

乳铁蛋白素 B 和天蚕素 P1 对投喂大肠杆菌断奶仔猪生长及肠道微生物区系的影响

侯振平¹ 印遇龙² 王文杰¹ 刘景喜¹ SOUFFRANT W B³

(1. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125; 3. 德国国家畜生物研究所, Dummerstorf D-18196)

摘要: 本研究旨在探讨投喂大肠杆菌后乳铁蛋白素 B(Lfcin B)和天蚕素 P1 (Cec P1)对断奶仔猪生长及肠道微生物区系影响。选用 48 头 28 日龄断奶的德国大白杂交二代断奶仔猪 [(7.18 ± 1.32) kg], 根据体重、窝别、性别将其随机分成 4 组: 对照组、产肠毒素组 (ETEC)、乳铁蛋白素组 (Lfcin B)、天蚕素组 (Cec P1), 每组 2 个重复, 每个重复 6 头猪, 试验期为 12 d。结果表明, 1) 试验期间对照组、ETEC 组、Lfcin B 组、Cec P1 组仔猪体重及平均日增重均差异不显著 ($P > 0.05$)。2) ETEC 组仔猪腹泻率显著高于其他组 ($P < 0.05$), 而其他组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。在进行第 1 次攻毒后, 即仔猪 29 日龄, ETEC 组、Lfcin B 组和 Cec P1 组仔猪的粪便干物质均显著下降 ($P < 0.05$), 第 2 次攻毒后的第 2 天, 即仔猪 31 日龄, Lfcin B 组和 Cec P1 组的仔猪分别饲喂了 Lfcin B 和 Cec P1, 对照组仔猪的粪便干物质仍显著高于 ETEC 组和 Lfcin B 组 ($P < 0.05$), 但已与 Cec P1 组差异不显著 ($P > 0.05$)。3) 各组仔猪的肠道微生物区系差异不显著 ($P > 0.05$)。由此可知, 各组仔猪生长及肠道微生物区系差异不显著, 但 Cec P1 来源于猪肠道微生物寄生线虫, 比 Lfcin B 更能适应肠道环境, 更有利于仔猪健康。

关键词: Lfcin B; Cec P1; ETEC; 断奶仔猪; 肠道; 微生物区系

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)09-1536-09

抗菌肽是生物体抵御外源性病原微生物入侵而产生的一类小分子多肽, 具有分子量小、热稳定性好、抗细菌和真菌及病毒, 甚至原虫和肿瘤的广谱活性及抗菌机制独特等优点, 是动物先天免疫系统的重要组分, 广泛存在于动物界中。抗菌肽能耐受饲料制粒时的高温作用; 规模化发酵生产抗菌肽时经高温浓缩工序, 可充分杀灭菌体而不导致抗菌肽失活, 产品在应用后不会出现工程菌扩散而导致的环境生态问题^[1], 抗菌肽作为饲料添加剂对细菌有抑制作用, 能够促进畜禽生长, 提高饲料利用率, 动物采食后在体内一般无残留, 在饲料中长期添加抗菌肽, 细菌不易获得耐药性, 使用效果稳定, 属无毒副作用、无残留、无致细菌耐药性的一类环保型饲料添加剂^[2]。

乳铁蛋白素 B (lactoferricin B, Lfcin B) 是从牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF) 的 N 端 (17 ~ 41) 被胃蛋白酶水解下来的 25 个氨基酸残基, 其中的 11 个氨基酸残基具有与完整的 Lfcin B 相同的抗菌活性, 虽然没有铁离子结合位点, 但杀菌活性甚至比乳铁蛋白 (LF) 高^[3-5]。天蚕素 P1 (cecropin P1, Cec P1) 是第 1 个从猪肠微生物寄生虫中分离出的抗菌肽^[6], 由 31 个氨基酸组成, 其氨基酸序列为 SWLSKTAKKLENSAKKRISGIA-IAIQGGPR, 与昆虫 Cec A 和 Cec B 分别有 64% 和 75% 的相似性。

目前有很多关于 Lfcin B 和 Cec P1 的表达载体构建和体外活性测定^[7-17], 但关于 Lfcin B 在动物生产应用上的报道很少, 甚至没有关于 Cec P1

收稿日期: 2011-03-17

基金项目: 国家 863 项目 (2008AA10Z316); 国家自然科学基金面上项目 (30700581); 中德联合培养博士项目

作者简介: 侯振平 (1978—), 女, 河南扶沟人, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为微生物与营养。E-mail: hzp2006@126.com

