

Galt基因编辑小鼠的肠道菌群分析

季子涵^{1,2*}, 刘桂福^{1,2}, 岳鹏鹏^{1,2}, 于鸿浩^{1,2#}

¹桂林医学院智能医学与生物技术学院, 广西 桂林

²广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室, 广西 桂林

收稿日期: 2024年4月17日; 录用日期: 2024年4月30日; 发布日期: 2024年5月31日

摘要

目的: 本研究旨在分析半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(Galactose-1-Phosphateuridylyltransferase, Galt)基因编辑后对小鼠肠道菌群的影响。方法: 基于前期构建的Galt基因编辑小鼠模型, 通过16S rRNA基因测序技术, 对比野生型(Wild type, WT)和Galt基因编辑小鼠肠道内容物中的菌群组成。结果: 结果显示, Galt基因编辑小鼠肠道菌群多样性下降, 菌群丰富度减少; 物种组成也发生显著性变化。Galt基因编辑组中厚壁菌门占比由69.836%降低45.096%, 拟杆菌门占比由15.824%增加到37.672%, 变形菌门的相对丰度由1.82%增加到13.175%, 脱硫弧菌门的相对丰度由5.42%降低到0.36%。在属水平上, 未分类的木桶科属和嗜冷杆菌属相对丰度在Galt基因编辑组中上调, 葡萄球菌属和脱硫弧菌属在WT组中上调。进一步对两组小鼠KEGG功能差异分析, 结果显示小鼠碳水化合物运输和代谢, 能量产生和转化, 氨基酸运输和代谢以及与复制, 重组和修复相关的基因方面等功能上存在差异。结论: Galt基因编辑对小鼠肠道菌群的丰富度、组成和功能有影响。

关键词

肠道菌群, 16S rRNA基因测序, Galt, 功能差异分析

Analysis of Gut Microbiota in Galt Editing Mice

Zihan Ji^{1,2*}, Guifu Liu^{1,2}, Pengpeng Yue^{1,2}, Honghao Yu^{1,2#}

¹School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical College, Guilin Guangxi

²Guangxi University Key Laboratory of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Guilin Guangxi

Received: Apr. 17th, 2024; accepted: Apr. 30th, 2024; published: May 31st, 2024

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Objective: The purpose of this study was to analyze the effect of Galactose-1-phosphateuridylyl-transferase gene knockout on intestinal flora in mice. **Methods:** The *Galt* mouse model was constructed by CRISPR/Cas9 technology. The composition of gut microbiota in WT group and *Galt* group was compared by 16S rRNA gene sequencing. **Results:** The diversity of intestinal flora decreased, and the richness of flora decreased. At the phylum level, the proportion of *Firmicutes* and *Desulfovibrio* in the *Galt* group decreased, and the proportion of *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* increased. At the genus level, the relative abundance of unclassified *Photinia* and *Psychrobacter* was up-regulated in the *Galt* group, and the relative abundance of *Staphylococcus* and *Desulfovibrio* was up-regulated in the WT group. Further analysis of KEGG functional differences between the two groups of mice showed that there were differences in carbohydrate transport and metabolism, energy production and transformation, amino acid transport and metabolism, and replication in mice. **Conclusion:** *GALT* gene knockout affects the richness, composition and function of intestinal flora in mice.

Keywords

Intestinal Flora, 16S rRNA Gene Sequencing, *Galt*, Functional Difference Analysis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人体中有数万亿个微生物细胞，它们的协同作用被认为对人类的生命至关重要。这些微生物细胞群在肠道隔间中达到最高密度，在那里它们共同形成一个复杂的微生物群落，称为肠道微生物群[1]。肠道微生物是指居住在人类肠道中的微生物群落，包括细菌、真菌、病毒和原生动物等[2]。这些微生物对人体健康具有重要影响，它们帮助消化食物、合成维生素[3]、保护肠道免受病原体侵害[4]，参与调节免疫系统[5]。半乳糖可以作为肠道微生物的营养来源之一，尤其是对那些能够发酵半乳糖的菌群[6]。在 Quinn EM 和 THOMSON P 的研究中指出肠道微生物中的双歧杆菌等有益菌可以利用半乳糖进行发酵，产生短链脂肪酸，这些物质对维持肠道健康和调节免疫功能具有正面作用[7] [8]。因此，适量摄入半乳糖有助于促进这些有益菌的生长，从而维护肠道微生态平衡。然而，过量摄入半乳糖，特别是在半乳糖酶活性不足的情况下，可能导致肠道不适，如腹泻、腹胀和腹痛等症状[9]。除此之外，半乳糖血症患者必须遵循严格的饮食限制，避免摄入任何含半乳糖的食物。由于患者体内缺乏或完全没有半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(GALT)或该酶活性不足，导致无法正常代谢半乳糖[10]。

