

张佳,李永军,屈玲玲,等. 深度水解蛋白的无乳糖奶粉在无菌大鼠培育中的应用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 539-544.

Zhang J, Li YJ, Qu LL, et al. Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 539-544.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.015

深度水解蛋白的无乳糖奶粉在无菌大鼠培育中的应用研究

张佳,李永军,屈玲玲,毛孙炳,李兰娟*

(浙江大学附属第一医院,传染病诊治国家重点实验室,无菌实验动物平台,杭州 310003)

【摘要】 目的 无菌大鼠的培育中,出生后饲喂的人工配制乳对于无菌大鼠的培养至关重要。深度水解蛋白的无乳糖奶粉,便于婴幼儿吸收,减少了各种消化不良和过敏反应,那么在无菌大鼠使用的奶中加入这种奶粉是否会对无菌大鼠的培育有积极的作用,并且检测饲养成功的无菌大鼠的生化指标。**方法** 使用清洁级的SD大鼠,确定临产期,摘除子宫后,在隔离器内剥离大鼠幼崽,使用人工方法哺乳至22 d离乳,记录体重和生存率。使用的配方奶中,加入深度水解蛋白无乳糖奶粉的为实验组,对照组中加入全价配方奶粉。对培育成功的无菌大鼠在第8周时检测血生化指标。**结果** 在人工喂养的前14天,实验组与对照组在体重和生存率上都无差别,从第14天开始实验组的体重和生存率开始高于对照组,直至第22天实验组的生存率与对照组相比极显著提高(37.18% vs 17.78%),第22天的体重也显著高于对照组(9.96 ± 0.49) vs (13.36 ± 0.59)。无菌大鼠的血生化指标显示AST(天门冬氨酸氨基转移酶)降低,GLU(葡萄糖)升高。**结论** 在培育无菌大鼠幼鼠阶段的过程中,深度水解蛋白的无乳糖奶粉可以作为配方奶成分的重要的成分进行添加,可以有效的增加幼鼠体重,减少死亡率。雌性无菌大鼠的血生化指标变动较大。

【关键词】 无菌大鼠;深度水解蛋白;无乳糖奶粉;生化分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0539-06

Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation

ZHANG Jia, LI Yongjun, QU Lingling, MAO Sunbing, LI Lanjuan*

(State Key Laboratory for the Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Corresponding author: LI Lanjuan. E-mail: ljli@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective Artificially formulated milk fed after birth is essential for cultivating germ-free rats. Lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein is easily absorbed by infants and reduces indigestion and allergic reactions. We detected the biochemical indexes of germ-free rats to investigate whether adding lactose-free milk powder to their milk would have a positive effect on the rats. **Methods** Pregnant Sprague-Dawley rats were determined to be in labor. After surgically removing the uterus, the young rats were housed in isolators and artificially lactated for 22 days. Body weight and survival rates were recorded. The experimental group received lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein in their milk, and the control group received regular formula milk. The blood biochemical indexes were measured at 8 weeks. **Results** During the first 14 days of artificial feeding, body weight and survival rates did not differ between the

[作者简介] 张佳,实验员,研究方向:无菌动物培养。Email: zhjia2008@zju.edu.cn

[通信作者] 李兰娟,教授,研究方向:胃肠微生态。Email: ljli@zju.edu.cn

experimental and control groups. The weights and survival rates of the experimental group began to increase compared with those of the control group on day 14. The survival rate and body weights of the experimental group were significantly higher than those of the control group on day 22 [37.18% vs 17.78% and (9.96 ± 0.49) g vs (13.36 ± 0.59) g, respectively]. Blood biochemical indexes of the germ-free rats showed that their aspartate aminotransferase levels decreased, and their glucose levels increased. **Conclusions** In cultivating germ-free rat pups, lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein can be added to formula milk to effectively increase the weight of the young rats and reduce their mortality rate. Adding lactose-free milk powder to formula milk substantially changed the blood biochemical indexes of female germ-free rats.

