

丁酸梭菌对蛋用仔公鸡生长性能、免疫指标及空肠组织相关细胞因子基因 mRNA 表达的影响

刘婷婷¹ 滑 静² 王晓霞^{3*} 刘莉如⁴ 海 鹏⁵

(1. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京农学院生物技术学院, 北京 102206;

3. 北京市昌平区区委, 北京 102200; 4. 新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052;

5. 辽宁阜新市动物卫生监督所, 阜新 123000)

摘 要: 本试验旨在探讨饲料中添加丁酸梭菌对蛋用仔公鸡生长性能、免疫指标及空肠组织相关细胞因子基因 mRNA 表达的影响。选择 240 只 1 日龄健康海兰褐蛋用仔公鸡, 随机分为 6 组, 每组 4 个重复, 每个重复 10 只鸡, 各组分别在基础饲料中添加 0 (对照组)、150 mg/kg 金霉素 (抗生素组) 和 250、500、750、1 000 mg/kg 丁酸梭菌, 试验期为 42 d, 分别在 14、28、42 日龄测定各组的生长性能, 42 日龄测定免疫器官指数、血清免疫指标及空肠组织相关细胞因子基因 mRNA 相对表达水平。结果表明: 1) 与对照组相比, 1 000 mg/kg 添加组在试验期内显著提高了蛋用仔公鸡平均体重和平均日增重 ($P < 0.05$), 添加各水平丁酸梭菌对全期平均日采食量和料重比的影响均不显著 ($P > 0.05$)。2) 1 000 mg/kg 添加组的脾脏指数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 各组之间胸腺指数和法氏囊指数均差异不显著 ($P > 0.05$)。3) 各丁酸梭菌添加组血清免疫球蛋白 G (IgG) 的含量与对照组相比均显著提高 ($P < 0.05$), 其中 750 mg/kg 添加组、1 000 mg/kg 添加组血清 IgG 的含量与抗生素组相比也显著提高 ($P < 0.05$); 1 000 mg/kg 添加组血清免疫球蛋白 A 的含量最高, 显著高于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$); 各丁酸梭菌添加组血清补体 3 的含量与对照组相比均显著提高 ($P < 0.05$)。4) 750 mg/kg 添加组、1 000 mg/kg 添加组的空肠组织白细胞介素-6 基因 mRNA 相对表达水平与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 1 000 mg/kg 添加组肿瘤坏死因子- α 基因 mRNA 相对表达水平最低, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果提示, 饲料中添加适量的丁酸梭菌可在一定程度上提高蛋用仔公鸡的生长性能, 促进免疫器官发育并提高免疫力, 抑制炎症的发生。本试验条件下, 1 000 mg/kg 的添加量效果最好。

关键词: 丁酸梭菌; 生长性能; 免疫指标; 细胞因子; mRNA 相对表达水平

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2012)07-1302-09

随着抗生素作为饲料添加剂的广泛应用, 它的弊端也逐渐被人们所认识, 如导致动物胃肠道正常菌群失调, 产生耐药性和药物残留等副作用, 给畜禽和人类的健康都带来了危害, 有些国家已从立法上限制了抗生素的使用。因此, 寻求绿色、无公害并能够提高畜禽营养素利用率和免疫功能

的添加剂越来越受到人们的关注。研究发现, 微生物制剂能够提高饲料报酬、促进动物生长、降低幼畜禽死亡率、防治消化道疾病等^[1]。丁酸梭菌是普遍存在于人和动物肠道内的一种益生菌, 丁酸梭菌代谢可以产生丁酸, 从而抑制肠道有害菌生长和繁殖, 同时刺激黏膜免疫; 还可以产生 B 族

收稿日期: 2012-02-06

基金项目: “北京家禽产业技术体系创新团队”资助项目

作者简介: 刘婷婷(1986—), 女, 辽宁营口人, 硕士研究生, 研究方向为家禽营养与免疫。E-mail: liutingting1119@126.com

* 通讯作者: 王晓霞, 教授, 硕士生导师, E-mail: wxx@mail.cnu.edu.cn

维生素、维生素 K、叶酸和多种酶类物质等,对机体有重要的生理功能。目前,对该菌的研究主要集中在人的腹泻、炎症性肠病的防治与预防上,然而,在动物,尤其在蛋用仔公鸡生产上应用的研究鲜有报道。本试验旨在通过在蛋用仔公鸡基础饲料中添加丁酸梭菌,测定蛋用仔公鸡的生长性能、免疫器官指数和血清免疫指标等,来探讨该菌对生长和免疫的影响,并从分子水平探讨丁酸梭菌对机体细胞因子的影响机理,为其在家禽生产中的应用提供科学理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

丁酸梭菌由浙江惠嘉生物科技有限公司提供,其中活菌数 $\geq 1.0 \times 10^8$ CFU/g。

1.2 试验设计与饲料组成

试验采用单因子完全随机区组设计,选用 1 日龄健康的海兰褐蛋用仔公鸡 240 只,平均体重为 (39.36 ± 0.11) g,随机分为 6 组,每组 4 个重复,每个重复 10 只鸡。对照组饲喂基础饲料,抗生素组饲喂在基础饲料中添加 150 mg/kg 金霉素的饲料,试验组饲喂分别在基础饲料中添加 250、500、750、1 000 mg/kg 丁酸梭菌的饲料。基础饲料是根据美国 NRC(1994)推荐的肉仔鸡需要配制的玉米-豆粕型饲料,其组成及营养水平见表 1。

1.3 饲养管理

试验鸡采用 3 层笼养,自由采食和饮水,光照、温度和湿度严格按照常规饲养管理要求进行,按照常规免疫程序进行免疫,并定期清扫鸡舍和消毒保持鸡舍清洁卫生。试验期为 42 d。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 生长性能指标