为了研究 GALT 基因突变的致病机理，RIEHMAN K 等人以酵母为对象，发现 *Galt* 基因的突变降低了 GALT 酶活力[11]。随着研究的深入，LESLIE N D 等构建了 *Galt* 敲除小鼠模型，通过提高小鼠半乳糖摄入量发现小鼠生长发育迟缓等症状，除此之外小鼠的大脑和卵巢也出现不同程度的损伤[12]。我们通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建出 *Galt* 基因编辑小鼠模型，利用 16S rRNA 测序技术分析小鼠在 *Galt* 基因编辑使其半乳糖代谢能力下降的情况下对肠道微生物的影响，为探究 *Galt* 基因的致病机制提供新的研究思路 and 方向。

2. 材料与方法

2.1. 材料

10 只 SPF (Specific Pathogen Free) 级 C57BL/6J, 5 只野生型小鼠, 5 只 *Galt* 基因编辑杂合子小鼠, 并将其饲养于桂林医学院智能医学与生物技术学院动物实验室, 动物实验室室温为 23°C~24°C, 湿度为 40%~60%, 动物实验室每天光照和黑暗时长各为 12 h, 光照时间为早上 8 点至晚上 20 点, 黑暗时间为晚上 20 点至早上 8 点。本实验已通过动物伦理, 审批号为 GLMC201803033。

2.2. 实验方法

2.2.1. 16S rRNA 测序分析

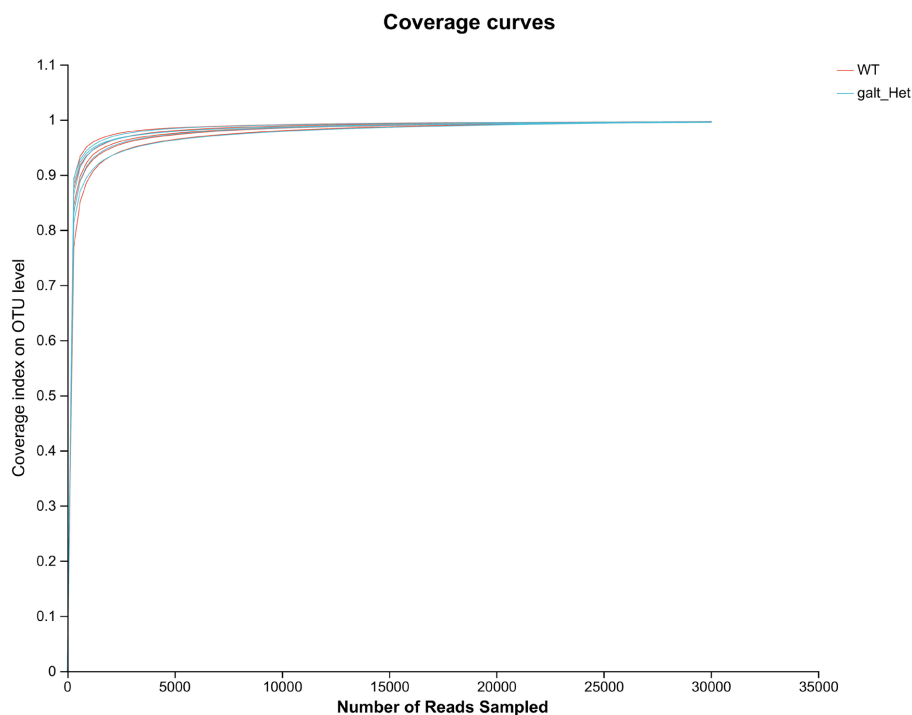
准备 WT 和 *Galt* 基因编辑杂合小鼠各 5 只, 采集小鼠粪便, 采集时轻轻挤尾巴根部直肠末端, 待排粪便即可收集于无菌 EP 管中, -80°C 冷冻; 或者采用抓取小鼠后颈, 固定住小鼠尾巴, 收集粪便, -80°C 保存。不同小鼠粪便取样前要更换器械并用酒精擦拭, 避免交叉污染。交由上海美吉生物公司进行 16S 测序分析。

2.2.2. 统计学分析

通过美吉生物提供的在线网站进行 α -多样性分析, 包括 Shannon 指数曲线和 OTUs 稀释曲线, 测量了物种丰富度。采用主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度(NMDS)进行群落分布相似性的 β -多样性分析, 通过分析不同样本群落组成的差异, 揭示样本间的差异和距离。采用线性判别分析效应量(LEfSe)分析两组间门和属水平的差异性。利用 PICRUS_t 软件预测了微生物的功能差异。