在动物生产应用上的报道,更是鲜有 Lfcin B 和 Cec PI 在动物生产应用上的比较。本研究旨在通过研究投喂大肠杆菌后 Lfcin B 和 Cec PI 对断奶仔猪生长及肠道微生物区系的影响,为抗菌肽在动物生产中的应用提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及饲料

试验选用 28 日龄的德国大白杂交二代断奶仔猪[(7.18 ± 1.32) kg]48 头,其饲料由德国家畜微生物所动物营养与生理研究室提供,基础饲

粮组成及营养水平见表 1,Lfcin B 和 Cec PI 浓度均为 1 mg/μL,由德国基因桥公司提供。

1.2 试验设计、饲养管理及样品采集

根据体重、窝别、性别将 48 头断奶仔猪随机分成 4 组:对照组、产肠毒素组[饲喂肠产毒性大肠埃希菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*, O149:K91:F4ac),ETEC 组]、乳铁蛋白组(Lfcin B 组)、天蚕素组(Cec PI 组),每组 2 个重复,每个重复 6 头猪,试验期为 12 d。试验的第 1、2 天(即仔猪 28、29 日龄)禁食,自由饮水。

表 1 基础饲料组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet

原料 Ingredients	含量 Content/%	营养水平 Nutrient levels ²⁾	含量 Content
大麦粉 Barley meal	30.00	干物质 DM/(g/kg)	888.0
小麦粉 Wheat meal	29.70	粗蛋白质 CP/(g/kg)	191.0
豌豆 Pea (44% starch)	5.00	灰分 Ash/(g/kg)	55.0
乳清蛋白粉 Whey powder	8.00	粗纤维 Crude fiber/(g/kg)	34.0
小麦麸皮 Wheat bran	2.50	粗脂肪 Crude fat/(g/kg)	50.0
浓缩大豆 Concentrated soybean	4.00	淀粉+糖 Starch + sugar/(g/kg)	455.0
玉米淀粉 Maize starch	4.00	赖氨酸 Lys/(g/kg)	12.5
土豆淀粉(纯化) Potato starch, purified	5.00	回肠可消化赖氨酸 Ileal digestible Lys/(g/kg)	11.0
玉米浓缩蛋白 Maize protein concentrates	2.20	蛋氨酸 Met/(g/kg)	4.4
葵花粕 Sunflower meal	2.50	回肠可消化蛋氨酸 Ileal digestible Met/(g/kg)	4.0
石粉 Limestone	1.02	蛋氨酸+半胱氨酸 Met + Cys/(g/kg)	7.8
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.78	回肠可消化蛋氨酸+半胱氨酸 Ileal digestible Met + Cys/(g/kg)	6.6
预混料 Premix ¹⁾	0.40	色氨酸 Try/(g/kg)	2.5
蛋氨酸 Met (99%)	0.11	回肠可消化色氨酸 Ileal digestible Try/(g/kg)	2.1
L-赖氨酸 L-Lys (79%)	0.34	苏氨酸 Thr/(g/kg)	8.0
色氨酸 Try (99%)	0.03	回肠可消化苏氨酸 Ileal digestible Thr/(g/kg)	6.5
丝氨酸 Thr (98%)	0.03	钙 Ca/(g/kg)	7.2
棕榈油+大豆油 Palm oil + soybean oil	3.10	总磷 Total phosphorus/(g/kg)	6.1
糖浆 Molasses	1.01	可消化磷 Digestible phosphorus/(g/kg)	3.7
食盐 NaCl	0.28	钠 Na/(g/kg)	2.5
合计 Total	100.00	钾 K/(g/kg)	8.5
		氯 Cl/(g/kg)	6.7
		铜 Cu/(mg/kg)	20.0
		锌 Zn/(mg/kg)	90.0
		净能 NE/(MJ/kg)	10.0

¹⁾ 预混料为每千克饲料提供 Premix provided the following per kilogram of the diet: VA 1 750 IU, VD₃ 200 IU, VE 11 IU, VC 11 IU, 泛酸 pantothenic acid 9 mg, 烟酸 niacin 12.5 mg, VB₁ 4 mg, VK 10.5 mg, 生物素 biotin 50 μg, VB₁₂ 15 μg, VB₂ 1.0 mg, VB₆ 1.5 mg, 叶酸 folic acid 0.3 mg, Fe 80 mg, Zn 54 mg, Mn 30 mg, Co 0.15 mg, I 0.14 mg, Se 0.25 mg, 抗氧化剂 antioxidant (E310、320、321) 50 mg。

²⁾ 营养水平均为计算值。The nutrient levels were calculated values.