【Keywords】 germ-free rats; deep hydrolyzed protein; lactose-free milk powder; biochemical analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

无菌大鼠,是指体内不存在任何包括细菌、病毒、真菌、原虫、支原体、衣原体、螺旋体、立克次体在内的活的生命体的动物,这种动物模型为研究和验证肠道微生态和宿主正常生理的相互关系提供了行之有效的办法。

在国内无菌大鼠以个别机构少量生产后自用为主,国内尚无无菌大鼠规模化培育成功及应用的报道。这导致了无菌大鼠大多是从国外引进。目前,国际上主要有两家专业机构提供无菌大鼠模型,但其费用昂贵、运输不便、维持困难^[1]。

无菌大鼠在培育过程中,由于肠道菌群的缺失,乳鼠在喂奶后往往出现消化不良,吸收障碍,腹泻、腹部胀气进而腹部发黑,相继死亡,这一过程是造成无菌大鼠培育失败的主要原因之一。配方奶中蛋白质为大分子颗粒,对于幼鼠的吸收很困难,在胃肠微生物缺失的环境下,更易出现各种消化问题。另外在肠道中,由于乳糖酶的缺少会产生乳糖不耐,进而产气。深度水解蛋白无乳糖奶粉不仅不含乳糖,而且蛋白分子被深度水解为小分子蛋白,在人类婴幼儿的哺乳中被使用,增加婴幼儿营养的吸收,减少乳糖不耐症的发生,促进生长发育^[2]。无菌大鼠的培养中,使用深度水解蛋白的无乳糖奶粉是否会提高培育无菌大鼠的成活率,目前尚无文献报道,本实验将通过使用深度水解蛋白的无乳糖奶粉和普通全价奶粉的使用,观察是否在培育无菌大鼠中对乳鼠生存率有影响,进一步促进无菌大鼠的培育工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只清洁级的 SD 大鼠,390~420 g,孕期 20 d,购于浙江省实验动物中心【SCXK(浙)2019-0002】。

40 只即将临产的普通级新西兰白兔,4.2~4.9 kg,由浙江省农业科学院提供【SCXK(浙)2017-0001】。动物实验在浙江大学附属第一医院无菌动物实验室进行【SYXK(浙)2019-0012】,经医院实验动物中心伦理委员会审批(2018 实动快审 749 号)。无菌大鼠隔离器内的温度为 33~34℃,12 h/12 h 昼夜交替,相对湿度 60%~70%,所有操作均符合实验动物福利和伦理委员会的要求。

1.1.2 试剂与仪器

小牛血清购于 Gibco 公司,婴幼儿奶粉对照组为普通婴儿奶粉,品牌为惠氏爱儿乐(S-26),实验组为深度水解蛋白的无乳糖奶粉,品牌为雀巢蔼儿舒。脑心浸液培养基、硫乙醇酸钠盐培养基购于美国 BD 公司,胰酪大豆胨液体培养基购于海博生物公司。兔乳为本实验室自制:临产母兔至产仔后第 20 天,每日人工挤奶收集,混合后测量乳糖含量,调整乳糖浓度为 25 g/L 后用来配制。软塑隔离器、空气过滤器、传递罐和灭菌筒购于冯氏实验动物设备有限公司。无菌大鼠血生化指标的分析仪器为深圳蓝韵医疗器材公司的全自动生化分析仪 LW C400。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠子宫摘除

使用清洁级的 SD 大鼠,选择怀孕时间已经为 20 d 的未生产母鼠,分别用推算法、触诊法、观察法和综合法进行判断,预测并确定孕鼠最终生产的时间点。将预测生产时间点和实际生产时间点进行比较,两者相差 1 h 以内的结果认定为判断准确。

CO₂ 麻醉后,用剪刀沿腹中线剪开皮肤,剪开腹肌,露出子宫。用手将子宫托起,用止血钳将子宫颈和两侧输卵管夹住,沿止血钳子宫远端宫颈和输卵管剪断。离体子宫放入传送袋中,经灭菌漂槽(内装 37℃ 的 2% 过氧乙酸),转入手术隔离器。在