3. 结果

3.1. GALT 突变小鼠肠道微生物 α -多样性和 β -多样性分析



(A) 稀疏度曲线

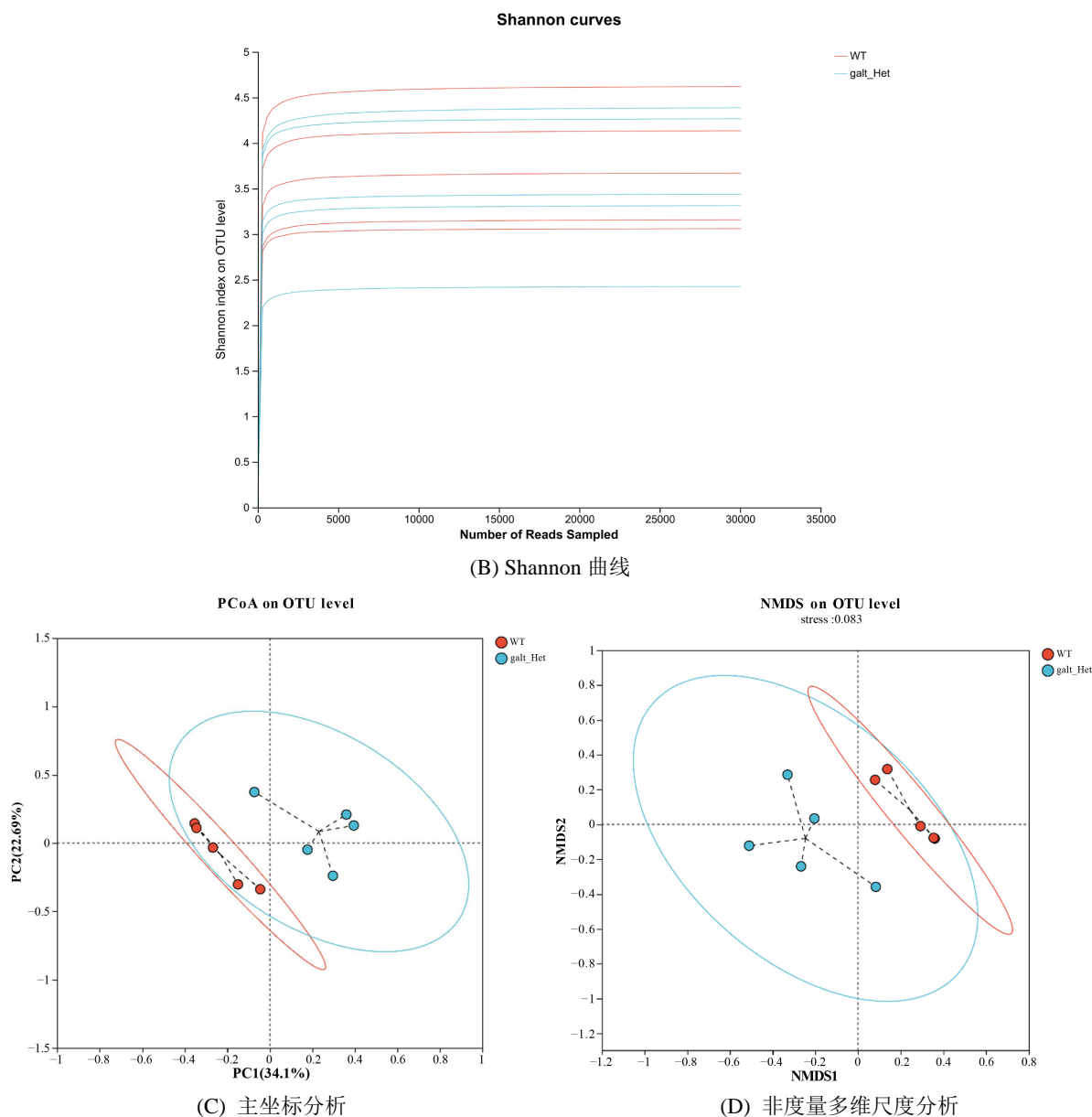


Figure 1. Analysis of intestinal microbial diversity

图 1. 肠道微生物多样性分析

从稀疏度曲线上看, 所有样品的测序覆盖率均在 99% 以上, 每组曲线均接近饱和, 说明样品中大部分微生物已被检测到, 数据真实可信(图 1(A))。选择 Shannon 指数分析微生物的 α -多样性, 结果显示物种丰富度无显著性差异(图 1(B))。通过主坐标分析(Principal Coordinates Analysis, PCoA)和非度量多维尺度(Non-Metric Multidimensional Scaling, NMDS)分析小鼠肠道微生物的 β -多样性。PCoA 结果显示 WT 组和 *Galt* 基因编辑组在第一主坐标(PC1)中位线有明显的分离, 并且 *Galt* 基因编辑组的置信椭圆与 WT 组有部分重叠, 表明小鼠的肠道菌群微生物构成有了显著的变化(图 1(C))。在 NMDS 分析结果中 stress = 0.083 < 0.1, 本次检验结果表现良好, *Galt* 基因编辑组和 WT 组的同组样本距离较近, 均集中在 NMDS 图的同一区域, *Galt* 基因编辑组和 WT 组点间距离较远, 说明样本微生物群落组间差异大于组内差异, 两组群落组成存在显著差异(图 1(D))。

