

## 断乳期人源菌群对小鼠生长发育的影响

史玉东<sup>1,2,3</sup>, 刘梦瑶<sup>1,2</sup>, 宋晨<sup>1,2</sup>, 李勇枝<sup>1,4</sup>, 卢卫红<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>哈尔滨工业大学化工与化学学院 哈尔滨 150001

<sup>2</sup>哈尔滨工业大学极端环境营养与防护研究所 哈尔滨 150001

<sup>3</sup>内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司研发中心 呼和浩特 011500

<sup>4</sup>中国航天员科研训练中心 北京 100094

**摘要** 目的:搭建断乳期人源菌群小鼠模型,研究肠道菌群对小鼠生长发育的影响。方法:将断乳期婴儿肠道菌群移植至无菌昆明小鼠中,建立断乳期人源菌群小鼠模型。断乳期人源菌群小鼠和无菌小鼠各 9 只,饲喂基础日粮至 8 周龄。测定小鼠体重、大脑脂肪酸含量以及血清、肝脏中胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)含量,通过 HE 染色观察小鼠海马 CA1 区及结肠发育情况。对比两组小鼠指标差异,分析肠道菌群对小鼠大脑、肠道发育及免疫等相关指标的影响。结果:断乳期人源菌群小鼠健康状况良好,能够部分模拟断乳期婴儿肠道菌群;肠道菌群对小鼠大脑神经元细胞、突触以及结肠绒毛发育有显著影响;对小鼠大脑中单不饱和脂肪酸 C16:1( $P < 0.001$ )、C18:1( $P < 0.01$ )和多不饱和脂肪酸 C18:3( $P < 0.05$ )、C20:3( $P < 0.01$ )、C20:4( $P < 0.001$ )、C22:5( $P < 0.05$ )、C22:6( $P < 0.01$ )含量有显著影响;对小鼠血清、肝脏中 IGF-1 的含量有显著影响。结论:断乳期人源菌群小鼠模型的建立,为研究断乳期婴儿肠道菌群对宿主生理功能的影响提供了动物模型。

**关键词** 人源菌群小鼠;断乳期;肠道菌群;发育;免疫

**文章编号** 1009-7848(2022)05-0120-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.014

营养是影响婴幼儿成长发育的重要环境因素之一,生命早期 1 000 d 营养状态影响一生的健康<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(WHO)推荐 0~6 月婴儿纯母乳喂养,母乳喂养的婴幼儿发育水平也成为 WHO 建议的孩子发育标准<sup>[2-4]</sup>。断乳期是从完全母乳喂养到充分利用家庭食物的过渡时期,也是婴幼儿成长发育的关键时期<sup>[5]</sup>。对于继续母乳喂养的 7~12 月龄婴儿,其所需要的部分能量,以及 99% 的铁、75% 的锌、80% 的维生素 B<sub>6</sub>、50% 的维生素 C 等必须从添加的辅食中获得<sup>[6-7]</sup>。肠道菌群与人的生长发育、健康情况息息相关,断乳期是肠道菌群构建的关键时期。最初,婴儿肠道菌群多样性差,辅食的添加会引起肠道菌群发生巨大改变并逐渐趋于稳定,接近成人<sup>[8]</sup>。研究营养干预对了解断乳期婴幼儿生长发育影响十分重要。

鉴于婴幼儿的脆弱敏感性以及调查的(伦理

学)难度,几乎没有对健康婴幼儿的营养干预性研究。对于婴幼儿营养摄入的了解主要依赖于一些观察性研究,如不同喂养方式下的婴幼儿生长发育研究。无菌动物(Germ free animal, GF 动物)作为微生物背景最清晰的动物,可有效进行菌群、基因及其它环境因素的控制,是研究肠道菌群对人类疾病及健康影响的最有效的动物模型<sup>[9]</sup>。利用无菌动物构建携带断乳期婴儿肠道菌群的人源菌群动物(Human floral-associated animal, HFA 动物),可为饮食干预对肠道菌群的影响提供一个有效的模型。本文搭建了断乳期人源菌群小鼠模型,并验证人源菌群对小鼠大脑、肠道发育及免疫等相关指标的影响,为后续针对断乳期婴幼儿营养干预性研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

1.1.1 实验动物 昆明 GF 小鼠,10~15 g,18 只,华中农业大学实验动物中心,许可证号:SYXK(鄂)2015-0084。

1.1.2 菌群来源 粪便样本来源于顺产母乳喂养

收稿日期:2021-09-07

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目  
(2017YFC1601900)