手术隔离器内,用 0.1 mol/L 氢氧化钠中和子宫表面的过氧乙酸后,用两把组织镊将子宫及羊膜撕开。挤出胎鼠,擦去口鼻处羊水,用镊子轻轻夹捏胎鼠的尾巴,刺激其呼吸。然后剪断脐带,2 h 后开始人工哺乳。

1.2.2 人工乳的配制

在配制无菌大鼠人工乳的方面,为了减少其他

营养因子的干扰,参考了文献报导中的配方^[3],进行简化后配制,对照组的配方见表 1,实验组配方为将对照组中的普通婴幼儿奶粉替换为无乳糖深度水解奶粉,配制好以后⁶⁰Co 辐照消毒。根据计算三个阶段的乳糖含量:实验组为 13.5 g/L、14.75 g/L 和 16.25 g/L,对照组为 17.95 g/L、19.74 g/L 和 21.24 g/L。

表 1 无菌大鼠配方乳配料表

Table 1 Ingredients of germ-free rat formula milk

饲养时间 (天) Time (d)	兔乳 (mL) Rabbit milk (mL)	婴幼儿奶粉 (g) Infant formula (g)	小牛血清 (mL) Calf serum (mL)	灭菌水 (mL) Sterile water (mL)
0 ~ 6	54	3.4	12	34
7 ~ 15	59	3.8	16	25
16 ~ 21	65	3.8	16	19

1.2.3 乳鼠人工哺乳

根据乳鼠日龄的不同选用适宜的人工乳和吮吸乳头,连接好人工哺乳装置,将人工乳充满整个注射器、连接硅胶管和吮吸的人工乳头中,左手拇指和食指固定乳鼠头部,另外三个手指轻轻捏住动物,右手拇指和食指夹持人工乳头近乳头端一厘米处,挤出一滴乳诱导其张开嘴巴,然后将乳头插入乳鼠口中,放在舌头之上。这时用右手的拇指和食指轻轻堵在乳鼠口部。观察注射器内的液面变化情况。如果出现液面下降,说明乳鼠开始吮吸。哺乳到第 22 天离乳自由舔食,每日称量体重,计数死亡数和腹黑数。

1.2.4 无菌检测

在隔离器内收集无菌大鼠粪便、饲料、垫料、饮用水、棉拭子(皮毛、水瓶嘴、隔离器通风口、隔离器内壁)于无菌试管中,无菌操作下从隔离器内取出。粪便标本中加入适量无菌双蒸水制成粪便悬液,棉拭子标本中加入少量无菌双蒸水(以没过样品为宜),用吸管充分混匀。

在无菌操作台分别取 0.5 mL 样品溶液接种于已配置好的脑心浸液培养基、硫乙醇酸钠培养基、胰酪大豆胨培养基内,并各自设置阴、阳性对照,阳性对照样品为 SPF 大鼠粪便。接种后将硫乙醇酸钠培养基、脑心浸液培养基置于 37℃ 培养,胰酪大豆胨培养基置于 26℃ 培养。培养 14 d,逐日观察有无细菌或真菌生长。在培养第 7 天和第 14 天,从 37℃ 培养的液体培养基中转种相应的血培养基平板,再于 37℃ 培养 4 d,观察平板上有无细菌或真菌生长。

1.2.5 无菌大鼠血生化指标

8 W 的无菌大鼠雌雄各 3 只,麻醉后采血,室温

放置 30 min,3000 r/min 离心 30 min 分离血清。测试指标有:ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶)、ALB(白蛋白)、BUN(血尿素氮)、CR(血肌酐)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯)和 GLU(葡萄糖)。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行分析,以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 差异极具有显著性。运用卡方检验对两种人工配置乳的饲养结果进行计算。

2 结果

2.1 无菌大鼠模型的建立

共培养 10 个批次的无菌大鼠,其中对照组 4 个批次,起始培养数为 45 只,22 d 离乳存活数为 8 只。实验组为 6 个批次,起始培养数为 78 只,22 d 离乳存活数为 29 只。无菌检测结果均为阴性。