3.2. 肠道菌群组成结构比较

采用 16S rRNA 基因测序技术从小鼠肠道菌群共鉴定出 1778 个 OTUs, 包括 11 门 15 纲 41 目 81 科 167 属 303 种。如图所示, WT 和 *Galt* 基因编辑组分别含有的 OUT 数量为 1190 和 1291, WT 和 *Galt* 基因编辑组分别特有的物种数量为 266 和 254, 由两组相比可知, *Galt* 基因编辑增加了小鼠肠道微生物群的丰度, 同时降低了小鼠肠道微生物群的多样性, OTU 数量增加了 8.49%, 物种下降了 4.51% (图 2(A))。

在门水平上, WT、*Galt* 基因编辑组两组别中相对丰度最高的 10 个细菌门, 其中有 4 个细菌门的相对丰度存在差异, 厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)是两组共有的优势菌门。厚壁菌门作为第一优势菌门, 在 WT 组中的相对丰度为 69.84%, 在 *Galt* 基因编辑组中降低到 45.1%。拟杆菌门作为第二优势菌门, 与 WT 组相比, 在 *Galt* 基因编辑组中其相对丰度为由 15.824% 上升至 37.672%。变形菌门(*Proteobacteria*)在 *Galt* 基因编辑组中的相对丰度为 13.175%, WT 组中降低到 1.82%。脱硫弧菌门(*Desulfobacteria*) WT 组中的相对丰度为 5.42%, 在 *Galt* 基因编辑组中降低到 0.36%。在属水平上, WT、*Galt* 基因编辑两组别中相对丰度最高的 10 个细菌属, 其中有 4 个细菌属的相对丰度存在差异, 未分类的木楠科属(*unclassified genus of the family Muribaculaceae*)在 *galt-Het* 组中的相对丰度为 31.78%, 而在 WT 组中降低到 10.78%。葡萄球菌属(*Staphylococcus*)在 WT 组中的相对丰度为 25.50%, *Galt* 基因编辑组中仅有 3.55%。嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)在 *Galt* 基因编辑组中的相对丰度为 13.03%, WT 组中降低到 0.05%。脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)在 WT 组中的相对丰度为 5.18%, *Galt* 基因编辑组中降低到 0.31%。这些结果说明 *Galt* 基因编辑会导致小鼠肠道微生物组成结构发生变化。

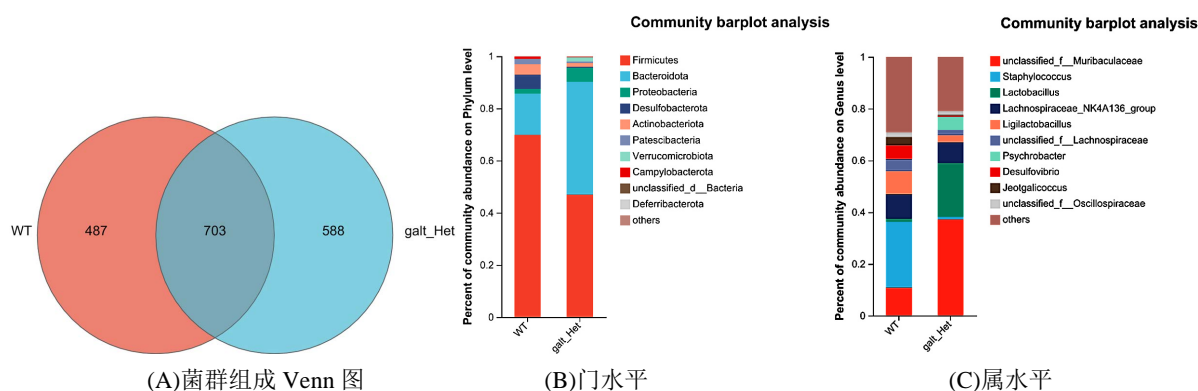


Figure 2. The bacterial composition of WT group and *Galt* group
图 2. WT 组和 *Galt* 基因编辑组菌群组成

3.3. 物种差异分析

Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) 分析可以对样品在不同分类水平下进行比较, 用线性判别分析(LDA)获得每个物种丰度影响差异的 LDA 值, 从而找到区分或影响不同样本的重要菌群。采用秩和检验的结果: $P < 0.05$, $LDA > 3.0$ 筛选不同基因型小鼠肠道中的差异菌株, 在不同的分类水平(门、纲、目、科、属、种)上发现了 40 株菌株具有显著性差异。WT 组中主要差异菌株为: 厚壁菌门的葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*)、肠球菌科(*Enterococcaceae*)、*Anaeroplasma*、链球菌科(*Streptococcaceae*)和放线菌门(*Actinomycetota*)的科里奥杆菌(*Coriobacteriia*); 其中链球菌科可以参与生物体的碳水化合物、氨基酸和脂质及维生素合成等生化代谢活动, 能够代谢碳水化合物, 如葡萄糖、果糖等, 并产生乳酸作为代谢产物。肠球菌科参与生物体的碳水化合物、氨基酸和脂质及维生素合成等生化代谢活动, 参与糖代谢途径, 能够分解和转化氨基酸, 参与氨基酸合成、降解和转运等过程以及合成维生素。葡萄球菌科的微生