作者简介:史玉东(1981—),男,博士生在,正高级工程师  
通信作者:卢卫红 E-mail: lwh@hit.edu.cn

且未接受过抗生素治疗及服用益生菌类产品的 6 月龄健康女婴,粪样以每管 200 mg 装入无菌 EP 管中,装若干管,液氮速冻,−80 °C 保存。

1.1.3 试剂 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 抽提试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司;小鼠胰岛素样生长因子−1 (Insulin-like growth factor−1, IGF−1) ELISA 试剂盒,中国联科生物公司;小鼠胰岛素样生长因子结合蛋白−3 (In-sulin-like growth factor binding protein−3, IGFBP−3) ELISA 试剂盒,美国 RD 公司;C10:0 脂肪酸 (Fatty acid, FA)、C16:0 FA、C17:0 FA、C18:0 FA、C18:1 FA 标品,美国 Sigma 公司;甲醇、二氯甲烷、乙酰氯、正己烷、乙腈、正庚烷(色谱纯级),天津市康科德公司;无水硫酸钠、碳酸钾、丁羟甲苯(分析纯级),阿拉丁试剂(上海)有限公司;MRS 培养基,北京陆桥技术股份有限公司。

## 1.2 仪器与设备

无菌隔离器,华中农业大学;CP21G II 高速冷冻离心机,日立公司;超净工作台,新加坡 ESCO 公司;超低温冰箱、HM325 石蜡切片机,美国 Thermo 公司;PPTHK−21B 摊片烤片机、PPDB−21C 电脑程控组织包埋机,襄樊徕克生物电子仪器厂;ECLIPSE 显微镜,美国尼康公司;K3 酶标仪,上海欧颖实验设备有限公司;MX−S 可调式混匀仪,美国 SCILOGEX 公司;I-Class 高效液相色谱,美国 Waters 公司;TARGA C18 色谱柱 (20 mm×2.1 mm, 5.0 μm),美国 Higgins Analytical 公司;SCIEX QTRAP 4500 液质质联用仪,美国 AB SCIEX 公司;电子秤,梅特勒公司;ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪,美国 ABI 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 实验方案 将 1 周龄无菌仔鼠 (体质量 10~15 g) 及对应母鼠随机置于 2 台隔离器中 (每台隔离器 9 只仔鼠),分别用于建立人源肠道菌群模型 (HMC) 和无菌小鼠模型 (GFC)。实验周期为 7 周,仔鼠 3 周龄断乳后与母鼠分离,实验期间小鼠在无菌隔离器中随意进食 (基础日粮) 和饮水,控制温度在 (23±2) °C,保持相对湿度在 (55±5)% 之间,12 h 明暗交替周期,如图 1 所示。本研究的动物实验方案获得华中农业大学实验动物福利伦理审查委员会批准 (批准编号:HZAUMO−2020−0054),并且严格按照华中农业大学实验动物福利伦理审查委员会的管理要求进行实验操作。

菌群移植步骤如下:取 1 管 200 mg 断乳期婴儿粪便样本,于 37 °C 水浴快速复苏,然后转入无菌小鼠隔离器内,加 2 mL 无菌生理盐水摇匀至无明显大颗粒,静置 5 min 取上清液灌胃;每只母鼠 (产后 1 周的母鼠) 灌胃 0.2 mL;灌胃后,将剩余菌液上清均匀涂抹至母鼠腹部乳头及 1 周龄仔鼠全身;每天按上述操作步骤进行一次灌胃与涂抹,连续 1 周,将小鼠粪便进行革兰氏染色,并使用 MRS 培养基厌氧培养,根据检测结果评价模型构建是否成功。

建模成功后,每隔 2 周测量小鼠体质量 1 次。收集产后 2 周母鼠及 3 周龄仔鼠粪便样本,−80 °C 保存。8 周龄时,小鼠禁食 12 h,称取动物体质量后,采用眼球取血法采集每只小鼠血液 1.5 mL,颈椎脱臼法处死小鼠。将所得血液室温放置 40 min 以上,3 500 r/min 离心 10 min,取上层血清于新的 EP 管中,−80 °C 保存。

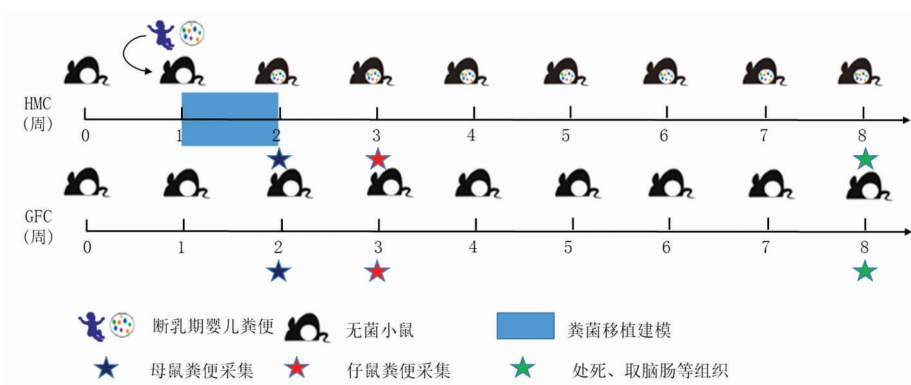


图 1 实验方案图

Fig.1 Schematic of experimental design

按以下步骤取小鼠组织样本:解剖小鼠,取完整脑组织,手术刀分为两半,一半最佳切削温度(Optimal cutting temperature, OCT)包埋,-80℃保存;另一半福尔马林固定,室温保存。取肝脏,放入冻存管,立即液氮速冻,随后转移至-80℃保存。取结肠,PBS清洗,福尔马林固定,室温保存。

