

生脉散对人肠道菌群失衡的调节作用

花海莹,李雪晴,刘吉华*

(中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室,南京 211198)

摘要 通过建立头孢曲松钠所致人肠道菌群紊乱体外模型,结合菌群的选择性培养、平板计数及短链脂肪酸分析,研究经典名方生脉散对肠道菌群失调的调节作用。结果显示,生脉散高中低剂量($16.5, 11.2, 5.5 \text{ mg/mL}$)组能显著抑制肠杆菌、肠球菌的增殖,促进肠道益生菌乳酸杆菌、梭菌增殖。与模型组相比,给予中剂量生脉散培养24 h后,肠球菌、肠杆菌增殖分别被抑制了24.9%和19.1%,乳酸杆菌和梭菌的增殖分别提高了22.3%和25.8%。同时生脉散各剂量组均能显著促进肠道菌群产生丙酸和乙酸,抑制潜在致病菌的增殖,促进失衡肠道菌群向正常菌群结构发展。

关键词 生脉散;肠道菌群;益生菌;短链脂肪酸

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1000–5048(2016)01–0095–06

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20160114

引用本文 花海莹,李雪晴,刘吉华. 生脉散对人肠道菌群失衡的调节作用[J]. 中国药科大学学报,2016,47(1):95–100.
Cite this article as: HUA Haiying, LI Xueqing, LIU Jihua. *In vitro* study on the regulation of *Shengmai San* on dysbacteriosis of intestinal flora[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(1):95–100.

In vitro study on the regulation of *Shengmai San* on dysbacteriosis of intestinal flora

HUA Haiying, LI Xueqing, LIU Jihua*

Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To study the regulation effect of *Shengmai San* (SMS) on intestinal dysbacteriosis, ceftriaxone sodium was used to induce intestinal dysbacteriosis *in vitro*, together with bacteria cultured in the selective medium and enumerated by plate counting, and the short chain fatty acid were also analyzed. The results showed that SMS ($16.5, 11.2, 5.5 \text{ mg/mL}$) could significantly inhibit the proliferation of such potentially harmful bacteria as *Enterococci* and *Enterobacteriaceae*, while promoting the proliferation of *Lactobacillus* and *Clostridium*. Compared with the model group, the proliferation of *Enterococci* and *Enterobacteriaceae* was inhibited by 24.9% and 19.1%, while the proliferation of *Lactobacillus* and *Clostridium* was increased by 22.3% and 25.8%, respectively, in the medium dose of SMS group (11.2 mg/mL) at 24 h. Meanwhile, SMS in different concentrations significantly increased the accumulation of acetic acid and propionic acid generated by gut microbes which could significantly inhibit the proliferation of harmful bacteria. SMS showed probiotic effects on intestinal microflora imbalance induced by antibiotics *in vitro*.

Key words *Shengmai San*; intestinal flora; probiotics; short-chain fatty acid

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81173471)

人肠道菌群参与消化、吸收、代谢、营养和免疫等生理过程。现有研究表明,多种胃肠道疾病、肥胖症、糖尿病、心血管疾病和自身免疫性疾病等发生及发展的过程中均伴有肠道菌群失衡现象^[1]。

另一方面,正常的肠道菌群能产生丰富的短链脂肪酸(SCFA),不仅能为肠黏膜细胞提供能量,还可以降低结肠环境pH,抑制潜在致病菌的生长。肠道菌群产生的丙酸还能够调节羟甲基戊二酰辅酶A

(HMG-CoA)还原酶活性,从而降低血清中胆固醇的含量^[2]。

随着人们对肠道菌群与疾病发生和人体健康之间相关性认识的深入,中药对肠道菌群的调节作用也日益受到研究者的关注。研究表明:多种中药及其活性成分如四君子汤^[3]、党参多糖^[4]等均能促进肠道益生菌的生长。中药对人肠道菌群的调节作用,也可能是其发挥药效作用的重要环节之一。

生脉散是著名的中医传统方剂,最早见于金代张元素的《医学启源》,由人参、麦冬和五味子三味药材组成,具有强心、抗心律失常、增强免疫等多种药理活性,临床广泛应用于心脑血管疾病的治疗且疗效显著^[5]。研究显示,人参皂苷、麦冬MDG-1均能促进肠道有益菌群的生长^[6],但生脉散整方对肠道菌群的调节作用尚未见报道。本研究通过肠道菌群的体外厌氧培养,以抗生素头孢曲松钠诱导培养的肠道菌群失调,探索生脉散对失衡的人肠道菌群结构的调节作用,以及其对肠道菌群短链脂肪酸代谢的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