物对生物体的生化代谢产生多方面的影响,包括酸碱平衡、能量代谢、蛋白质和脂肪代谢等方面。产生乳酸、分泌各种酶,包括蛋白酶和脂肪酶。

Galt 基因编辑组主要差异菌为:厚壁菌门的乳酸杆菌科(*Lactobacillales*)、支原体属(*Mycoplasma*),拟杆菌门的普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)和假单胞菌门(变形菌门)的嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)。嗜冷杆菌属是已确定的低致病性病原体,感染可能导致一系列症状,包括发热、感染部位肿胀、红肿、疼痛等。乳酸菌属是一类革兰氏阳性菌,其属多为有益菌,可以帮助机体消化和代谢蛋白质和碳水化合物,增强先天性和获得性免疫力,具有抗菌活性,能够调节肠道微生物群落的平衡,促进食物消化和营养吸收,缓解肠道炎症和感染等。而 *Prevotellaceae*_UCG-001——益生菌,参与短链脂肪酸的产生、糖类的代谢、脂肪酸的代谢,有助于促进营养物质的吸收、调节免疫系统功能和维持肠道菌群的稳定性。

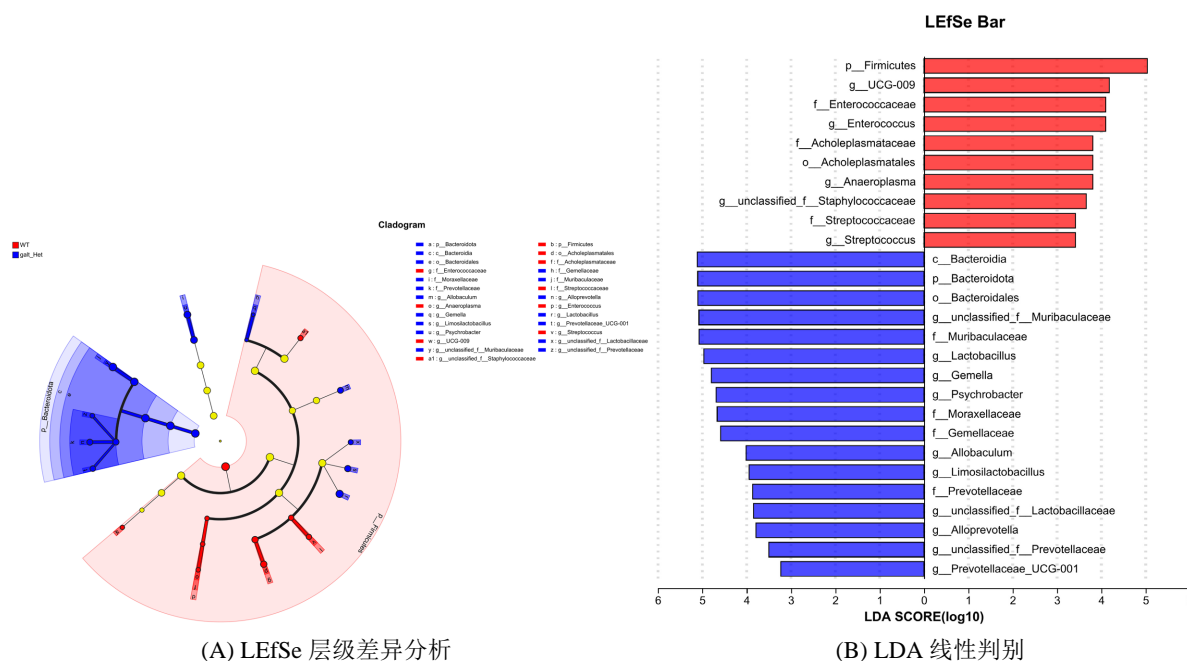


Figure 3. Analysis of species difference of intestinal flora
图 3. 肠道菌群物种差异分析

3.4. 功能预测分析

通过 PICRUST2 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>)软件对 OTU 丰度表进行归一化处理,绘制 KEGG 通路热图。

在一级通路上,物种功能注释结果显示,两组肠道菌群均注释出新陈代谢、遗传信息处理、细胞过程、环境信息处理、人类疾病、生物体系统 6 种功能代谢通路。*Galt* 组相对于 WT 组,各项代谢都有一定程度的下降,其中,在遗传信息处理和环境信息处理代谢方面的功能下降比较明显,表明 *Galt* 基因编辑小鼠对于外界环境适应性下降,以及可能会有 DNA 的受损和突变,增加患癌等疾病的风险。