### 1.3.2 粪便中菌群组成的测定

1.3.2.1 DNA抽提和PCR扩增 根据说明书进行微生物群落总DNA抽提;使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增。

1.3.2.2 Illumina Miseq测序 利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.3.2.3 数据处理 使用fastp(version 0.20.0)<sup>[10]</sup>软件对原始测序序列进行质控,使用FLASH(version 1.2.7)<sup>[11]</sup>软件进行拼接。使用UPARSE(version 7.1)<sup>[12]</sup>软件,根据97%<sup>[12-13]</sup>的相似度对序列进行OTU聚类并剔除嵌合体。利用RDP classifier(version 2.2)<sup>[14]</sup>对每条序列进行物种分类注释,比对Silva 16S rRNA数据库(version 138),设置比对阈值为70%。

### 1.3.3 海马组织和结肠组织HE染色病理检测

1.3.3.1 组织包埋 将用福尔马林固定好的组织放入包埋盒,浸入70%酒精,过夜;按照80%乙醇、95%乙醇I、95%乙醇II、100%乙醇I、100%乙醇II、100%乙醇+二甲苯(1:1)、二甲苯I、二甲苯II、石蜡I(54~56℃)、石蜡II(56~58℃)、石蜡III(58~60℃)顺序对组织进行处理。

1.3.3.2 组织切片 将组织进行连续切片(3μm),64℃烤片30min,于室温保存。

1.3.3.3 HE染色 将组织切片进行脱蜡水化;随后用苏木精染色15min,自来水洗,盐酸酒精分化2s,自来水返蓝15min,镜下观察反蓝程度;伊红染色3min;放入100%酒精I 5min,100%酒精II 5min,二甲苯I 10min,二甲苯II 10min;最后使用中性树胶进行封片(封片过程中应避免气泡的产生);显微镜下观察,并进行拍照。

### 1.3.4 血清、肝脏IGF-1与IGFBP-3含量测定

采用夹心ELISA方法检测。将包被抗原与固相

载体联结,形成固相抗原。洗涤除去未结合的抗原及杂质,加待测样品,样品与固相抗原结合,形成固相抗原抗体复合物;然后加酶标记抗体,固相免疫复合物上的抗体与酶标抗体结合。加底物显色,固相上的酶催化底物成为有色产物。加入终止液终止显色反应并于波长450nm处读取OD值。

### 1.3.5 大脑脂肪酸含量的测定

1.3.5.1 脑样本制备 将大脑样品制备成匀浆液,质量浓度为100mg/mL。取100μL匀浆液置于1.5mL EP管中;加入400μL正己烷,涡旋1min,10 000×g离心10min。取上清液250μL旋干,加1mL甲醇复溶,涡旋3min,取上清800μL于液相小瓶中用于LC-ESI MS检测FA。

1.3.5.2 色谱条件 TARGA C18色谱柱(20mm×2.1mm,5.0μm),流动相为A(水,含5mmol/L乙酸铵)和B(乙腈),等度洗脱(0~10min,30%A)。流速为0.2mL/min,柱温为35℃,进样量为5μL,样品盘温度为4℃。

1.3.5.3 质谱条件 离子源为ESI源,检测模式为负离子检测模式,气帘气(CUR)172kPa,碰撞气(CAD)中等,离子源气1(GS1)310kPa,离子源气2(GS2)345kPa,电喷雾电压-4 500V,加热器温度350℃,碰撞电压(CE)-5V,滞留时间35ms。

小鼠大脑不同脂肪酸的LC-Qtrap MS检测条件见表1。

1.3.5.4 FA标准曲线的绘制 分别精密称取FA标准品(C17:0 FA)适量溶于甲醇溶液,配成浓度为10mmol/L的母液。取适量FA母液混合,甲醇逐级稀释为50,25,10,2,0.4,0.08μmol/L和0.016μmol/L的混合标准品溶液,按照上面的液质检测条件进行质谱检测。以FA标准品含量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制工作曲线,为样品中FA的定量检测建立标准曲线。