2.2 无菌大鼠的生长曲线

使用添加两种不同奶粉的配方奶饲养的无菌大鼠,其体重变化见图 1,在出生后的 1 ~ 7 d 体重呈现下降的趋势,从第 7 天开始,无菌大鼠的体重开始增加,直至第 14 天,体重增幅达到相同;从第 14 天开始体重增幅变化趋势发生变化,使用深度水解蛋白低乳糖奶粉的实验组,体重的增幅明显高于了使用全价奶粉的对照组。

2.3 死亡无菌大鼠的腹黑率

对 2 组哺乳无菌大鼠的腹黑率进行统计,对照组共死亡 37 只,其中 35 只发生腹黑,比例为 94.59%;实验组共死亡 49 只,40 只发生了腹黑的现

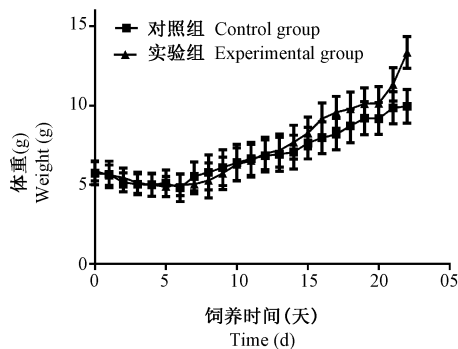


图 1 无菌大鼠的生长曲线

Figure 1 Growth curve of germ-free rats

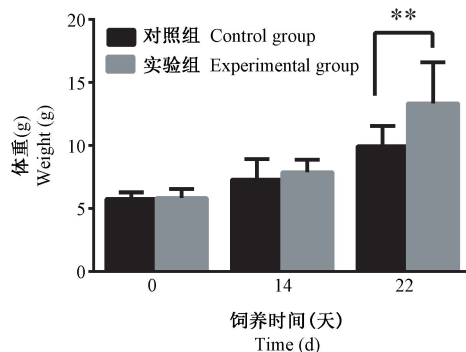
象,腹黑率为 81.63%,对比可见实验组的腹黑率低于对照组(81.63% vs 94.59%)。

2.4 无菌大鼠的体重对比

如图 2 所示,选取了 0,14 和 22 d 的体重进行比较。第 0 天(5.76 ± 0.08) vs (5.83 ± 0.08) 和第 14 天的体重(7.3 ± 0.36) vs (7.89 ± 0.16) 均无显著的差异,第 22 天实验组的体重显著高于对照组(9.96 ± 0.49) vs (13.36 ± 0.59),差异极具有显著性($P < 0.01$)。

2.5 无菌大鼠的生存曲线

根据生长曲线和体重的分析对比发现,在 14 d 左右饲养的无菌大鼠的生理数据出现了差别,所以生存曲线被分为 0 ~ 14 d 和 14 ~ 22 d 分别计算。由图 3A 所示,在培养的前 14 d,实验组和对照组的生存率无差别($P = 0.82$)。图 3B 显示实验组在第 14 ~ 22 天的生存率差异极具有显著性($P = 0.0002$),实验组的生存率极显著高于对照组。



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 无菌大鼠的体重对比

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

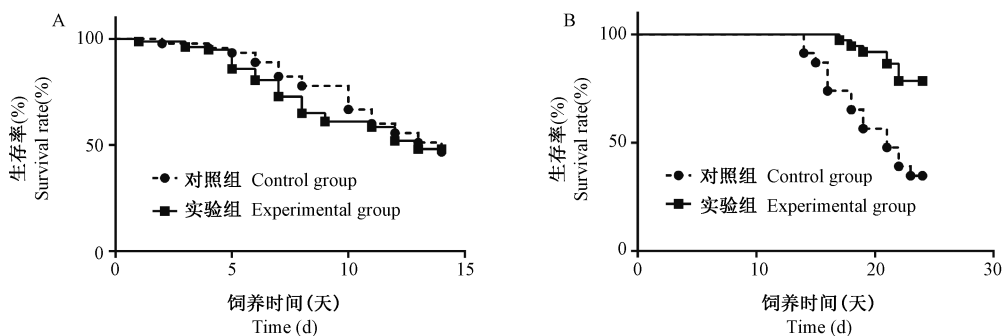
Figure 2 Weight comparison of germ-free rats