每天 08:00 和 16:00 饲喂,自由饮水,记录饲料剩余情况和粪指数(评判方法:水样粪便为 1;软而成型为 2;坚硬为 3;非常坚硬为 4)、腹泻情况(粪指数为 1~2,包括 1,定为腹泻)、死亡头数,并逐只称重,计算腹泻率和平均日增重。除试验第 1 天(28 日龄)不采集粪样外,以后每天都采集新鲜粪样, -20 °C 保存,以备测定粪便干物质含量及提取 DNA。

1.3 攻毒试验

在仔猪 29 日龄的 08:00,除对照组的仔猪外,ETEC 组、Lfcin B 组、Cec P1 组的每头仔猪饲喂 4.2×10^9 CFU/mL ETEC。

在仔猪 30 日龄 06:00 开始提供饲料,在给 ETEC、Lfcin B、Cec P1 饲喂 5.5×10^9 CFU/mL 的 ETEC 2 h 后(08:00),用一次性注射器给 Lfcin B 组的每头仔猪口服饲喂 2 mg Lfcin B, Cec P1 组的每头仔猪口服饲喂 2 mg Cec P1。

1.4 样品分析

1.4.1 干物质的测定

称取 1 g 新鲜的粪样于陶瓷平皿中,放入恒温烘箱,60 °C 烘 24 h,然后再 105 °C 烘 3 h,称量剩余物质的重量。

1.4.2 DNA 提取、浓度测定及样品处理

取 200 mg 新鲜粪样,按照试剂盒的操作说明进行细菌总 DNA 提取,使用美国 NanoDrop® ND-1000 DNA/RNA/蛋白质浓度测定仪测 DNA 浓度,根据浓度大小及稀释倍数,换算成待测 DNA 浓度,并把管中 DNA 作相应稀释,以 20 ng/ μ L 分装,于 -20 °C 保存。根据记录的 A260/A230,估测 DNA 质量,一般 A260/A280 在 1.6~1.8,蛋白质含量为 0 时可以满足本试验要求。样品分析采用的是每天每组每头猪粪样 DNA 按照浓度 1:1 的比例混合而成的样品。

1.4.3 肠道微生物区系的测定

本试验参考 Nübel 等^[18]和 Felske 等^[19]发表的引物,引物 S-D-Bact-0008 和 Uni-1492-R 用作 PCR-16S rRNA 扩增, S-D-Bact-0968-GC 和 S-D-Bact-1401 用作 PCR-DGGE 扩增。引物由英国 Invitrogen 生物公司合成,超纯水溶解, -20 °C 保存。

用 nested-PCR 进行 16S rRNA 扩增,按照前人报道的方法^[20-21]进行 DGGE 的配制和电泳及胶

的染色、照相。每个样品都重复 3 次,然后取平均值。

1.5 统计分析

试验得到的图片用 BioNumerics 5.0 进行分析,然后用 Canoco 4.5^[22-23] 统计分析得到的数据,数值以平均值 \pm 标准差表示,并用 Statistica 6.0^[24] (ANOVA HSD-test) 进行差异性显著分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪体重和平均日增重的影响

由表 2 可知,对照组、ETEC 组、Lfcin B 组和 Cec P1 组仔猪体重和平均日增重差异不显著 ($P > 0.05$)。但在仔猪 29~30 日龄攻毒期、31~39 日龄恢复期及整个试验阶段来看,对照组仔猪保持较高的平均日增重, Cec P1 组次之。

2.2 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪腹泻的影响

给 28 日龄断奶仔猪投喂大肠杆菌后, Lfcin B 和 Cec P1 对仔猪腹泻的影响分别见表 3、图 1 和表 4。

由表 3 可见,ETEC 组仔猪腹泻率显著高于其他组 ($P < 0.05$),而其他组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。从图 1 可知, Lfcin B、Cec P1 对粪指数的影响不显著 ($P > 0.05$)。由表 4 可以看出,在进行第 1 次攻毒后,即仔猪 29 日龄,ETEC 组、Lfcin B 组和 Cec P1 组仔猪的粪便干物质均显著下降 ($P < 0.05$),说明本试验进行了比较成功的攻毒试验。在进行第 2 次攻毒后的第 2 天,即仔猪 31 日龄, Lfcin B 组和 Cec P1 组的仔猪分别饲喂了 Lfcin B 和 Cec P1,其粪便干物质含量开始有所回升,对照组仔猪的粪便干物质仍显著高于 ETEC 组和 Lfcin B 组 ($P < 0.05$),但已与 Cec P1 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪肠道微生物区系多样性的影响

