠饮食,可以正常饮水。于造模当天(禁食第2天)给LA组小鼠足够量的LA饲料,以保证小鼠能够自然接受LA饲料。之后随时保持饲料更新,并记录饲料喂食情况,一直喂食LA至12周收集标本。CTRL组小鼠不予LA处理,保持饲料充足,定期更换垫料,直到12周后收集标本。本实验方案经实验动物伦理委员会批准(批准号:m20210211)。

1.2 样本收集 在造模结束当天,根据耳标依次对应取材。取材当天右手握持小鼠,轻压腹部,待小鼠即将排便时,使粪便自行落到无菌滤纸上,并用无菌镊子夹取放入无菌EP管中,将每组2只小鼠粪便混样收集(共计6个样本),于 -80°C 冰箱冻存粪便。

1.3 16SrRNA 测序 将所有样本通过干冰保存送至上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina MiSeq 测序平台(<https://cloud.majorbio.com>)对样本进行高通量测序及分析。

1.4 统计学处理 进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚物种分类学注释,以 $\text{OTU} > 97\%$ 为标准进行筛选;采用mothur软件计算Alpha多样性指数;在OTU层面上,分析Beta多样性指

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873137)

作者单位:¹安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

²安徽医科大学第五临床医学院,合肥 230032

³上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所,上海 200062

⁴上海中医药大学附属普陀医院普外科,上海 200062

⁵长宁区妇幼保健院,上海 200000

作者简介:李宗恒,男,硕士研究生;

殷佩浩,男,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yin-peihao@shutcm.edu.cn

数、样本组间微生物群落结构差异是否有统计学意义;用 LEfSe 分析 ($LDA > 4$, $P < 0.05$) 确定不同组间从门到属水平丰度有统计学差异的细菌类群。使用 GraphPad Prism 8.0 版作图和 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析,每个实验独立进行 3 次,实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 CTRL 组小鼠 12 周内,毛发柔顺,无腹型肥胖,可正常活动。LA 组小鼠在喂食 LA 第 3 周发现毛发凌乱,第 5 周可明显发现小鼠毛发油腻,但可正常运动,继续喂食后可观察到小鼠腹型肥胖,掉毛,不喜运动。

2.2 小鼠体质量变化 CTRL 组小鼠与 LA 组小鼠体质量均不断上升,但随着 LA 干预,LA 组小鼠体质量增加速度大于 CTRL 组小鼠。在造模结束时,LA 组较 CTRL 组小鼠体质量上升更多 ($t = 5.58$, $P < 0.001$),表明 LA 对于小鼠体质量的变化有影响。见图 1。

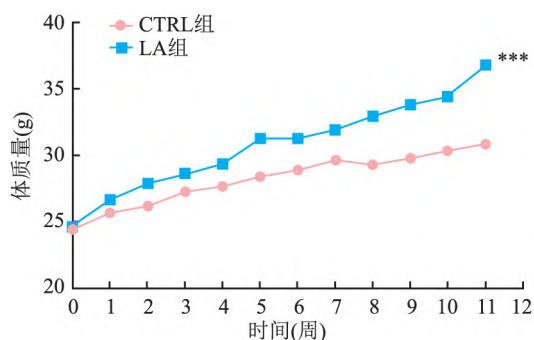


图1 LA 对小鼠体质量的影响
与 CTRL 组比较: *** $P < 0.001$

2.3 LA 对小鼠肠道菌群的影响 为了确定 LA 是否对肠道菌群有作用,收集小鼠粪便行革兰染色检测,结果显示经过 LA 干预后菌群数量发生改变,见图 2A、B。进一步通过 16SrRNA 基因测序检测进行 OTU 聚类 and 物种分类分析,通过 VENN 图统计共有 76 个 OTU,两组共有的 OTU 有 56 个,CTRL 组和 LA 组分别单独有 18 和 2 个 OTU,见图 2C。