人参、麦冬、五味子购自安徽济人药业,经鉴定、复核,所用药材均符合《中华人民共和国药典》(2010年版)标准。头孢曲松钠(上海罗氏制药有限公司);乙酸、丙酸、丁酸均为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 培养基

BBL培养基、MRS培养基、梭菌选择性培养基、EMB培养基和肠球菌培养基均购自青岛海博生物技术有限公司。

含氮基础培养基:蛋白胨2 g,酵母膏2 g,NaCl 0.1 g, K₂HPO₄ 0.04 g, KH₂PO₄ 0.04 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCl₂ · 6H₂O 0.01 g, NaHCO₃ 2 g, L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g,胆盐0.5 g,0.025%刃天青溶液4 mL,吐温80 2 mL和6 mg/mL氯高铁血红素溶液1 mL,加入蒸馏水1 000 mL溶解后调节基础培养基pH至7.0,高压灭菌后待冷却至45℃,无菌加入维生素K₁(终浓度1 mg/mL)。

1.3 仪器

YQX-III厌氧工作站(上海跃进医疗器械有限公司);气相色谱仪(美国Bruker公司);高速冷冻离心

机(美国Thermo公司);冷冻干燥机(美国Labconco公司)。

2 方法

2.1 生脉散提取物的制备

按照人参、麦冬、五味子三者质量比1:3:1.5称取药材,分别加入10倍、8倍和6倍量的水,煎煮3次,每次1 h,过滤,滤液合并,冷冻干燥即为生脉散冻干样品。

2.2 人肠道菌群培养

受试者为23~27岁之间健康人群($n=5$),且在近2个月内未服用过抗生素。收集受试者的新鲜粪便,置于无菌的厌氧操作台中,使用10倍量的预先灭菌除氧的PBS(0.1 mol/L, pH 7.2)将其混悬,双层纱布过滤后将滤液以2 000 r/min 离心10 min,取上清液,即得含人肠道菌群的粪便悬液^[7]。

2.3 头孢曲松钠对培养人肠道菌群的影响

制备头孢曲松钠含量分别为3.9、7.8和15.6 μg/mL的含氮基础培养基^[8],接种粪便悬液1 mL,37℃厌氧培养(10% H₂、5% CO₂、85% N₂),分别于培养0,2,4,6,8,12,24 h时分别取样200 μL,置96孔板,以酶标仪测定在600 nm处的吸收度,以未接种菌液相同处理的培养基为空白对照。

2.4 生脉散对肠道菌群的影响

制备含3.9 μg/mL的头孢曲松钠和不同剂量生脉散(5.5、11.2和16.5 mg/mL)的含氮基础培养基,接种粪便悬液1 mL,混匀后37℃厌氧培养,分别于培养0,6,12,24 h时取培养菌液,进行选择性培养及短链脂肪酸检测。实验分为6组($n=3$),正常组:加入含氮培养基和粪便悬液;模型组:添加头孢曲松钠处理;生脉散低、中、高剂量组:头孢曲松钠处理后分别加入低、中、高剂量的生脉散;生脉散对照组:正常组添加中剂量的生脉散。

2.5 肠道菌选择性培养及平板计数

人体肠道内的细菌种类以双歧杆菌、乳酸杆菌、消化链球菌、梭杆菌和真杆菌为主,兼性厌氧菌和需氧菌如肠杆菌和肠球菌含量较低^[9],为此,选择肠道中5类代表性的可培养的主要细菌作为考察对象,分别是双歧杆菌、乳酸杆菌、梭菌、肠杆菌和肠球菌。培养菌液分别通过双歧杆菌BBL选择性培养基、乳酸菌MRS选择性培养基、梭菌选择性培养基、肠杆菌EMB培养基和肠球菌选择性培养