2.6 对两组无菌大鼠的卡方检验

将两组无菌大鼠实验数据做成表 2 的分类统计表格,假设 H_0 : 无菌大鼠的存活率与配方奶中添加何种奶粉无关,即二因子相互独立。 H_A : 无菌大鼠的存活率与配方奶中添加何种奶粉有关,即二因子彼此相关。统计推断结果为 $\chi^2 = 4.24 > \chi^2_{0.05} = 3.84$, $P < 0.05$, 否定 H_0 接受 H_A 。说明无菌大鼠的存活率和添加奶粉的类型显著相关。

2.7 无菌大鼠血生化指标检测结果

由表 3 所示,雌雄无菌大鼠的 BUN(血尿素氮)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯)表现为差异显著。其余 5 项 ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶)、ALB(白蛋白)、CR(血肌酐)、GLU(葡萄糖)雌雄间差异无显著性。



注:A:0 ~ 14 d 的生存曲线;B:14 ~ 22 d 的生存曲线。

图 3 无菌大鼠的生存曲线

Note. A, the survival curve of 0 - 14 days. B, the survival curve of 14 - 22 days.

Figure 3 Survival curve of germ-free rats

表 2 实验组和对照组 22 d 存活率的分类统计表(内为理论数值)

Table 2 Classified statistics of 22-day survival rates in the two groups(The numbers in parentheses are theoretical values)

组别 Groups	死亡数 Number of deaths	存活数 Number of survivors	列总和 Column sum	存活率 Survival rates
对照组 Control group	37(31.46)	8(13.54)	45	17.78%
实验组 Experimental group	49(54.54)	29(23.46)	78	37.18%
行总和 Row sum	86	37	123	—

表 3 无菌大鼠血生化指标结果

Table 3 Results of blood biochemical indexes of germ-free rats

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶 ALT(U/L)	天门冬氨酸氨基转移酶 AST(U/L)	白蛋白 ALB(g/L)	血尿素氮 BUN(mmol/L)	血肌酐 CR(μmol/L)	总胆固醇 TC(mmol/L)	甘油三酯 TG(mmol/L)	葡萄糖 GLU(mmol/L)
雄性 Male	53.00 ± 5.80	126.90 ± 48.63	32.43 ± 0.50	6.19 ± 0.21	50.40 ± 2.95	2.22 ± 0.15	0.55 ± 0.11	9.45 ± 1.37
雌性 Female	56.60 ± 1.60	104.40 ± 41.47	33.73 ± 2.49	6.99 ± 0.42	57.00 ± 6.74	2.84 ± 0.23	1.44 ± 0.48	11.31 ± 3.00
平均值 Average	54.80 ± 4.29	115.67 ± 42.26	33.08 ± 1.76	6.59 ± 0.53	53.70 ± 5.89	2.53 ± 0.38	1.00 ± 0.58	10.38 ± 2.32
P 值 P value	0.359	0.574	0.426	0.041 *	0.195	0.018 *	0.035 *	0.381

注: * 表示雌雄间存在显著性差异($P < 0.05$)。
Note. * represents significant difference between male and female ($P < 0.05$).

3 讨论

无菌动物是非常好的研究模型,现已发现肠道菌群的失衡与糖尿病、感染性疾病、炎症性肠病、肝病,甚至脑部疾病等多种疾病的发生密切相关^[4-8]。而无菌大鼠的成功培育非常困难,其技术要求高(人工哺乳技术)、需要特殊环境、专门仪器(隔离器)、成本高、污染率高、成功率低。1945 年,Reyniers 报道无菌大鼠繁殖成功后,其他研究者对无菌大鼠的培育也曾反复进行研究,但研究方法比较繁琐,甚至还有保守的成分存在,报道内容不尽详细,都使得无菌大鼠的培育受到制约^[1, 3, 9-13]。