1.3.6 统计学分析 在本研究中,所有试验均独立重复至少3次,以平均值±标准方差的形式表示结果。各组数据均通过SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),显著性分析有Duncan's检验得到。 $P < 0.05$ 表明结果在统计学上具有显著性差异。



表 1 FA 的 LC-Qtrap MS 检测条件

Table 1 LC-Qtrap MS detection conditions for FA

样品	Q1	Q3	时间/ ms	去簇电压 (DP)/V
C10:0 FA	171	171	35	-120
C12:0 FA	199	199	35	-120
C13:0 FA	213	213	35	-120
C14:0 FA	227	227	35	-120
C14:1 FA	225	225	35	-120
C15:0 FA	241	241	35	-120
C15:1 FA	239	239	35	-120
C16:0 FA	255	255	35	-120
C16:1 FA	253	253	35	-120
C16:2 FA	251	251	35	-120
C17:0 FA	269	269	35	-120
C17:1 FA	267	267	35	-120
C18:0 FA	283	283	35	-120
C18:1 FA	281	281	35	-120
C18:2 FA	279	279	35	-120
C18:3 FA	277	277	35	-120
C20:0 FA	311	311	35	-120
C20:1 FA	309	309	35	-120
C20:2 FA	307	307	35	-120
C20:3 FA	305	305	35	-120
C20:4 FA(AA)	303	303	35	-120
C20:5 FA(EPA)	301	301	35	-120
C21:0 FA	325	325	35	-120
C22:0 FA	339	339	35	-120
C22:1 FA	337	337	35	-120
C22:2 FA	335	335	35	-120
C22:5 FA(DPA)	329	329	35	-120
C22:6 FA(DHA)	327	327	35	-120
C23:0 FA	353	353	35	-120
C24:0 FA	367	367	35	-140
C24:1 FA	365	365	35	-140
C26:0 FA	395	395	35	-160
C28:0 FA	423	423	35	-160

注:AA. 二十碳四烯酸 (Arachidonic acid);EPA. 二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid);DHA. 二十二碳六烯酸 (Docosahexenoic acid);DPA. 二十二碳五烯酸 (Docosapentaenoic acid);Q1. 四级杆 1;Q3. 四级杆 3。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠模型菌群定值效果评估

2.1.1 3 周龄小鼠粪便初步评估 将 3 周龄小鼠粪便进行革兰氏染色镜检,如图 2 所示。

从图 2 可以看出,GFC 组小鼠粪便镜检为无菌,HMC 组小鼠粪便镜检显示为阳性。表明无菌小鼠模型(GFC)肠道中无活体微生物。

HMC 小鼠粪便经 MRS 培养基厌氧培养 24 h 后,结果如图 3 所示。

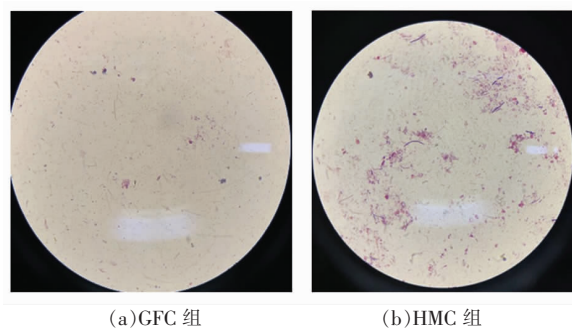


图 2 3 周龄小鼠粪便革兰氏染色

Fig.2 Gram staining of feces of mice aged 3 weeks



图 3 HMC 组 3 周龄小鼠粪便中双歧杆菌培养结果

Fig.3 Culture results of *Bifidobacteria* in feces of 3-weeks-old mice in HMC group

从图 3 可以看出,HMC 组小鼠粪便中存在双歧杆菌。双歧杆菌作为婴儿肠道菌群的代表菌株之一,该结果初步表明断乳期人源小鼠模型搭建成功。

2.1.2 菌群组成分析 从图 4 可以看出,母乳喂养的 6 月龄婴儿肠道菌群以双歧杆菌为优势菌,同时发现大肠杆菌、瘤胃球菌、肠球菌、韦荣球菌

等。而菌群移植1周后母鼠及9只3周龄断乳模型小鼠肠道菌群中以大肠杆菌、亨盖特拉菌、瘤胃球菌为主体,伴有双歧杆菌、肠球菌、韦荣球菌等。对比发现断乳期婴儿、菌群移植1周后母鼠及9只3周龄断乳模型鼠肠道菌群组成在属水平有一