基的选择性培养,采用平板计数法进行菌体计数^[10]。结果以每毫升菌液中的菌落数的对数表示($\lg \text{cfu/mL}$)。

2.6 SCFA 含量测定

SCFA 的生成对人体有非常重要的生理功能^[11],主要由厌氧微生物发酵碳水化合物产生,包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸以及乳酸等。其中乙酸、丙酸、丁酸所占比例高达 85%,占产物的绝大部分。因此本研究通过对乙酸、丙酸和丁酸含量测定来研究生脉散对短链脂肪酸的影响。SCFA 含量检测采用气相色谱外标法^[12]。

2.6.1 SCFA 标准曲线的制备 精密称取乙酸、丙酸和丁酸的标准品,溶解于乙醚中,配制成线性范围 0.5~50 mmol/L 的标准溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤后,按浓度从低到高的顺序进行 GC 检测,记录各个浓度对应的峰面积并以峰面积对浓度作图,得到各种 SCFA 的标准曲线。

2.6.2 SCFA 样品溶液的制备 样品溶液的制备采用溶剂提取法^[12]。每组取培养菌液 1 mL,12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液 500 μL,加入 50% 硫酸 50 μL 和无水乙醚 250 μL,涡旋混匀后,10 000 r/min 离心 5 min,4 °C 静置 30 min,取乙醚上清液作为供试品溶液进行 GC 分析。

2.7 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student-t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义上的显著差异, $P < 0.01$ 为非常显著差异。

3 结 果

3.1 人肠道菌群失衡体外模型抗生素浓度的确定

3.1.1 头孢曲松钠的抑菌曲线 头孢曲松钠对培养的人肠道菌群的抑菌作用具有剂量依赖关系

(图 1),在培养至 24 h 时,低、中、高剂量的头孢曲松钠对人肠道菌群均有明显的抑制作用,而中、高剂量的头孢曲松钠抑菌作用较强,不适于生脉散对体外人肠道菌群失衡调整作用的研究。低剂量作用后,对菌群有明显抑制,且增长趋势较明显,有利于进一步研究生脉散对肠道菌群的调节。因此确定 3.9 μg/mL 为体外抗生素诱导人肠道菌群失衡的质量浓度。

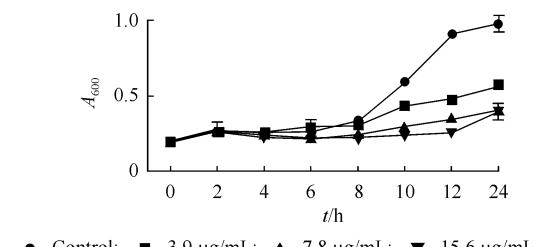


Figure 1 Bacteriostasis of ceftriaxone against human fecal bacteria in vitro ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.2 选择性培养基的平板计数 肠道菌群在含有 3.9 μg/mL 头孢曲松钠的培养基中培养不同时间后,菌群经过选择性培养分析结果见图 2。头孢曲松钠处理抑制了大部分的菌群,双歧杆菌、乳杆菌、梭菌、肠球菌和肠杆菌在 6 h 均出现显著下降。之后开始自行恢复,在培养至 24 h 时,乳酸杆菌、梭菌和肠杆菌仍显著低于正常水平($P < 0.01$),肠球菌和双歧杆菌与正常组无显著差异。

微生态学观点认为菌群失衡表现为原来的菌群(敏感菌)大部分被抑制,只有少数菌种(耐药菌)大量繁殖或外来细菌占据优势,成为优势菌群而引起新的感染^[13]。结合本实验结果可知,肠道菌群大部分被抑制,肠球菌和肠杆菌异常增殖,因此该浓度的头孢曲松钠作用可导致体外人肠道菌群出现失衡。