2.3.1 PCR-16S rRNA 扩增结果

从新鲜粪样中提取细菌总 DNA,进行 PCR-16S rRNA 的 v6~v8 区 PCR 扩增,将扩增的 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶检测,扩增产物长度为 1 484 bp(图 2)。

表 2 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪体重和平均日增重的影响

Table 2 Effects of Lfcin B and Cec P1 on body weight and average daily gain of weaned piglets

项目 Items	对照组 Control group	ETEC 组 ETEC group	Lfcin B 组 Lfcin B group	Cec P1 组 Cec P1 group
体重 Bodyweight/kg				
28 日龄 28 days of age	6.96 ± 1.37	7.22 ± 1.08	7.10 ± 1.66	7.30 ± 1.27
29 日龄 29 days of age	6.65 ± 1.33	6.91 ± 1.05	6.83 ± 1.67	6.90 ± 1.27
39 日龄 39 days of age	8.98 ± 1.57	8.61 ± 0.88	8.33 ± 1.60	8.65 ± 1.32
平均日增重 Average daily gain/g				
29 ~ 30 日龄 29 to 30 days of age	86.11 ± 7.24	73.33 ± 9.35	73.61 ± 14.17	79.17 ± 9.56
31 ~ 39 日龄 31 to 39 days of age	230.46 ± 11.51	141.67 ± 4.27	168.52 ± 11.69	178.24 ± 8.17
28 ~ 39 日龄 28 to 39 days of age	168.33 ± 8.29	102.08 ± 4.34	115.97 ± 6.77	125.59 ± 7.78

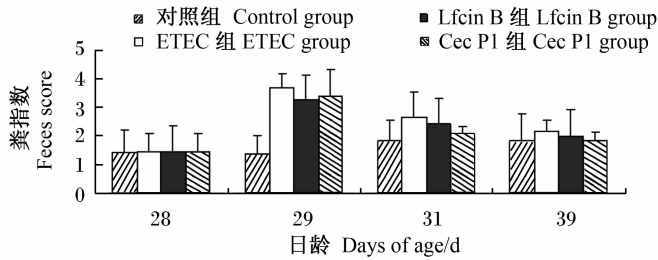
同行数据肩标不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 3 和表 4 同。

In the same row, values with different small letter superscripts differ significantly ($P < 0.05$)。The same as Table 3 and Table 4.

表 3 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪腹泻率的影响

Table 3 Effects of Lfcin B and Cec P1 on diarrhea rate of weaned piglets

项目 Items	对照组 Control group	ETEC 组 ETEC group	Lfcin B 组 Lfcin B group	Cec P1 组 Cec P1 group
试验期腹泻总次数 Total number of diarrhea during the experiment period/次	33	47	33	20
试验猪头数 Number of pigs in the experiment/头	12	12	12	12
试验期 Experimental period/d	12	12	12	12
腹泻率 Diarrhea rate/%	23 ^b	33 ^a	23 ^b	14 ^b



图柱上未标注小写字母表示差异不显著。图 5 至图 8 同。

Columns without small letters mean no significant difference ($P < 0.05$)。The same as Fig. 5 to Fig. 8.

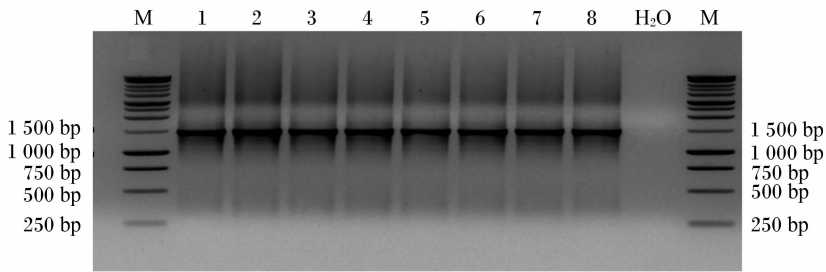
图 1 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪粪指数的影响

Fig. 1 Effects of Lfcin B and Cec P1 on feces score of weaned piglets

表 4 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪粪便干物质含量的影响

Table 4 Effects of Lfcin B and Cec P1 on the content of dry matter of feces in weaned piglets