定的相似度,特别是双歧杆菌作为婴儿肠道菌群的代表微生物在小鼠肠道的定植,说明人源菌群移植成功,断乳期人源菌群小鼠搭建成功,能够部分模拟断乳期婴儿肠道菌群。

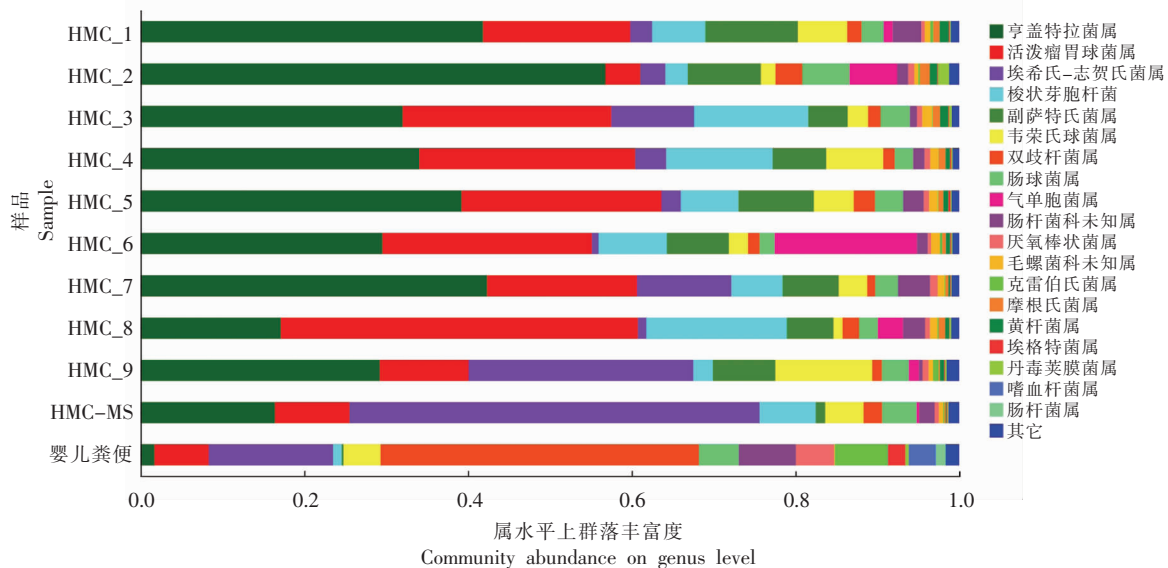


图4 断乳期婴儿、母鼠和断乳模型鼠属水平菌群组成

Fig.4 The microbial composition of weaning infants, mother mice and weaned model mice at the genus level

### 2.2 小鼠体质量

从表2可以看出,2个小鼠模型体质量随饲养时间延长逐渐升高。采用SPSS 17.0数据处理软件进行统计学分析,组间均数比较采用*t*检验。结果显示,不同模型小鼠在不同饲养时期,组间无

显著差异,说明肠道菌群的移植不影响小鼠体质量增长。实验期间,各模型小鼠健康状况良好,无腹泻、增肥等不良现象,未发现小鼠有中毒或自然死亡。

表2 小鼠体质量变化(n=9)

Table 2 The change of body weight in mice (n=9)

周龄/周	2	4	6	8
GFC/g	20.11 ± 1.90	28.97 ± 1.63	31.75 ± 1.75	36.11 ± 1.95
HMC/g	23.16 ± 1.18	29.36 ± 1.33	32.95 ± 1.54	34.59 ± 1.87

### 2.3 小鼠大脑发育

2.3.1 小鼠海马CA1区形态结构 从图5可以看出,小鼠海马CA1区神经元细胞形态有明显差异。HMC组细胞排列紧密,细胞边缘清晰,细胞内核体着色深且很清楚;而在GFC组中,细胞边缘模糊,细胞大,核体小,着色不清晰,这说明HMC组较GFC组小鼠脑细胞生长旺盛,更有活力。此外,神经元突触间隙也有明显差异。在图5中,

HMC组箭头所指神经元突触间隙在单位空间内的数量明显多于GFC组箭头所指的数量,且HMC组的突触发育良好,突触长度和密度都有明显优于GFC组的趋势,这也表明HMC组小鼠大脑海马组织神经元细胞比GFC组神经元细胞具有活力、年轻、延缓衰老的特征。以上均说明肠道菌群对小鼠海马CA1区发育影响显著。