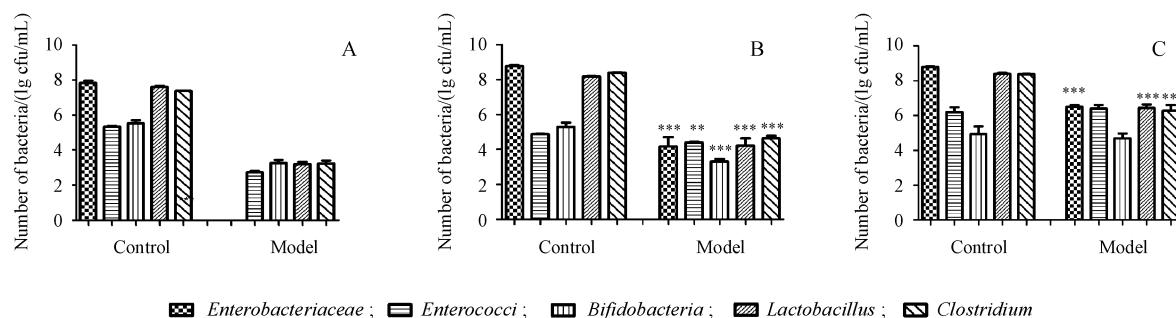


Figure 2 Effect of ceftriaxone on fecal bacteria in fermentation broth at 6 h (A), 12 h (B) and 24 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* * * $P < 0.0001$ vs control group

3.2 生脉散对头孢曲松钠造成人肠道菌群失衡的调节作用

3.2.1 生脉散对肠杆菌、肠球菌的调节作用 结果显示,在人肠道菌群体外失衡模型中,生脉散能显著抑制肠杆菌和肠球菌的数量(表1)。头孢曲松钠作用后,菌群出现失衡状态,对头孢曲松钠天然耐药的肠球菌和肠杆菌开始大量繁殖。与模型组相比,在不同培养时间点,生脉散中高剂量组均

能显著抑制肠球菌和肠杆菌的数目($P < 0.001$),生脉散低剂量组与模型组则无显著性差异。同时,正常生脉散组较正常组无显著性差异。

以上结果表明,在菌群失衡的模型下,生脉散中、高剂量组均对一些肠道致病菌(如肠杆菌和肠球菌)有一定的抑制作用,同时药物自身对正常菌群无显著性影响。

Table 1 Effect of Shengmai San (SMS) on the number of *Enterobacteriaceae*, *Enterococci* and *Clostridioides* in the model of intestinal flora imbalance induced by ceftriaxone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Bacteria	Group	Number of bacteria			
		0	6	12	24 h
<i>Enterobacteriaceae</i>	Control	5.50 ± 0.02	7.84 ± 0.12 ^{###}	8.79 ± 0.05 ^{###}	8.79 ± 0.05 ^{###}
	Model		0 ^{***}	4.18 ± 0.55 ^{***}	6.51 ± 0.08 ^{***}
	Model + SMS(5.5 mg/mL)		0 ^{***}	4.58 ± 0.14 ^{***}	6.72 ± 0.11 ^{***}
	Model + SMS(11.2 mg/mL)		0 ^{***}	0 ^{***} ^{###}	5.33 ± 0.10 ^{***} ^{###}
	Model + SMS(16.5 mg/mL)		0 ^{***}	0 ^{***} ^{###}	4.30 ± 0.01 ^{***} ^{###}
	Control + SMS(11.2 mg/mL)		7.43 ± 0.15 ^{***} ^{###}	9.11 ± 0.01 ^{###}	9.02 ± 0.13 ^{###}
	Control	3.26 ± 0.12	5.35 ± 0.12 ^{###}	4.88 ± 0.03 ^{##}	6.21 ± 0.27
<i>Enterococci</i>	Model		2.74 ± 0.07 ^{***}	4.41 ± 0.02 ^{* *}	6.40 ± 0.21
	Model + SMS(5.5 mg/mL)		0 ^{***} ^{###}	4.58 ± 0.01 [*]	6.58 ± 0.15
	Model + SMS(11.2 mg/mL)		0 ^{***} ^{###}	0 ^{***} ^{###}	5.28 ± 0.18 ^{**} ^{##}
	Model + SMS(16.5 mg/mL)		0 ^{***} ^{###}	0 ^{***} ^{###}	4.56 ± 0.28 ^{***} ^{###}
	Control + SMS(11.2 mg/mL)		4.89 ± 0.26 ^{***} ^{###}	6.50 ± 0.15 ^{###}	6.40 ± 0.15
	Control	6.19 ± 0.17	7.39 ± 0 ^{###}	8.41 ± 0 ^{###}	8.38 ± 0.03 ^{###}
	Model		3.24 ± 0.17	4.65 ± 0.13 ^{**} [*]	6.28 ± 0.33 ^{***}
<i>Clostridioides</i>	Model + SMS(5.5 mg/mL)		4.26 ± 0.35 ^{***} ^{###}	5.28 ± 0.42 ^{***} ^{##}	7.30 ± 0.36 ^{***} ^{##}
	Model + SMS(11.2 mg/mL)		4.55 ± 0.13 ^{***} ^{###}	5.40 ± 0.11 ^{***} [*]	7.72 ± 0.06 ^{***}
	Model + SMS(16.5 mg/mL)		4.84 ± 0.10 ^{***} ^{###}	5.06 ± 0.14 ^{***}	7.59 ± 0.02 ^{***}
	Control + SMS(11.2 mg/mL)		6.95 ± 0.15 ^{***} ^{###}	8.41 ± 0.02 ^{###}	8.44 ± 0.06 ^{###}

* * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group

3.2.2 生脉散对乳杆菌和双歧杆菌的调节作用

在人肠道菌群体外失衡模型中,原本属于优势菌群的双歧杆菌和乳杆菌数目急剧下降,且不易得到恢复(表2)。与模型组相比,生脉散低、中、高剂量组均能显著促进乳杆菌的增殖($P < 0.01$)。在培养0~12 h,生脉散低、中、高剂量组对双歧杆菌的作用不显著($P > 0.05$)。培养至24 h时,与模型组相比,生脉散高剂量组对双歧杆菌有显著性抑制作用($P < 0.01$)。同时,生脉散对照组较正常组无显著性差异。

以上结果表明,在菌群失衡的模型下,生脉散低、中、高剂量组均对一些肠道有益菌(如乳酸杆菌)有一定的促进增殖作用。生脉散低、中剂量组双歧杆菌的数目无显著影响,但生脉散高剂量组对双歧杆菌有一定的抑制作用,可能是因为五味子含

量增加,其抑菌作用增强的原因^[14],同时药物自身对正常菌群无显著性影响。

3.2.3 生脉散对梭菌的调节作用 与模型组相比,生脉散低、中、高剂量组均能显著促进梭菌的增殖($P < 0.01$),但培养至24 h时,仍显著低于正常组($P < 0.05$)(表1)。梭菌属有80多种,多为非致病菌,其中丁酸梭菌可用于因肠道紊乱引起的各种消化道症状及相关的腹泻、消化不良等^[15]。同时生脉散对照组较正常组无显著性差异。

以上结果表明,在菌群失衡的模型下,生脉散低、中、高剂量组均对梭菌具有促进增殖的作用,但仍未恢复至正常状态。同时药物自身对正常菌群无显著性影响。

3.3 生脉散对培养人肠道菌群产生SCFA的影响

生脉散对照组厌氧培养24 h的短链脂肪酸气

相色谱图见图3。

Table 2 Effect of SMS on the number of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the model of intestinal flora imbalance induced by ceftriaxone ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Bacteria	Group	Number of bacteria			
		0	6	12	24 h
<i>Bifidobacteria</i>	Control	4.50 ± 0.05	5.56 ± 0.17 ***	5.30 ± 0.25 ***	4.94 ± 0.45
	Model		3.27 ± 0.17 ***	3.30 ± 0.16 ***	4.71 ± 0.28
	Model + SMS (5.5 mg/mL)		3.24 ± 0.06 ***	3.41 ± 0.02 ***	3.81 ± 0.72
	Model + SMS (11.2 mg/mL)		3.33 ± 0.06 ***	3.47 ± 0.12 ***	3.62 ± 0.35 *
	Model + SMS (16.5 mg/mL)		3.06 ± 0.02 ***	3.02 ± 0.45 ***	2.70 ± 0.02 ** ##
	Control + SMS (11.2 mg/mL)		5.88 ± 0.03 ***	5.12 ± 0.40 ***	5.14 ± 0.17
<i>Lactobacilli</i>	Control	5.63 ± 0.02	7.61 ± 0.07 ***	8.19 ± 0.01 ***	8.41 ± 0.05 ***
	Model		3.20 ± 0.12 ***	4.24 ± 0.42 ***	6.44 ± 0.21 ***
	Model + SMS (5.5 mg/mL)		3.84 ± 0.14 ** ##	5.18 ± 0.44 ***	7.28 ± 0.24 *** ##
	Model + SMS (11.2 mg/mL)		4.02 ± 0.05 *** ##	5.39 ± 0.15 *** ##	7.70 ± 0.01 *** ##
	Model + SMS (16.5 mg/mL)		3.59 ± 0.19 *** #	5.21 ± 0.12 *** #	7.55 ± 0.04 *** ##
	Control + SMS (11.2 mg/mL)		6.73 ± 0.13 *** ##	8.89 ± 0.03 ***	8.61 ± 0.03 ***