日龄 Days of age/d	对照组 Control group	ETEC 组 ETEC group	Lfcin B 组 Lfcin B group	Cec P1 组 Cec P1 group
28	36.57 ± 1.30	36.17 ± 1.76	36.03 ± 1.49	35.45 ± 1.28
29	35.06 ± 0.90 ^a	12.81 ± 0.81 ^b	13.17 ± 0.81 ^b	13.01 ± 0.77 ^b
31	36.26 ± 0.43 ^a	17.37 ± 0.88 ^b	19.55 ± 0.91 ^b	20.39 ± 0.94 ^{ab}
39	35.95 ± 0.55	22.58 ± 0.51	33.95 ± 0.66	34.81 ± 0.54



M:1 kb DNA ladder;1~8:新鲜粪样 DNA DNA from fresh feces;H₂O:阴性对照 negative control。

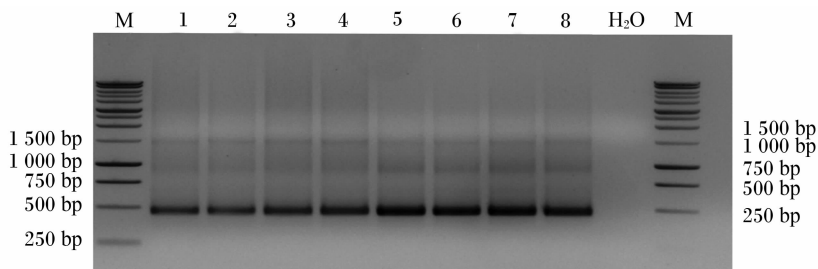
图2 PCR-16S rRNA 扩增产物

Fig.2 PCR product of PCR-16S rRNA

2.3.2 PCR-DGGE 扩增结果

以 PCR-16S rRNA 扩增产物为模板,进行

PCR-DGGE 扩增,将扩增的 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶检测,扩增产物长度为 433 bp(图 3)。



M:1 kb DNA ladder;1~8:PCR-16S rRNA 扩增产物 PCR product from PCR-16S rRNA;H₂O:阴性对照 negative control。

图3 PCR-DGGE 扩增产物

Fig.3 PCR product of PCR-DGGE

2.4 Lfcin B 和 Cec P1 对断奶仔猪肠道微生物区系多样性的影响

2.4.1 DGGE 电泳结果代表图

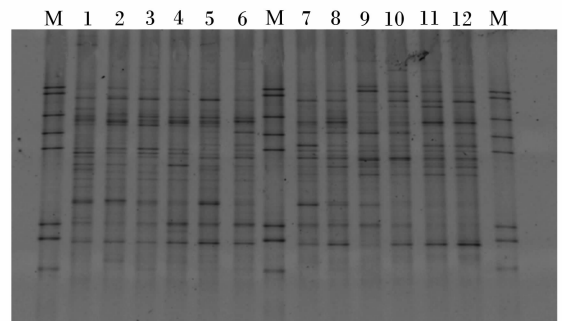
图 4 是以 PCR-16S rRNA 扩增产物为模板,进行 PCR-DGGE 扩增,将扩增的 PCR 产物经 55% PAGE、1×TAE、60℃ 16 h 电泳的结果。

2.4.2 微生物区系多样性统计分析结果

肠道微生物区系的多样性,用以下几种多样性进行描述:N2 diversity^[23-24]:有效物种出现率;N1 richness:物种丰度(计算公式为 $M1 = e^H$, H 为 Shannon's diversity);N2/N1:特定样品的平均组成;Number of species:样品的丰度;Shannon's diversity:大量单个物种的相对比例(计算公式为 $H = -\sum p_j \log(p_j)$, $p_j = Y_j / \text{SUM}$ 。SUM 为一个样品的物种值的总和, Y_j 为样品中第 j 个物种的数量)。

微生物区系多样性统计结果见图 5、图 6、图 7、图 8。由图可知,各组仔猪肠道微生物区系差异

不显著($P > 0.05$)。不同日龄聚类分析结果见图 9,表明日龄对肠道微生物区系的多样性起着相对的决定作用。



M:通用细菌标准 universal bacteria marker;1、5、9:对照组 control group;2、6、10:ETEC 组 ETEC group;3、7、11: Lfcin B 组 Lfcin B group;4、8、12:Cec P1 组 Cec P1 group。

图4 全组样 DGGE 结果代表图

Fig.4 Representative images of denaturing gradient gel electrophoresis of real pool samples