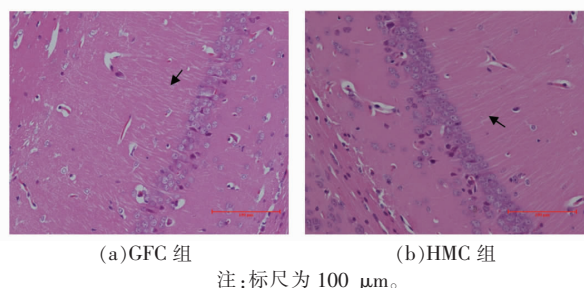
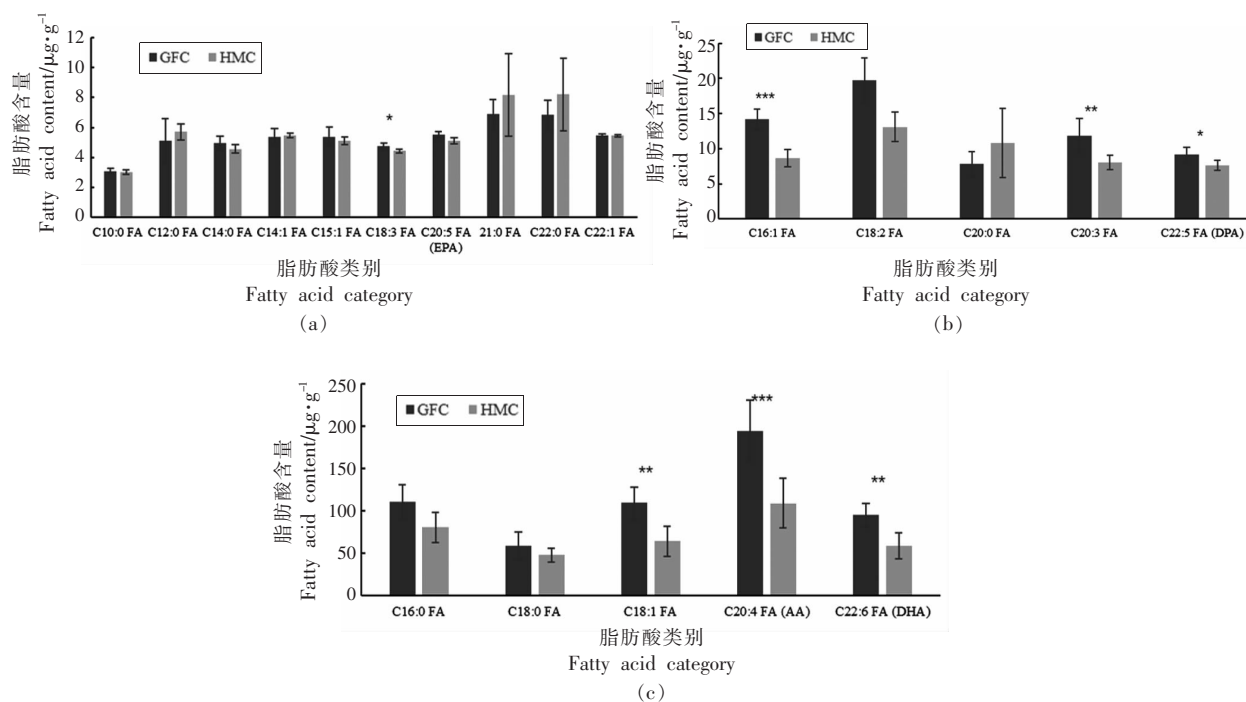


图 5 小鼠海马 CA1 区 HE 染色

Fig.5 HE staining of hippocampal CA1 region in mice

2.3.2 小鼠大脑脂肪酸含量 从图 6 可以看出, 两模型小鼠大脑中的脂肪酸含量存在区别。其中 HMC 组的单不饱和脂肪酸 C16:1( $P < 0.001$ )、C18:1( $P < 0.01$ )和多不饱和脂肪酸 C18:3( $P < 0.05$ )、

C20:3( $P < 0.01$ )、C20:4( $P < 0.001$ )、C22:5( $P < 0.05$ )、C22:6( $P < 0.01$ )含量较 GFC 组显著降低。饱和脂肪酸、部分不饱和脂肪酸 (C14:1、C15:1、C18:2、C20:5、C22:1)含量组间差异均不显著。DHA(C22:6)和 AA(C20:4)是大脑中主要的长链多不饱和脂肪酸,DHA、AA 和 EPA(C20:5)及其衍生物参与脑细胞的形成和发育, 促进神经蛋白合成及神经细胞生长, 对神经细胞轴突的延伸和新突触的形成有重要作用, 并参与大脑思维和记忆形成过程<sup>[15]</sup>。由上文可知, 在营养摄入相同的情况下, 植入婴儿肠道菌群的 HMC 组小鼠大脑发育效果明显高于 GFC 组, 而 HMC 组小鼠大脑中多链不饱和酸含量明显低于 GFC 组, 可能是由于小鼠大脑发育过程中消耗大量多链不饱和脂肪酸导致的。



注: \* 表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \*\*\* 表示组间差异极极显著 ( $P < 0.001$ ), 下同。

图 6 小鼠大脑脂肪酸含量 ( $n=6$ )

Fig.6 Brain fatty acid content in mice ( $n=6$ )

2.4 小鼠结肠发育

小肠的肠绒毛高度是衡量小肠消化吸收功能的重要指标。从图 7 可以看出, 两个小鼠模型结肠组织的黏膜上皮结构完整清晰, 腺体排列整齐, 无炎症细胞浸润, 其中 HMC 小鼠肠内绒毛发育水平和高度要优于 GFC 组。可能是由于断奶应激对小