* * P < 0.01, * * * P < 0.001 vs control group; ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs model group

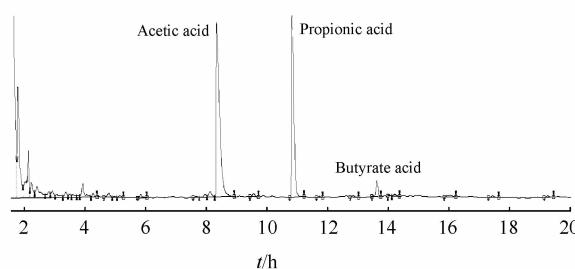


Figure 3 GC chromatogram of short chain fatty acid in anaerobic fermentation broth with SMS at 24 h

厌氧培养不同时间点的丙酸(图4-A)、丁酸(图4-B)、乙酸(图4-C)的含量测定。各组在6 ~

24 h 的时间段内,生成 SCFA 的量是不断增加的,在 24 h 取得最大值。与模型组相比,培养至 12 h 时,生脉散低、中剂量组对丁酸的生成有促进作用($P < 0.01$)。与模型组相比,在培养 24 h 时,生脉散对照组和生脉散低、中、高剂量组丙酸和乙酸含量均有显著性差异。

以上结果表明,在菌群失衡的模型下,生脉散不同剂量组均能显著性的增加短链脂肪酸的含量,SCFA 的生成降低肠道内的 pH 和氧化还原电位,可以防止潜在肿瘤的发生和抑制腐败菌的增殖^[16]。

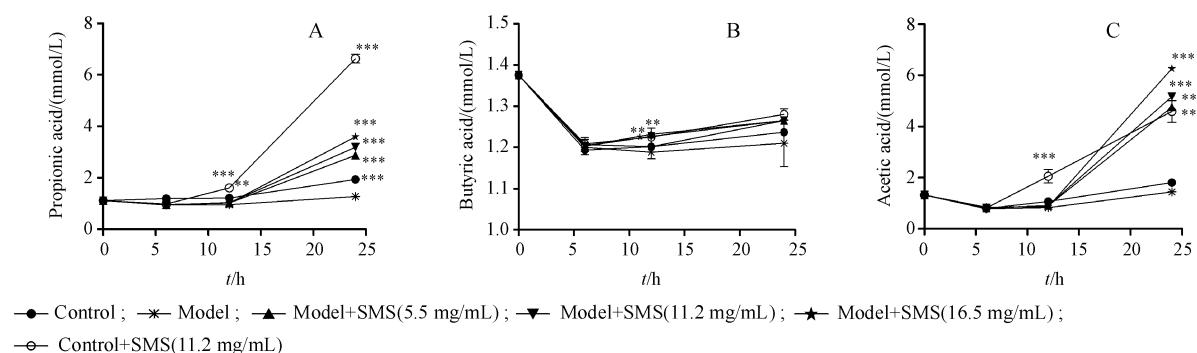


Figure 4 Production of SCFA in anaerobic fermentation broth at 0, 6, 12 and 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* * P < 0.01, * * * P < 0.001 vs model group

4 讨 论

肠道菌群包括益生菌和潜在致病菌,正常情况下两类菌保持平衡,当平衡被打破,一些潜在致病菌大量繁殖或者转移到肠道以外的其他部位,就会

引起感染从而造成身体疾病,严重的甚至会引起死亡^[17]。

本研究通过头孢曲松钠改变体外人肠道菌群的结构,造成双歧杆菌、乳杆菌和梭菌数目的减少,肠球菌和肠杆菌的异常增殖以及代谢异常。给予

生脉散后,低、中、高剂量组对乳杆菌、梭菌增殖具有促进作用,且中、高剂量组对肠球菌、肠杆菌有明显抑制作用,高剂量组对双歧杆菌也具有抑制作用,因此生脉散中剂量组对失衡的肠道菌群有明显的正向调整作用。