2.4 LA 干预后对小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析 研究微生物的 Alpha 多样性对于菌群差异以及检测效果均可以作出一定的判断。Chao、Sobs、Ace 参数指标反映所测样本的丰富度,Ace 参数指标反映所测样本的均匀度,Shannon、Simpson 参数指标反映所测样本的多样性,Coverage 参数指标反映所测

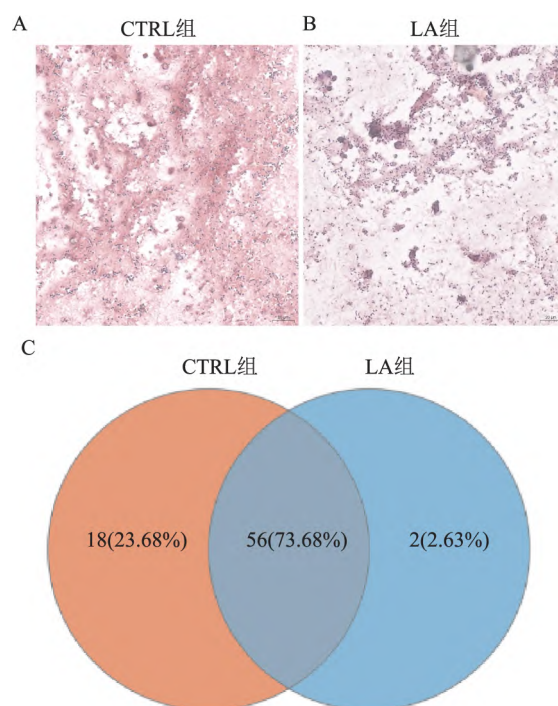


图2 小鼠粪便 HE 染色及 LA 干预后微生物 OTU 变化

A: CTRL 组粪便 HE 染色 $\times 400$; B: LA 组粪便 HE 染色 $\times 400$;
C: VENN 图,红色圆圈为 CTRL 组的 OTU,青蓝色为 LA 组 OTU 情况,深蓝色为两组相交 OTU 合集

样本的覆盖率。根据测序结果提示,丰富度指标 Chao 中,CTRL 组丰富度高于 LA 组,差异有统计学意义 ($t = 4.70$, $P < 0.05$,图 3A),Sobs 中 CTRL 组丰富度显著高于 LA 组,差异有统计学意义 ($t = 11.67$, $P < 0.01$,图 3B)。在丰富度与均匀度指标 Ace 中,CTRL 组指数高于 LA 组,差异有统计学意义 ($t = 7.68$, $P < 0.05$,图 3C),提示 LA 饮食损害肠道菌群的丰富度与均匀度。Shannon 和 Simpson 提示菌群的多样性,CTRL 组 Shannon 指数比 LA 组明显升高,差异有统计学意义 ($t = 3.48$, $P < 0.05$,图 3D),Simpson 是指数越大,多样性越差,也验证了 LA 影响肠道菌群的多样性(图 3E)。CTRL 组与 LA 组两组 Coverage 指数均高于 99.9%,差异无统计学差异 ($P > 0.05$,图 3F),证明两组在本次测序中,基本上能保证检测到大部分的菌群,未被检测到的菌群概率很低。根据稀释曲线测序结果提示,本次测序数量不断增加,OTU 数量曲线能趋近于平和,说明测序合理,更多的测序只能产生更少的 OTU。Chao、Sobs、Ace、Shannon、Simpson 及 Coverage 指数均合理(图 3 G1~6)。