鼠肠黏膜形态有很大的影响, 包括绒毛萎缩、高度下降、隐窝加深, 肠绒毛上皮成熟细胞数量减少, 分泌细胞 (杯状细胞) 增多, 吸收能力下降<sup>[16]</sup>。移植人源菌群中的双歧杆菌等益生菌能够促进受损肠黏膜细胞的修复, 使得肠绒毛高度增加, 隐窝变浅。

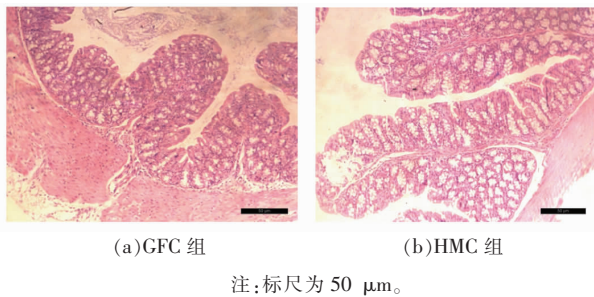


图7 小鼠结肠组织 HE 染色

Fig.7 HE staining of colon tissue sections in mice

## 2.5 小鼠免疫性能

小鼠肝脏 IGF-1、IGFBP3 含量检测结果,如图 8 所示。

由图 8 可以看出,HMC 组肝脏中的 IGF-1 含量显著高于 GFC 组( $P < 0.05$ ),表明菌群移植能够明显提高小鼠肝脏中的 IGF-1 含量。HMC 组肝脏中的 IGFBP3 含量与 GFC 组差异不显著。

小鼠血清 IGF-1、IGFBP3 检测结果,如图 9 和 10 所示。

由图 9 和 10 可以看出,HMC 组血清中的 IGF-1 含量显著高于 GFC 组( $P < 0.05$ ),表明菌群移植能够明显提高小鼠血清中的 IGF-1 含量。HMC 组血清中的 IGFBP3 含量与 GFC 组差异不显著。

IGF-1 具有促进淋巴组织增生、调节 T 细胞生长、分化和效应完成、控制胸腺素功能等免疫调节作用,上述结果表明肠道菌群可以显著影响宿主的免疫能力<sup>[17]</sup>。

## 3 结论

将断乳期婴儿肠道菌群移植至无菌昆明小鼠建立断乳期人源菌群小鼠模型,与无菌小鼠模型进行对比,评价人源菌群移植对小鼠大脑、肠道发育及免疫等相关指标的影响。结果显示:断乳期人源菌群小鼠健康状况良好,能够部分模拟断乳期婴儿肠道菌群;肠道菌群对小鼠大脑、结肠发育及免疫性能等相关指标有显著影响。断乳期人源菌群模型的建立,为断乳期婴儿肠道菌群对宿主生理功能的影响、代谢性疾病发生、药物代谢等研究领域提供了有效的动物模型。