短链脂肪酸为碳链1~6的有机脂肪酸,人体内的短链脂肪酸主要为乙酸、丙酸和丁酸,这3种约占总短链脂肪酸的85%^[18]。研究发现乙酸可能是降低血液胆固醇的真正原因^[19],动物实验显示丙酸盐可以抑制肝和结肠内低密度胆固醇的合成^[20]。本研究结果表明生脉散能显著提高培养肠道菌群SCFA的含量,尤其是乙酸和丙酸的生成量。SCFA的生成对人体维持大肠的正常生理功能,降低肠道pH,抑制腐败菌的增殖,改善肠道微环境具有重要意义。

以上结果提示,生脉散对失衡的人肠道菌群的正向调节作用以及对SCFA代谢的调节,可能是其发挥药效作用的重要环节之一。

参考文献

- [1] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, **464** (7285): 59–65.
- [2] Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis [J]. *Exp Biol Med*, 1990, **195**(1): 26–29.
- [3] Wang Z, Peng Y, Li XB. Effect of *Sijunzi* decoction on the intestinal flora disturbance in two rat models of pi-deficiency syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2009, **29**(9): 825–829.
- [4] Wang G, Ma SX, Hu XJ, et al. Effects of polysaccharides from Radix Codonopsis on the growth of *Bifidobacteria* and *E. coli* in vitro [J]. *Chin J Microecol* (中国微生态学杂志), 2010, **22**(3): 199–201.
- [5] Wang YQ, Zhang JQ, Liu CH, et al. Screening and identifying the myocardial-injury protective ingredients from *Sheng-Mai-San* [J]. *Pharm Biol*, 2013, **51**(10): 1219–1227.
- [6] Wang LY, Wang S, Wang Y, et al. Effect of MDG-1 on oral glucose tolerance and intestinal microecological balance in diabetic mice [J]. *World Chin J Dig* (世界华人消化杂志), 2011, **19**(19): 2058–2062.
- [7] Wang HY, Hua HY, Liu XY, et al. *In vitro* biotransformation of red ginseng extract by human intestinal microflora: metabolites identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, **98**(2014): 296–306.
- [8] Ma LP, Zhao JF, Wang LJ, et al. Prebiotic function *in vitro* of alpha-galactooligosaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth [J]. *Food Sci Technol* (食品科技), 2013, **38**(5): 217–223.
- [9] Moore W, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians [J]. *Appl Microbiol*, 1974, **27**(5): 961–979.
- [10] Zhu NY, Bei YJ, Zheng TL, et al. Comparison of bacteria floras in intestines of healthy and diseased Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) and in aquatic water [J]. *Acta Agric Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2014, **26**(5): 1176–1179.
- [11] Liu XH, Li SM, Xiong YL. Research progress on effect and mechanism of short chain fatty acid for intestinal tract [J]. *Parenter Enteral Nutr* (肠外与肠内营养), 2012, **19**(1): 56–58.
- [12] Jia YQ, Ye FY, Wang S, et al. Extraction and determination of short-chain fatty acids in biological samples [J]. *Res Explor Lab* (实验室研究与探索), 2012, **31**(7): 262–264.
- [13] Tang H. Enteric dysbacteriosis caused by antibiotic and modulation of the intestinal microflora by *Lactobacillus* spp (抗生素所致肠道菌群失衡及乳杆菌对其调节作用的研究) [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2007.
- [14] Yan SY, Lin SQ, Fu J, et al. Evaluation of bacteriostatic activity of extract from *Schisandra chinensis* fructus [J]. *Chin J Exp Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2014, **20**(10): 142–146.
- [15] Hiromi S, Masaaki S, Tadao M, et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI [J]. *Pediatr Int*, 2003, **45**(1): 86–90.
- [16] Schneider SM, Girard-Pipau F, Filippi J, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(39): 6165.
- [17] Gumaer F, Casellas F, Borruel N, et al. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2002, **56**(4): S34–38.
- [18] Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1996, **31**(S216): 132–148.
- [19] Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, et al. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates [J]. *N Engl J Med*, 2009, **360**(9): 859–873.
- [20] Alvaro A, Sola R, Rosales R, et al. Gene expression analysis of a human enterocyte cell line reveals downregulation of cholesterol biosynthesis in response to short-chain fatty acids [J]. *IUBMB Life*, 2008, **60**(11): 757–764.