2.5 LA 干预后小鼠肠道菌群 Beta 多样性分析 通过测序分析后,采用主成分分析(principle compo-

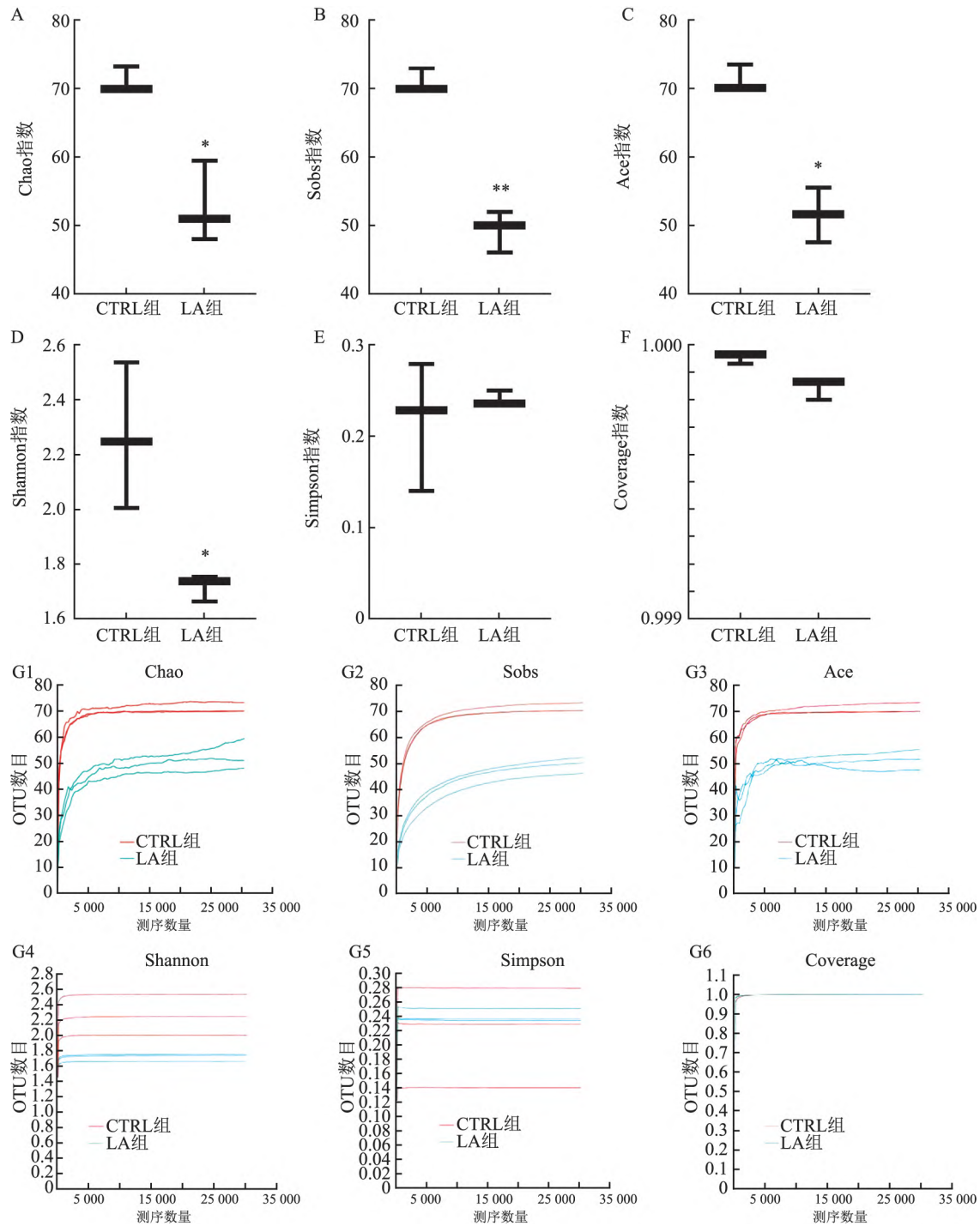


图3 LA干预后改变小鼠肠道菌群 Alpha 多样性

A: Chao 指数; B: Sobs 指数; C: Ace 指数; D: Shannon 指数; E: Simpson 指数; F: Coverage 指数; G: 各组指数稀释曲线(1~6 分别为 Chao、Sobs、Ace、Shannon、Simpson、Coverage 指数的稀释曲线); 与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ment analysis ,PCA) 小鼠肠道菌群 Beta 多样性的改变 ,该方法可以将原有的数据降维 ,把复杂的数据简化分析 ,找出最主要的部分 ,以最简单的方式展示。通过 PCA 方法比较 CTRL 组与 LA 组的肠道菌群的相似或者相差关系 ,结果表明 CTRL 组与 LA 组之间