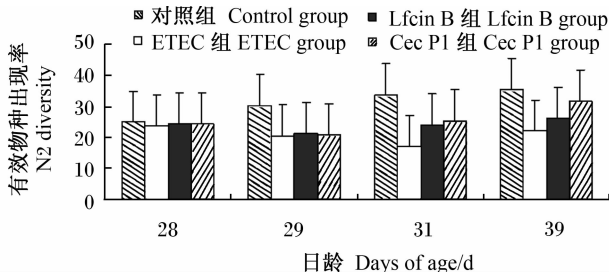


图 5 样品中有效物种出现率

Fig. 5 N2 diversity (effective species occurrences) of samples

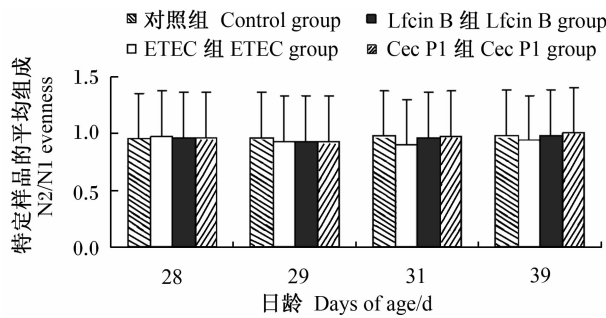


图 6 样品中特定样品的平均组成

Fig. 6 N2/N1 evenness (compositional evenness of particular sample) of samples

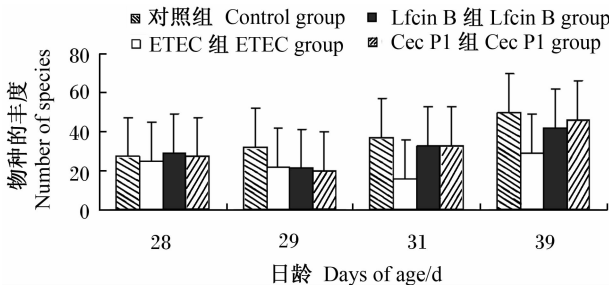


图 7 样品中物种的丰度

Fig. 7 Number of species (sample richness) of samples

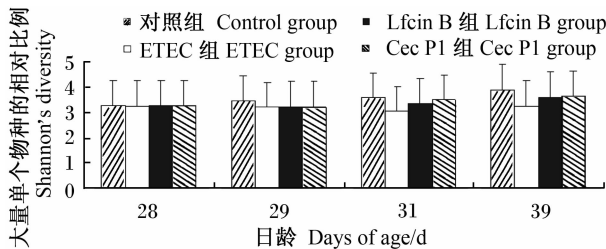
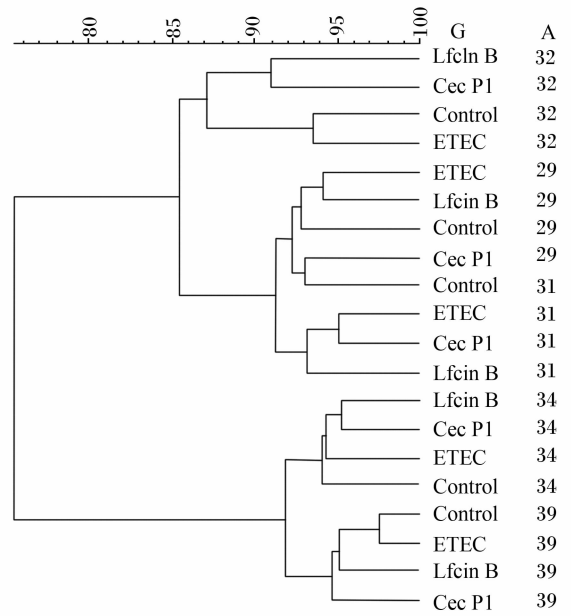


图 8 样品中大量单个物种的相对比例

Fig. 8 Shannon's diversity (relative proportions of abundances of individual species) of samples

Pearson correlation (Opt 0.50%) [0.0%~100.0%]
universal



G: 组 group; A: 日龄 days of age (d); Control 对照。

图 9 样品聚类分析图

Fig. 9 Cluster analysis of samples

3 讨论

Lfcin B 来源于乳铁蛋白 (Lfcin) 的酶解, 而 Lfcin 存在于人及大多数哺乳动物的乳汁中, 也存在于唾液、泪液、胰液以及其他的身体分泌物中。Cec P1 是第 1 个从猪肠分离的抗菌肽, 后经研究者证实, Cec P1 来源于猪肠道的寄生线虫 (*Ascaris suum*)^[25]。因此, 外源性添加 Cec P1 应该比 Lfcin B 对猪肠道微生物的影响要大。体外试验结果也表明, Lfcin B 对来源于猪的 ETEC 的最小抑制浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 是 $8 \mu\text{g/mL}$, 而 Cec P1 的 MIC 是 $6 \mu\text{g/mL}$ 。