在无菌大鼠的培养过程中,从出生人工喂养到断奶,这一过程无疑是最重要的环节,只要度过这个时期,就会为后面的成年无菌大鼠饲喂和种群扩繁提供可靠的保障。而人工喂养的乳鼠,由于在无菌的环境下,没有肠道菌群的参与和人工配制乳配方的缺陷,往往到断奶时有很高的死亡率。

无菌大鼠配方奶中的动物乳中含有一种或多种蛋白,可以引发胃肠道和呼吸道的不良过敏反应,深度水解牛乳蛋白奶粉通过超高温加热和酶切等技术的加工,将牛乳中蛋白质分子变小,或成为多肽、氨基酸,使其不含食物蛋白以减少动物乳蛋白的致敏性,降低发生牛乳蛋白过敏的概率^[2]。另

外,非水解奶粉平均粒径大,消化过程复杂,在胃中消化时会产生脂滴聚集的现象,消化不彻底,而深度水解的乳蛋白奶粉可以避免或减少这些情况,消化的更为快速,因此深度水解的配方奶粉对于动物的生长有显著的促进作用。这两项重要因素与无菌大鼠饲养培育实验的结果相符合,实验组在后期显著提高了无菌大鼠的体重和存活率。

由于无菌大鼠饲养的环境中不存在微生物,造就了自身特殊的生理条件,比如成年无菌大鼠的消化系统中,麦芽糖酶、蔗糖酶、海藻糖酶、纤维二糖酶和乳糖酶的活性大大高于普通饲养条件中的大鼠。另外,无菌大鼠出生前,乳糖酶的活性便开始增加,出生时的活性就为无菌成年大鼠的 2.6 倍左右,在出生后的第 7 天左右达到最高点,约为无菌成年大鼠的 4 倍,随即下降,20 d 左右降低到平台期保持不变,纤维二糖酶也有着相似的变化曲线^[14-15]。

这些无菌大鼠的生理特点与实验中的生理数据变化相呼应,培养的无菌大鼠在离乳人工饲喂的前 7 d,两组实验的无菌大鼠都呈现出体重不增反降,可能是人工饲喂的应激期,待习惯了这种饲喂方式,体重开始增加。持续到第 14 天,体重的增加和生存率都没有差别。从第 14 天开始,饲喂深度水解的无乳糖奶粉实验组的体重增幅明显高于对照全价奶粉组,而死亡率低于实验组。由于实验组中

添加了不含乳糖的奶粉,使得实验组中的乳糖含量低于对照组,而乳糖酶的活性在第 14 天下降到的水平成为了拐点,使得对照组不能充分利用吸收的乳糖开始增加,渗透压增高,造成一系列的乳糖不耐和消化不良反应,从而降低了体重的增速,增加了死亡率。

在无菌大鼠饲喂的配方奶方面,根据查到的文献都比较复杂繁琐,本研究中简化了相关配方,虽然免乳在配方中超过了总量的 50%,婴儿奶粉只是作为补充的添加,但是即便如此,使用深度水解无乳糖奶粉的实验组还是在生存率和体重增速上优于实验组,说明深度水解无乳糖的奶粉在无菌大鼠的培育中确实起到了促进作用,下一步的工作中,继续增加这种奶粉的比重,是否会进一步提高无菌大鼠繁育的成活率还有待进一步的研究。

无菌大鼠的血生化分析中,可以看到,由于在无菌环境下生长,大鼠的生化指标有所变化,相比较于清洁级的大鼠^[16],AST(天门冬氨酸氨基转移酶)降低,GLU(葡萄糖)升高。在性别分组的比较上,有三项表现为差异具有显著性,分别是 BUN(血尿素氮)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯),根据结果分析, $BUN(6.19 \pm 0.21) \text{ mmol/L}$ vs $(6.99 \pm 0.42) \text{ mmol/L}$ 和 $TC(2.22 \pm 0.15) \text{ mmol/L}$ vs $(2.84 \pm 0.23) \text{ mmol/L}$ 的差异扩大样本量后可以消除,但是 $TG(0.55 \pm 0.11) \text{ mmol/L}$ vs $(1.44 \pm 0.48) \text{ mmol/L}$ 结果的表现雄性显著低于雌性,结合雌性无菌大鼠血糖也显著升高,在无菌环境下,雌性无菌大鼠的生理生化指标受到的影响较大,这种差别是否是由于雌性对无菌环境更为敏感造成的,具体机制还需实验证实。