样本构成相距较远 ,LA 组样本更聚集 ,提示 LA 干预对肠道菌群构成有较为明显的限制效应。见图 4。

2.6 LA 调控肠道菌群门、属水平的组成 两组小鼠肠道菌群在门水平分别由 5 个门组成(图 5A) ,分

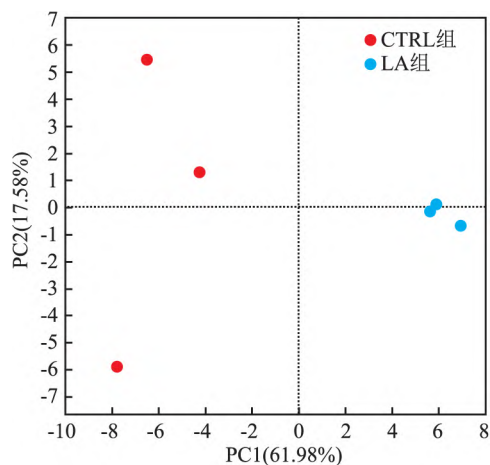


图4 CTRL组与LA组肠道菌群PCA分析

别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、脱硫杆菌门(*Desulfobacterota*)和变形菌门(*Proteobacteria*)组成,其中以厚壁菌门最具有优势(图5A)。与CTRL组比较,LA组厚壁杆菌门、拟杆菌门、脱硫杆菌门和变形菌门虽然有下降的趋势,但菌群丰富度差异并无统计学差异($P > 0.05$);与CTRL组比较,LA组放线菌门丰富度增加($t = 23.38$, $P < 0.01$)。两组小鼠肠道菌在属水平排前十位的分别是 *Ileibacterium*、杜氏乳杆菌属(*Dubosiella*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、*norank_f__Muribaculaceae*、粪杆菌属(*Faecalibaculum*)、丹毒丝菌属(*norank_f__Erysipelotrichaceae*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、肠杆菌属(*Enterorhabdus*)、*Lachnoclostridium*(图5B)。与CTRL组比较,LA组双歧杆菌、粪杆菌属、丹毒丝菌属丰富度均升高,差异有统计学意义($t = 31.56$, $P < 0.01$; $t = 11.50$, $P < 0.01$; $t = 48.59$, $P < 0.001$)但LA组杜氏乳杆菌属丰富度下降,差异有统计学意义($t = 5.42$, $P < 0.05$)。与CTRL组比较,LA组 *Ileibacterium* 丰富度有上升趋势,但是差异无统计学意义($P > 0.05$)。与CTRL组比较,LA组 *norank_f__Muribaculaceae*、乳杆菌属、脱硫弧菌属、肠杆菌属、*Lachnoclostridium* 呈现下降趋势,但差异无统计学差异($P > 0.05$)。图5G。

2.7 LA干预后肠道菌群间差异分析 LEfSe可以用来揭露不同组间存在的差异的物种。通过差异分类单元(图6A)示,CTRL组以拟杆菌门为主要区别标志菌群,LA组以放线菌门为主要标志菌群。根据柱状图线性判别分析(LDA)得分大于4,通过LEfSe测序结果显示(图6B),CTRL组中杜氏杆菌属(*g_*

Dubosiella)、拟杆菌门(*p_Bacteroidota*)、拟杆菌纲(*c_Bacteroidia*)、*g_norank_f_Muribaculaceae*、拟杆菌目(*o_Bacteroidales*)、*f_Muribaculaceae*、梭菌纲(*c_Clostridia*)为生物标志物,差异有统计学意义($P < 0.05$)。LA组中,双歧杆菌科(*f_Bifidobacteriaceae*)、放线菌纲(*c_Actinobacteria*)、双歧杆菌目(*o_Bifidobacteriales*)、双歧杆菌属(*g_Bifidobacterium*)、放线菌门(*p_Actinobacteriota*)、回肠杆菌属(*g_Ileibacterium*)、丹毒丝菌科(*g_norank_f_Erysipelotrichaceae*)、粪杆菌属(*g_Faecalibaculum*)为生物标志物,较CTRL组上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