仔猪在断奶初期 3 ~ 5 d, 会出现腹泻、食欲下降、生长停滞等断奶综合征, 需要采取必要的措施缓解这种断奶应激, 使断奶仔猪早日进入生长肥育角色, 提高养猪生产效率。Wang 等^[26-27]研究表明, 当乳铁蛋白与抗生素结合使用时, 可以显著提高断奶仔猪的生长性能, 降低腹泻率, 增加绒毛高度, 降低隐窝深度。从本试验结果可以看出, Cec P1 对投喂大肠杆菌的断奶仔猪早期生长性能的影响优于 Lfcin B, 添加 Cec P1 更有利于仔猪从病理状态恢复到正常生长状态。本试验的目的之

一就是研究抗菌肽是否可以有效地降低仔猪断奶腹泻,从而缓解断奶应激。从对断奶仔猪腹泻率、粪指数和粪便干物质含量的比较分析来看,添加抗菌肽 Cec P1 有降低仔猪腹泻的趋势,且 Lfcin B 组与对照组保持相同的腹泻率(23%)。在后期恢复阶段,Cec P1 表现出更强的优势。由此可见 Cec P1 更有利于帮助断奶仔猪度过早期断奶综合征阶段。而本试验中,除了对断奶仔猪投喂 ETEC 外,并没有结合抗生素使用,所以无法比较单独使用 Lfcin B、Cec P1 与 Lfcin B 和抗生素及 Cec P1 和抗生素结合使用的效果。

有研究报道,乳铁蛋白可以保护新生小鼠免受与肠道有关的系统性感染^[28]。本试验中,虽然对照组、ETEC 组、Lfcin B 组和 Cec P1 组投喂了大肠杆菌的断奶仔猪肠道微生物区系的多样性差异不显著,但从整个试验期微生物区系多样性的变化趋势来看,Lfcin B 和 Cec P1 有利于保护投喂了大肠杆菌的仔猪肠道内的有益微生物,维持相对正常的微生物区系,且 Cec P1 有优于 Lfcin B 的趋势。

在整个试验过程中,对照组仔猪保持相对高的平均日增重、粪指数、粪便干物质含量和相对丰富的微生物多样性,而 Cec P1 次之,且有较低的腹泻率,这点表明,Cec P1 具有较强的抗菌性能,有助于仔猪生长发育。

4 结 论

① 对照组、ETEC 组、Lfcin B 组和 Cec P1 组仔猪的生长及肠道微生物区系差异不显著,但在某种程度上,抗菌肽能够改善断奶仔猪的生长性能,控制腹泻率,提高粪便干物质及粪指数,缓解断奶应激。

② Cec P1 来源于猪肠道微生物寄生线虫,比 Lfcin B 更能适应肠道环境,更有利于仔猪健康。

参考文献:

- [1] 温刘发,何丹林,张常明,等. 抗菌肽酵母制剂的生产及其作饲料添加剂应用价值的探讨[J]. 广东蚕业,2001,35(2):34-36.
- [2] 温刘发,何丹林,张常明,等. 抗菌肽酵母制剂作为饲料添加剂的应用前景[J]. 中国饲料,2001(23):22-23.
- [3] BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1992, 1121: 130-136.
- [4] 冯兴军,王建华,杨雅麟,等. 乳铁蛋白(Lactoferrin)作用机制研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2004,1:23-26.
- [5] JONES E M, SMART A, BLOOMBERG G, et al. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77: 206-214.
- [6] VMAR DAHET M. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 64: 277-282.
- [7] JONES E M, SMART A, BLOOMBERG G, et al. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77: 206-214.
- [8] VLADIMIR S, KELLIE S, GREGOR R. Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora[J]. Microbes and Infection, 2000, 2:773-777. S1286457900003592/FLA.
- [9] 丁兆忠,苗向阳,孙世铎,等. 抗菌肽 Cecropin P1 基因真核表达载体的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006,6:12-14.
- [10] 王爱苹,汪以真,陈正贤. 猪抗菌肽 cecropin-P1 单克隆抗体的制备[J]. 上海畜牧兽医通讯,2008,4:36-38.
- [11] ELLISON R T, GIEHL T J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1991, 88:1080-1091.
- [12] PIERCE A D, COLAVIZZA M, BENAÏSS A, et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin[J]. European Journal of Biochemistry, 1991, 196:177-184.
- [13] DIONYSIUS D A, GRIEVE P A, MILNE J M. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76:2597-2606.
- [14] BOMAN H G, AGERBERTH B, BOMAN A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine[J]. Infection and Immunity, 1993, 61(7):2978-2984.
- [15] DIONYSIUS D A, MILNE J M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80:

- 667-674.
- [16] ELIASSEN L T, BERGE G, SVEINBJORNSSON B, et al. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin[J]. *Anticancer Research*, 2002, 22(5):2703-2710.
- [17] 李铁晶,黄占权,许岩. 抗菌肽 Lactoferricin 基因的 PCR 合成及克隆载体 T-Lfn 的构建[J]. *东北农业大学学报*,2008,39(1):107-111.
- [18] NÜBEL U, ENGELEN B, FELSKA A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178:5636-5643.
- [19] FELSKA A, AKKERMANS A D, DE VOS W M. Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:4581-4587.
- [20] KONSTANTINOV S R, AWATI A, SMIDT H, et al. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in guts of weaning piglets[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:3821-3830.
- [21] JANCZYK P, PIEPER R, SMIDT H, et al. Changes in the diversity of pig ilea *Lactobacilli* around weaning determined by means of 16S rRNA-gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(1):132-140. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00317.
- [22] ŠMILAUER P. *Canoco reference manual and CanoDraw for Windows user's guide biometrics* [M]. Netherland: Wageningen and České Budějovice, 2002.
- [23] MAGURRAN A E. *Measuring biological diversity* [M]. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd., 2004.
- [24] STATISTICA 6.0. StatSoft[CP/DK]. Tulsa, USA, 2005.
- [25] AJITHA P, SATOSHI U, HONG Z, et al. Cecropin PI and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*[J]. *Biochemistry Journal*, 2005, 390:207-214. (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/BJ20050218.
- [26] WANG Y Z, SHAN T Z, XU Z R, et al. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84:2636-2641. doi: 10.2527/jas.2005-544.
- [27] WANG Y Z, SHAN T Z, XU Z R, et al. Effects of the lactoferrin (LF) on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135:263-272. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.07.013.
- [28] LYNN E, HIPOLITO R B, HWANG F Y, et al. Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology, Metabolism and Gastrointestinal Physiology*, 2001, 281:G1140-G1150.

Effects of Lactoferricin B and Cecropin P1 on Growth and Gut Microflora in Weaned Piglets Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli*

HOU Zhenping¹ YIN Yulong² WANG Wenjie¹ LIU Jingxi¹ SOUFFRANT W B³

(1. Tianjin Institute of Husbandry and Veterinary Science, Tianjin 300112, China; 2. Institute of Subtropical and Agriculture, The Chinese Academy Sciences, Changsha 410125, China; 3. Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf D-18196, Germany)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of lactoferricin B (Lfcin B) and cecropin P1 (Cec P1) on growth and gut microflora in weaned piglets after orally challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Forty-eight 28-day-old German Landrace × German Landrace weaned piglets with average body weight of (7.18 ± 1.32) kg were randomly assigned to four dietary treatments (the control, ETEC, LfcinB, Cec P1) with two replicates per treatment and six pigs per replicate. The feeding trial lasted for 12 days. The results showed as follows: 1) there were no significant differences in body weight and average daily gain among control, ETEC, Lfcin B and Cec P1 group ($P > 0.05$). 2) The incidence of diarrhea in ETEC group was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference among control, Lfcin B and Cec P1 group ($P > 0.05$). After challenged with ETEC firstly, the content of dry matter in feces of 29-day-old weaned piglets in ETEC, Lfcin B and Cec P1 group was significantly decreased ($P < 0.05$), and after challenged with ETEC secondly, the content of dry matter in feces of 31-day-old weaned piglets in ETEC and Lfcin B group was still significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the control group and Cec P1 group. 3) There was no significant difference in gut microflora among all groups ($P > 0.05$). In conclusion, there are no significant differences in the growth and gut microflora of weaned piglets among the control, ETEC, Lfcin B and Cec P1 group, however, because Cec P1 is separated from nematode *Ascaris suum* of gut microbe in pigs, it lives more easily in the gut than Lfcin B, and it is more favourable to the health of piglets. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(9):1536-1544]

Key words: Lfcin B; Cec P1; ETEC; weaned piglet; gut; microflora