二级通路结果显示 *Galt* 组相对 WT 组在耐药性:抗肿瘤药、运输和分解代谢、神经退行性疾病、传染病:病毒性、癌症:特定类型、消化系统、排泄系统、循环系统、药物依赖性、发展与再生方面的表达升高,表明 *Galt* 基因编辑小鼠对于癌症、传染病等疾病的患病风险增大,同时小鼠自身存在对于 *galt* 的负反馈调节,其对于提高代谢效率、增强抵抗力方面的表达相对于正常小鼠有所增加。

深入三级通路进行两组间菌群差异功能比较分析发现, *Galt* 组相对 WT 组在不同环境中的微生物新

陈代谢、氨基酸的生物合成、碳代谢、转运蛋白磷转移酶系统(PTS)通路上功能下调,表明 Galt 基因编辑小鼠无法有效地利用环境中的资源,在合成蛋白质以及对特定营养物质的吸收能力降低,使得代谢产生的能量供应不足,导致生长受限或生理失调,影响能量代谢和信号传导途径。

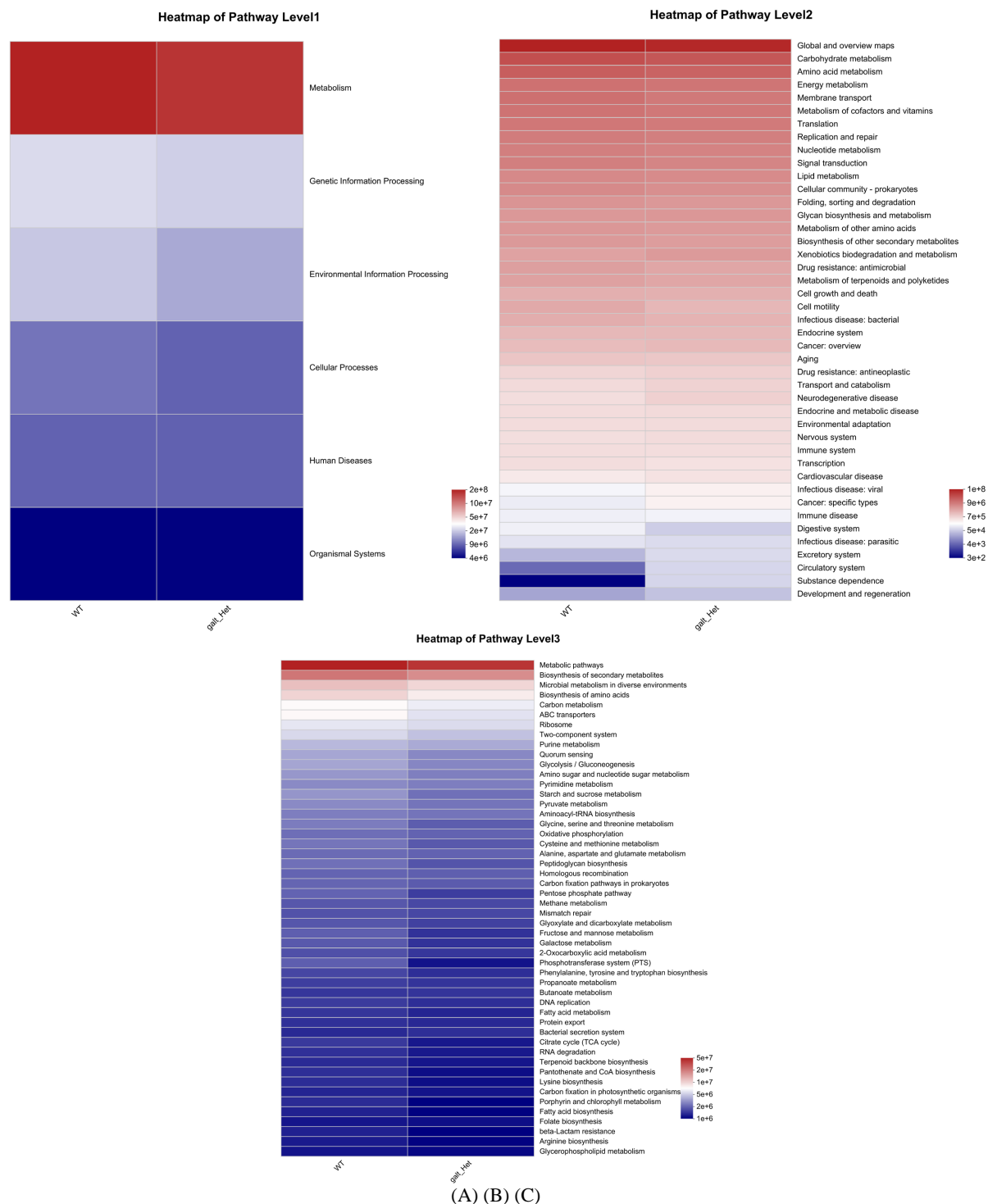


Figure 4. 1~3 KEGG pathway heat map
图 4. 1~3 级 KEGG 通路热图

4. 讨论

经典半乳糖血症是一种潜在致命的常染色体隐性遗传病, 由半乳糖-1-p 尿苷基转移酶(GALT)严重缺乏引起, GALT 是半乳糖代谢 Leloir 途径中的中间酶[13]。在正常的代谢活动中, 摄入乳糖后会分解成半乳糖, 半乳糖在半乳糖激酶(Galactokinase 1, GALK1)作用下被转化为半乳糖-1-磷酸, 而 GALT 酶将会利用半乳糖-1-磷酸产生葡萄糖-1-磷酸参与糖代谢, 当 GALT 酶异常时会导致半乳糖-1-磷酸堆积从而产生半乳糖血症[14] [15]。在人体中肠道微生物群主要由两个门类组成, 分别是厚壁菌门、拟杆菌门[16], 厚壁菌门细菌能够通过发酵作用分解糖类物质, 产生能量、酸、醇和气体等代谢产物。例如, 乳酸菌通过发酵糖类产生乳酸, 这在食品发酵(如酸奶、泡菜)和人体肠道健康中非常重要[17]。拟杆菌门也参与人体中许多重要的代谢活动[18]。乳糖代谢异常可能会影响厚壁菌门和拟杆菌门中的微生物的组成, 从而影响机体的健康。

在本研究中, 利用 CRISPR/Cas9 靶向小鼠 *Galt* 基因, 成功构建 *Galt* 基因编辑小鼠。 α -多样性和 β -多样性分析结果显示 *Galt* 基因编辑改变了小鼠肠道菌群组成, 使小鼠的肠道菌群多样性降低, 丰富度上升。在 Daniel Bello-Gil 等人的研究中, 通过对 GALT 敲除小鼠 16S 测序分析发现该 GALT 敲除小鼠的物种丰富度也发生显著变化[19]。本研究结果与其相似, 与 WT 小鼠相比, 物种的丰富度发生变化。通过物种组成和物种差异分析, *Galt* 基因编辑组相对于 WT 组肠道菌群的厚壁菌门和脱硫弧菌门丰度下降, 而拟杆菌门和变形菌门丰度上升。厚壁菌门主要是革兰氏阳性细菌, 可以分解复杂的碳水化合物、多糖和脂肪酸等为宿主生命活动提供能量来源[20] [21]。脱硫弧菌门降解了肠粘蛋白, 一种粘弹性粘液, 这将削弱或破坏肠道屏障, 这可能会使肠道上皮细胞直接暴露于肠道菌群[22]。拟杆菌门对炎症有一定的减轻作用[23] [24]。变形菌门的发生和生理学功能高度复杂, 能够帮助宿主利用碳源, 为宿主的能量积累发挥重要作用[25], 同时, 变形杆菌被认为是具有致病性的肠道共生体, 其成员的紊乱与很多疾病有关, 如炎症、肥胖等代谢综合征紊乱疾病[26] [27]。由功能预测分析, 可以得出 *Galt* 基因编辑使得小鼠的代谢系统功能上发生变化, 其对小鼠碳水化合物运输和代谢, 能量产生和转化, 氨基酸运输和代谢以及与复制、重组和修复相关的基因的代谢下降, 并且对于生殖发育及疾病的抵御方面影响较大。研究结果显示 GALT 敲除会影响小鼠肠道微生物的组成和多样性, 进而导致小鼠的肠道微生物功能差异。

参考文献

- [1] Barrett, K.E. and Wu, G.D. (2017) Influence of the Microbiota on Host Physiology—Moving beyond the Gut. *The Journal of Physiology*, **595**, 433-435. <https://doi.org/10.1113/JP273451>