食品中的营养生物活性化合物已经证实预防慢性疾病,如肿瘤、炎症性疾病、心血管疾病和代谢性疾病方面具有重要的意义。膳食中脂肪的数量和类型是影响脂肪组织功能和全身代谢的重要因素,对健康有重要影响^[5]。多不饱和脂肪酸中包括 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸($\omega-3$ polyunsaturated fatty acids, $\omega-3$ PUFA)和 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸($\omega-6$ polyunsaturated fatty acids, $\omega-6$ PUFA),其中 $\omega-6$ PUFA包括LA、花生四烯酸等,这些物质的促炎特性已经被广泛认可,它们在炎症、肿瘤发生中发挥重要作用。在体内, $\omega-6$ PUFA与 $\omega-3$ PUFA相互竞争抑制,过多的 $\omega-6$ PUFA摄入限制抗炎 $\omega-3$ PUFA衍生介质的合成^[6-7]。

肠道微生物群与肠道肿瘤密切相关。肠道微生物群参与炎症的发生进展及肿瘤发生、发展和转移的各个阶段,因此,它可以作为早期肿瘤预警和预后预测的标志物,并作为肿瘤预防和治疗的潜在靶点^[8]。调节肠道菌群是治疗的重要手段之一,补充益生菌可以通过调节宿主黏膜、系统免疫功能以及肠道内菌群平衡,以减少肠道炎症的发生、发展^[9]。此外,肠道菌群与屏障有着密切的关系。肠道微生物群的不平衡会影响肠道屏障系统的黏膜层,加剧炎症反应和肿瘤的发生^[10]。

在本研究中,使用16SrRNA基因测序来分析微生物群落的丰度、结构分布、组间差异和生物标志物。根据测序结果分析发现,LA干预后影响肠道菌群的组成,通过VENN图提示,与CTRL组比较,LA组肠道菌群数量变少;并且在Alpha多样性分析中同样证实,LA干预后肠道菌群的丰富度、均匀度和多样性的平衡都受到不同程度的影响,导致了肠道