参 考 文 献(References)

- [1] 易萍. 无菌大鼠模型的建立及相关生物学特性研究 [D]. 杭州:浙江大学; 2013.
Yi P. Establishment of the germfree rat models and its Characteristic study [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2013.
- [2] 张阔. 不同水解度婴儿配方奶粉体外消化特性及对小鼠生长发育影响 [D]. 杭州:浙江工商大学; 2019.
Zhang K. *In vitro* digestibility of infant formula with different degree of hydrolysis and its effect on growth and development of mouse [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University; 2019.
- [3] 王建国. 无菌大鼠的人工培育及相关实验研究 [D]. 杭州:浙江大学; 2006.
Wang JG. Establishment of germfree rats and their techniques [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2006.
- [4] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 313-323.
- [5] Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? [J]. *World J Gastroentero*, 2011, 17(5): 557-566.
- [6] Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases [J]. *World J Gastroentero*, 2010, 16(4): 403-410.
- [7] Thion MS, Low D, Silvén A, et al. Microbiome influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner [J]. *Cell*, 2017, 172(3): 500-516.
- [8] Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1109-1113.
- [9] 王建国, 李兰娟, 卢领群, 等. 动态调节人工乳粘稠度和营养成分饲喂无菌大鼠效果研究 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2007, 33(3): 259-264.
Wang JG, Li LJ, Lu LQ, et al. Effect of dynamic regulation of viscosity and nutritional ingredients of milk-substitutes on artificial rearing of germfree rats [J]. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci)*, 2007, 33(3): 259-264.
- [10] 戴方伟, 萨晓婴, 周莎桑, 等. 无菌大鼠培育中无菌检测影响因素分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 65-69.
Dai FW, Sa XY, Zhou SS, et al. Investigation of the influencing factors for sterile examination in germfree-reared rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2008, 18(9): 65-69.
- [11] 王荫槐, 王安京, 孙淑华, 等. 人工培育繁殖无菌大鼠的研究(简报) [J]. 中国医学科学院学报, 1991, 3: 207.
Wang YH, Wang AJ, Sun SH, et al. Study on artificial breeding of germfree rats (briefing) [J]. *Acta Acad Med Sin*, 1991, 3: 207.
- [12] 仇慧敏, 孙淑华, 胡晓燕, 等. 无菌大鼠血液学及血液生化指标正常参考值的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 26-31.
Zhang HM, Sun SH, Hu XY, et al. Detection of blood parameters and blood biochemical parameters in germ-free rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(5): 26-31.
- [13] 朱祥宇, 刘君芳, 周淑佩, 等. 无菌大鼠培育的技术创新及其繁育探讨 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(1): 61-65.
Zhu XY, Liu JF, Zhou SP, et al. Technical innovation and breeding research in germ-free rats [J]. *Lab Anim Sci*, 2017, 34(1): 61-65.
- [14] Reddy BS, Pleasants JR, Wostmann B. Effect of dietary carbohydrates on intestinal disaccharidases in germfree and conventional rats [J]. *J Nutr*, 1968, 95(3): 413-419.
- [15] Reddy BS, Wostmann BS. Intestinal disaccharidase activities in the growing germfree and conventional rats [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1966, 113(3): 609-616.
- [16] 王冬平, 隋丽华, 尚世臣, 等. 清洁级 SD 大鼠血液生理生化指标的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 44-46.
Wang DP, Sui LH, Shang SC, et al. Values of blood physiological and biochemical in clean animal SD rat [J]. *Chin J Comp Med*, 2009, 19(9): 44-46.

[收稿日期] 2020-02-19