- [2] Okubo, H., Nakatsu, Y., et al. (2018) Gut Microbiota as a Therapeutic Target for Metabolic Disorders. *Current Medicinal Chemistry*, **25**, 984-1001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009121702>
- [3] Franco-Lopez, J., Duplessis, M., Bui, A., et al. (2020) Correlations between the Composition of the Bovine Microbiota and Vitamin B12 Abundance. *MSystems*, **5**, E00107-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00107-20>
- [4] Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.K., et al. (2006) Regulation of an Tibacterial Defense in the Small Intestine by the Nuclear Bile Acid Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3920-3925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509592103>
- [5] Zheng, D., Liwinski, T. and Elinav, E. (2020) Interaction between Microbiota and Immunity in Health and Disease. *Cell Research*, **30**, 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
- [6] Bger, M., Leeuwen, S., Bueren, A., et al. (2019) Structural Identity of Galactooligosaccharide Molecules Selectively Utilized by Single Cultures of Probiotic Bacterial Strains. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **67**, 13969-13977. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05968>
- [7] Quinn, E.M., Joshi, L. and Hickey, R.M. (2020) Symposium Review: Dairy-Derived Oligosaccharides—Their Influence on Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract of Infants. *Journal of Dairy Science*, **103**, 3816-3827. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17645>
- [8] Thomson, P., Medina, D.A., Garrido, D., et al. (2017) Human Milk Oligosaccharides and Infant Gut Bifidobacteria:

- Molecular Strategies for Their Utilization. *Food Microbiology*, **75**, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.001>
- [9] Lai, K., Elsas, L.J. and Wierenga, K.J. (2009) Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life*, **61**, 1063-1074. <https://doi.org/10.1002/iub.262>
- [10] Waisbren, S.E., Tran, C., Demirbas, D., *et al.* (2021) Transient Developmental Delays in Infants with Duarte-2 Variant Galactosemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, **134**, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.07.009>
- [11] Riehman, K., Crews, C. and Fridovich-Keil, J.L. (2001) Relationship between Genotype, Activity, and Galactose Sensitivity in Yeast Expressing Patient Alleles of Human Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 10634-10640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009583200>
- [12] Leslie, N.D., Yager, K.L., Mcnamara, P.D., *et al.* (1996) A Mouse Model of Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Deficiency. *Biochemistry and Molecular Medicine*, **59**, 7-12. <https://doi.org/10.1006/bmme.1996.0057>
- [13] Welling, L., Bernstein, L.E., Berry, G.T., *et al.* (2017) International Clinical Guideline for the Management of Classical Galactosemia: Diagnosis, Treatment, and Follow-Up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **40**, 171-176. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9990-5>
- [14] Demirbas, D., Coelho, A.I., Rubio-Gozalbo, M.E., *et al.* (2018) Hereditary Galactosemia. *Metabolism*, **83**, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.025>
- [15] Timson, D.J. (2016) The Molecular Basis of Galactosemia—Past, Present and Future. *Gene*, **589**, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.077>
- [16] Abdulla, O.A., Neamah, W., Sultan, M., *et al.* (2021) The Ability of AhR Ligands to Attenuate Delayed Type Hypersensitivity Reaction Is Associated with Alterations in the Gut Microbiota. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 684727. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684727>
- [17] Gu, S., Yang, D., Liu, C., *et al.* (2023) The Role of Probiotics in Prevention and Treatment of Food Allergy. *Food Science and Human Wellness*, **12**, 681-690. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.001>
- [18] Toneatti, D.M., Albarracín, V.H., Flores, M.R., *et al.* (2017) Stratified Bacterial Diversity along Physico-Chemical Gradients in High-Altitude Modern Stromatolites. *Frontiers in Microbiology*, **8**, Article No. 646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00646>
- [19] Bello-Gil, D., Audebert, C., Olivera-Ardid, S., Pérez-Cruz, M., *et al.* (2019) The Formation of Glycan-Specific Natural Antibodies Repertoire in Galt Gene Editing Mice Is Determined by Gut Microbiota. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article No. 342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00342>
- [20] Furet, J.P., Firmesse, O., Gourmelon, M., *et al.* (2009) Comparative Assessment of Human and Farm Animal Faecal Microbiota Using Real-Time Quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**, 351-362. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x>
- [21] Sun, Y., Zhang, S., Nie, Q., *et al.* (2023) Gut Firmicutes: Relationship with Dietary Fiber and Role in Host Homeostasis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **63**, 12073-12088. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2098249>
- [22] Song, H., Wang, W., Shen, B., *et al.* (2018) Pretreatment with Probiotic Bifico Ameliorates Colitis-Associated Cancer in Mice: Transcriptome and Gut Flora Profiling. *Cancer Science*, **109**, 666-677. <https://doi.org/10.1111/cas.13497>
- [23] Frohman, E.M., Racke, M.K. and Raine, C.S. (2006) Multiple Sclerosis—The Plaque and Its Pathogenesis. *The New England Journal of Medicine*, **354**, 942-955. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052130>
- [24] Askari, H., Shojaei-Zarghani, S., Raeis-Abdollahi, E., *et al.* (2023) The Role of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease—Current State of the Art. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **23**, 1376-1389. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220914093331>
- [25] Lu, H.P., Wang, Y.B., Huang, S.W., *et al.* (2012) Metagenomic Analysis Reveals a Functional Signature for Biomass Degradation by Cecal Microbiota in the Leaf-Eating Flying Squirrel (*Petaurista alborufus* Lena). *BMC Genomics*, **13**, Article No. 466. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-466>
- [26] Wei, F., Xu, H., Yan, C., *et al.* (2019) Changes of Intestinal Flora in Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Northeast China. *PLOS ONE*, **14**, e0213063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213063>
- [27] Na, R.S., Tae, W.W. and Jin, W.B. (2015) Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends in Biotechnology*, **33**, 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>