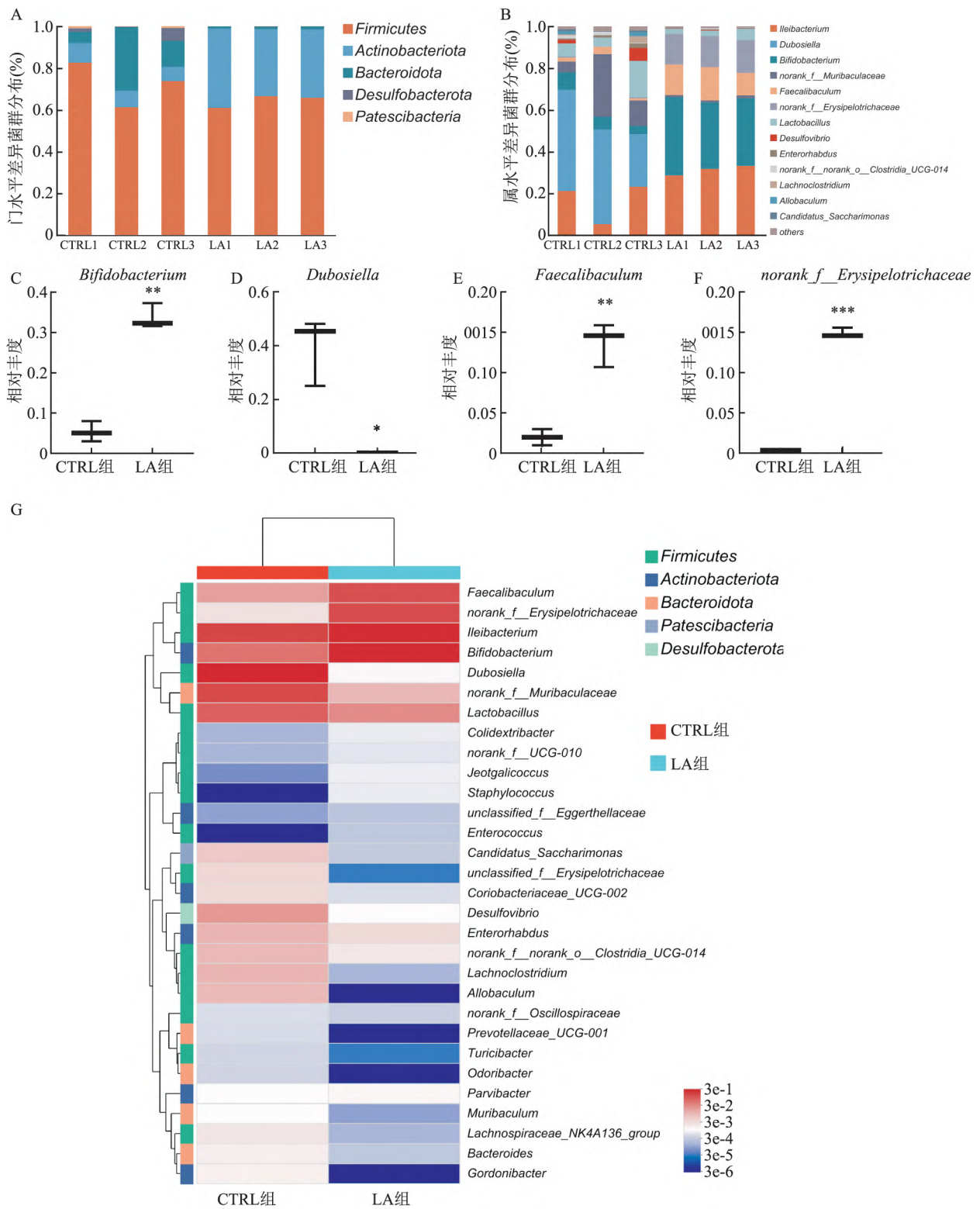


图5 LA 调控肠道菌群后在门、属水平肠道菌群结构图

A: 两组小鼠肠道菌群门水平结构; B: 两组小鼠肠道菌群属水平结构; C: 双歧杆菌属属水平物种丰度变化; D: 杜氏乳杆菌属属水平物种丰度变化; E: 粪杆菌属属水平物种丰度变化; F: 丹毒丝菌属属水平物种丰度变化; G: 小鼠肠道菌群属水平 heatmap; 与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