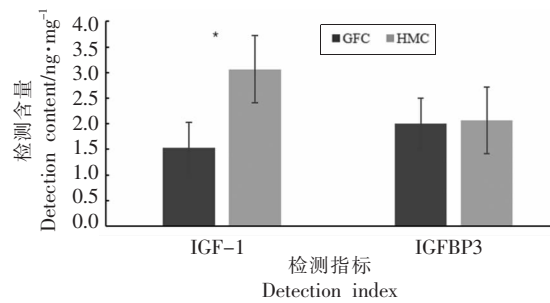


图8 肝脏中 IGF-1、IGFBP3 含量检测结果

Fig.8 The determination results of liver IGF-1 and IGFBP3 content

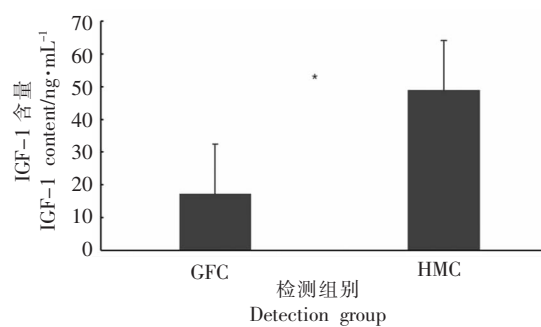


图9 血清中 IGF-1 含量检测结果

Fig.9 The determination results of serum IGF-1 content

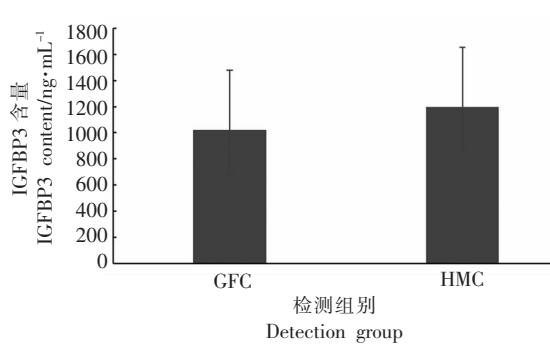


图10 血清中 IGFBP3 含量检测结果

Fig.10 The determination results of serum IGFBP3 content

## 参 考 文 献

- [1] SARAH J S, MICHAEL K G. Advocacy for improving nutrition in the first 1 000 days to support childhood development and adult health[J]. Pediatrics, 2018, 141(2): e20173716.
- [2] World Health Organization. UNICEF. Global strategy for infant and young child feeding[M]. Geneva: WHO, 2003: 7-16.



- [3] World Health Organization. Infant and young child feeding: Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals[M]. Geneva: WHO, 2009: 3–10.
- [4] World Health Organization. Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child [M]. Geneva: WHO, 2003: 5–17.
- [5] World Health Organization. Guiding principles for feeding non-breastfed children 6–24 months of age [M]. Geneva: WHO, 2005: 4–19.
- [6] KATHRYN G D. The challenge of meeting nutrient needs of infants and young children during the period of complementary feeding: An evolutionary perspective[J]. *The Journal of Nutrition*, 2013, 143(12): 2050–2054.
- [7] FEREDOUN A, PETER S. Breastfeeding and maternal and infant iodine nutrition[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 70(5): 803–809.
- [8] 郑跃杰. 婴幼儿肠道菌群和益生菌新进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 36–43.  
ZHENG Y J. Research progress of intestinal flora and probiotics in infants and young children [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017: 36–43.
- [9] 曾本华, 魏泓. 无菌动物与微生物生态学专题教学改革实践[J]. *中国微生物学杂志*, 2017, 29(3): 354–356.  
ZENG B H, WEI H. Innovative teaching of "Germ-free animal and microecology"[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(3): 354–356.
- [10] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884–i890.
- [11] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [12] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [13] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 846–849.
- [14] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [15] MATHIEU D M, CLEMENGINE B B, SOPHIE L. PUFA and their derivatives in neurotransmission and synapses: A new hallmark of synaptopathies[J]. *Proc Nutr Soc*, 2020, 79(4): 388–403.
- [16] NABUURS M J, HOOGENDOOM A, VANDERMOOLEN E J, et al. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands [J]. *Res Vet Sci*, 1993, 55(1): 78–84
- [17] SPADARO O, CAMELL C D, BOSURGI L, et al. IGF1 shapes macrophage activation in response to immunometabolic challenge[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(2): 225–234.

## Effect of Human Flora during Weaning on Growth and Development of Mice

Shi Yudong<sup>1,2,3</sup>, Liu Mengyao<sup>1,2</sup>, Song Chen<sup>1,2</sup>, Li Yongzhi<sup>1,4</sup>, Lu Weihong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Chemical Engineering and Chemistry, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001*

<sup>2</sup>*Institute of Extreme Environmental Nutrition and Protection, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001*

<sup>3</sup>*R & D Center, Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co. Ltd., Huhhot 011500*

<sup>4</sup>*Astronaut Research and Training Centre of China, Beijing 100094*

**Abstract** Objective: To establish a model of weaning human floral-associated mice and study on the effect of intestinal flora on the growth and development of mice. Methods: The intestinal flora of weaned infants was transplanted into germ free Kunming mice to establish a model of weaning human floral-associated mice. Weaning mice with human flora and germ free mice ( $n=9$ , for each group) were fed with basic diet until 8 weeks old. The body weight, brain fatty acid content, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) contents in



serum and liver were measured. The development of hippocampal CA1 area and colon were observed by HE staining. The differences of indexes between the two groups were compared, and the effects of intestinal flora on brain, intestinal development and immunity were analyzed. Results: The weaning human floral-associated mice were in good health and could partially simulate the intestinal flora of weaning infants. Intestinal flora had significant effects on the development of mice brain neuronal cells, synapses and colonic villi. The contents of monounsaturated fatty acids C16:1 ( $P < 0.001$ ), C18:1 ( $P < 0.01$ ) and polyunsaturated fatty acids C18:3 ( $P < 0.05$ ), C20:3 ( $P < 0.01$ ), C20:4 ( $P < 0.001$ ), C22:5 ( $P < 0.05$ ) and C22:6 ( $P < 0.01$ ) in mouse brain were significantly affected. It had a significant effect on the content of IGF-1 in serum and liver of mice. Conclusion: The weaning human floral-associated mice provides an effective animal model for the study of the effect of intestinal flora on host physiological function in weaning infants.

**Keywords** human floral-associated mice; weaning; intestinal microflora; development; immunity