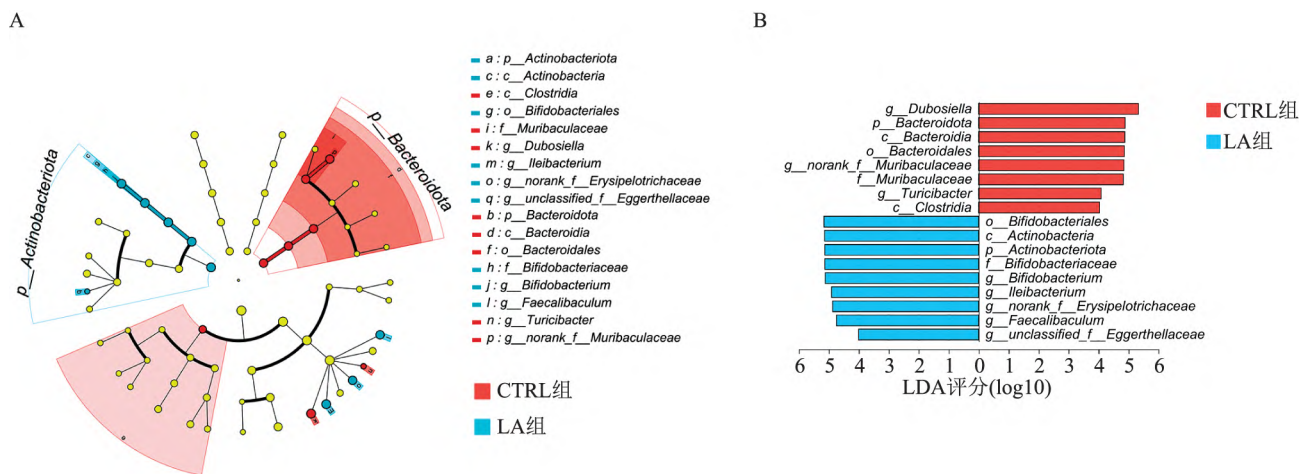


图6 LA干预后肠道菌群间生物标志物的分析

A: 基于分类等级数的组间差异分类单元; B: 两组差异菌群的LDA结果(LDA > 4)

菌群的紊乱,并且覆盖率提示本次测序结果可以继续分析。通过Beta多样性分析也能发现LA干预后使肠道菌群组成发生明显的变化。

本研究发现,当LA干预后,门水平的菌群中放线菌门呈现高丰度状态,而放线菌门现已被证实是肿瘤微环境中共存的菌群,并可与肿瘤相关成纤维细胞共存,促进肿瘤生成^[11]。同时发现,厚壁菌门和拟杆菌门菌群丰度均有下降趋势。通常认为拟杆菌是结直肠癌的潜在“驱动因素”,其特定的细菌成分可导致结肠上皮细胞的DNA损伤^[12],表明LA可能调控肠道菌群使之失衡。在属水平中,丹毒丝菌属也呈现高丰度的表达,丹毒丝菌属的菌落可以加重肠道炎症,促进炎症的发生^[13],这正与LA具有促进炎症的特性的说法符合,同样发现Muribaculaceae在LA组呈现低丰度的状态,而CTRL组此菌属于相对丰度高的状态,Muribaculaceae与抑制炎症细胞因子有相关作用^[14],表明LA可能通过降低该菌丰富度影响此菌在炎症环境中的抗炎作用,从而导致进一步加重炎症反应;然而同样也发现,经过LA干预后,双歧杆菌属和粪杆菌属均相对丰度上升,而杜氏乳杆菌属相对丰度下降,这几种菌群都是参与短链脂肪酸的生成,短链脂肪酸有提供能量、抗炎、抗肿瘤作用^[15],都是与短链脂肪酸生成相关的细菌,却相对丰度变化各有不同,提示LA作为必须从外界摄取的脂肪酸,具有相应的营养价值,但同时也存在干扰正常菌群平衡的可能性。本研究通过LEfSe分析筛选出生物标志物,提示LA干预后,差异物种为促进炎症的丹毒丝菌科和参与短链脂肪酸生成的双歧杆菌属和粪杆菌属。

在本研究中,所采取的菌群均来自于粪便中,根据现有的研究^[15]显示,不同的采样方法及保存会导致不同的菌群的检测率发生变化或菌群的含量改变,在后续及相关的实验中应当考虑更多菌群的获取方式以验证实验的可靠性。包括本次研究,也应加大样本量或采用人体的肠道菌群进行实验验证,以明确LA对于肠道菌群及机体的影响。

综上所述,本研究表明LA可以改变肠道菌群的丰富度、多样性,使肠道菌群整体的菌群构成以及构成比有一定的改变,在LA组中发现促炎菌群的丹毒丝菌属以及生成短链脂肪酸的双歧杆菌属、粪杆菌属相对高丰度,为LA的生物活性化合物的疗法和以肠道微生物为靶点的治疗调整提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] D'angelo S, Motti M L, Meccariello R. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated fatty acids, obesity and cancer [J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2751.
- [2] Luo Y, Liu J Y. Pleiotropic functions of cytochrome P450 monooxygenase-derived eicosanoids in cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 580897.
- [3] Saini R K, Keum Y S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—a review [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 255–67.
- [4] Michaudel, Sokol H. The gut microbiota at the service of immunometabolism [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 514–23.
- [5] Wang W, Yang J, Edin M L, et al. Targeted metabolomics identifies the cytochrome P450 monooxygenase eicosanoid pathway as a novel therapeutic target of colon tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 1822–30.
- [6] Soheila S, Fathi S, Roumi Z, et al. Association between dietary in-

- take of fatty acids and colorectal cancer: a case-control study [J]. *Front Nutr* 2022, 9: 856408.
- [7] Chazelas E, Srour B, Desmetz E, et al. Sugary drink consumption and risk of cancer: Results from nutriment-santé prospective cohort [J]. *BMJ* 2019, 366: 12408.
- [8] Matens E C, Neumann M, Desai M S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier [J]. *Nat Rev Microbiol* 2018, 16(8): 457–70.
- [9] Ren L, Ye J, Zhao B, et al. The role of intestinal microbiota in colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol* 2021, 12: 674807.
- [10] Xu Z, Lv Z, Chen F, et al. Dysbiosis of human tumor microbiome and aberrant residence of actinomyces in tumor-associated fibroblasts in young-onset colorectal cancer [J]. *Front Immunol* 2022, 13: 1008975.
- [11] Tjalsma H, Boleij A, Marchesi J R, et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects [J]. *Nat Rev Microbiol* 2012, 10(8): 575–82.
- [12] Roberti M P, Yonekura S, Duong C P M, et al. Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer [J]. *Nat Med* 2020, 26(6): 919–31.
- [13] Hao H, Zhang X, Tong L, et al. Effect of extracellular vesicles derived from *Lactobacillus plantarum* Q7 on gut microbiota and ulcerative colitis in mice [J]. *Front Immunol* 2021, 12: 777147.
- [14] Morrison D J, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. *Gut Microbes* 2016, 7(3): 189–200.
- [15] Tang Q, Jin G, Wang G, et al. Current sampling methods for gut microbiota: A call for more precise devices [J]. *Front Cell Infect Microbiol* 2020, 10: 151.

The effects of linoleic acid on intestinal flora in mice were analyzed based on 16sRNA sequencing

Li Zongheng^{1,2,3,4}, Zhang Xuefang³, Chen Yanhua³, Shang Jing^{1,2,3}, Luo Ying⁵, Yin Peihao^{1,2,3,4}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medical, Anhui Medical University, Shanghai 200062; ²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Interventional Cancer Institute of Chinese Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ⁴Dept of General Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ⁵Changning District Maternal and Child Health Hospital, Shanghai 200000)

Abstract Objective To investigate the effects of linoleic acid (LA) on the diversity and structure of intestinal flora in mice. **Methods** Twelve SPF grade male C57BL/6J mice at 7 weeks were randomly divided into control group (CTRL group) and linoleic acid group (LA group). One day before the linoleic acid diet was supplemented, the normal food was removed from the LA group and the mice in the LA group were fasted for one night, so that the LA diet was more acceptable to the mice in the LA group and LA was given on the day of the experiment recording, and the feed was updated at any time to ensure that the mice could eat freely until the end of modeling. After 12 weeks of modeling, mouse feces were collected, and mixed samples were collected for every two mice feces, and then 16sRNA high-throughput sequencing was performed to analyze intestinal flora structure, Alpha and Beta diversity.

Results 16sRNA high-throughput sequencing showed that LA intervention damaged the richness and diversity of intestinal flora. The results of principal component analysis showed that the composition of flora in CTRL group was different from that in LA group. At gate level, the relative abundance of *Actinobacteria* in LA group increased ($P < 0.01$). At the genus level, the relative abundance of *L. Duchennei* in the LA group decreased ($P < 0.05$), but the relative abundance of *Bifidobacterium*, *Faecalibaculum* and *Erysipelotrichaceae* in the LA group increased (all $P < 0.01$). **Conclusion** LA intervention could reduce the richness and diversity of intestinal flora in mice, and adjust the structure of intestinal flora. There were significant differences between beneficial bacteria and pathogenic bacteria in intestinal flora after LA intervention, which provided certain basis for the treatment of bioactive compounds of linoleic acid and the therapeutic adjustment of intestinal microorganisms as targets.

Key words high-throughput sequencing; linoleic acid; gut flora; metabolism; diversity