试验鸡空腹 12 h,以重复为单位分别在试验的第 14、28 和 42 天称重结料,并记录死亡鸡只数,及时结料用于计算平均体重(average body weight, ABW)、平均日采食量(average daily feed intake, ADFI)、平均日增重(average daily gain, ADG)和料重比(feed/gain ratio, F/G)。

1.4.2 免疫器官指数

于试验的第 42 天对试验鸡无菌采样,每个重复随机取 1 只鸡称重后屠宰,屠宰时采血,制备血

清,样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。摘取胸腺、脾脏和法氏囊,剔除脂肪后称鲜重。用所得的免疫器官重与体重的比计算免疫器官指数[公式:免疫器官指数(g/kg) = 免疫器官重(g)/体重(kg)]。

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	62.85
豆粕 Soybean meal	31.50
大豆油 Soybean oil	1.30
石粉 Limestone	1.50
磷酸氢钙 CaHPO_4	1.50
食盐 NaCl	0.35
蛋氨酸 Methionine	0.08
预混料 Premix	0.92
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.12
粗蛋白质 CP	19.00
钙 Ca	0.95
有效磷 AP	0.41
赖氨酸 Lysine	0.92
蛋氨酸 Methionine	0.39

预混料为每千克饲料提供 The premix provides the following per kg of diet: VA 8 000 IU, VD₃ 1 000 IU, VE 10 IU, VK 0.5 mg, VB₁₂ 0.01 mg, 叶酸 folic acid 0.55 mg, 烟酸 nicotinic acid 30 mg, 泛酸 pantothenic acid 10 mg, 生物素 biotin 0.15 mg, Cu 8 mg, Fe 80 mg, Mn 60 mg, Zn 50 mg, I 0.35 mg, Se 0.2 mg。

1.4.3 血清免疫指标

血清中的免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 A(IgA)和免疫球蛋白 M(IgM)含量采用免疫透射比浊法进行测定,补体 3(C3)、补体 4(C4)含量采用 ELISA 试剂盒检测,溶菌酶活性测定采用比色法,所用试剂盒均购于北京康源瑞得生物技术有限公司。

1.4.4 空肠组织中相关细胞因子的基因 mRNA 相对表达水平

1.4.4.1 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的鸡基因序列设计引物如表 2,引物由北京优博奥生物技术有限公司合成。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for fluorescence-based quantitative real-time PCR

基因 Genes	GenBank 登陆号 GenBank accession numbers	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物 Products/bp
白细胞介素-6 <i>IL-6</i>	NM_204628.1	F:CCCAAGGTGACGGAGGAGGACGGCT R:TCCAGGTAGGTCTGAAAGGCGAACA	104
干扰素- γ <i>IFN-γ</i>	NM_205149.1	F:GACAAGTCAAAGCCGCACAT R:CAAGTCGTTTCATCGGGAGC	126
肿瘤坏死因子- α <i>TNF-α</i>	AY765397.1	F:TACTCAGGACAGCCTATGCCAACAA R:GGAAGGGCAACTCATCTGAACTGG	111
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	L08165	F:AACACCCACACCCCTGTGAT R:TGAGTCAAGCGCCAAAAGAA	100

1.4.4.2 组织样本总 RNA 的提取和反转录

用超纯 RNA 提取试剂盒 (CWbio. Co., Ltd., Cat#CW0581) 提取组织样本中总 RNA。操作按照产品说明书进行。对所提取的 RNA 进行检测,判断有无污染。cDNA 合成按 HiFi-MMLV cDNA 第 1 链合成试剂盒 (CWbio. Co., Ltd., Cat # CW0744) 说明书操作。

1.4.4.3 实时荧光定量 PCR 扩增条件

采用 20 μ L 反应体系: Real SYBR Mixture (2 \times) 10 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 加入去离子水至 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s) \times 40 个循环。

1.4.4.4 标准曲线绘制

本试验以逆转录的 cDNA 作为待测基因的标准品, 制作各自的标准曲线。具体方法如下: 取逆转录的 cDNA 样本, 进行 5 倍梯度稀释, 每个稀释度设 3 组重复, 进行实时荧光定量检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析待测空肠组织中相关细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的基因 mRNA 相对表达水平。

1.5 数据统计和处理

所有试验数据均用 Excel 进行初步处理, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 用 one-way ANOVA 比较各组间相关指标的差异, 采用最小显著级差法对差异显著的数据进行多重比较。试验数据均以平均值 \pm 标准误表示。

2 结果

2.1 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡生长性能的影响

由表 3 可知, 蛋用仔公鸡在 14 日龄时

500 mg/kg 添加组、750 mg/kg 添加组、1 000 mg/kg 添加组的平均体重显著高于对照组 ($P < 0.05$), 750 mg/kg 添加组为最大值, 但与其他试验组间差异不显著 ($P > 0.05$), 各试验组与抗生素组相比也差异不显著 ($P > 0.05$)。28 日龄时, 1 000 mg/kg 添加组的平均体重显著高于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$), 42 日龄时, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

试验期间, 平均日增重最高的是 1 000 mg/kg 添加组, 比对照组高出 10.26% ($P < 0.05$), 其他各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

各组的平均日采食量、料重比均差异不显著 ($P > 0.05$), 但各试验组平均日采食量随着饲料中丁酸梭菌添加量的增加有增加的趋势, 料重比则有下降的趋势。

2.2 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡免疫器官指数的影响

所有屠宰的蛋用仔公鸡免疫器官外观均未见异常。由表 4 可知, 42 日龄时, 各试验组胸腺指数均在一定程度上高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 各试验组之间也差异不显著 ($P > 0.05$), 但胸腺指数随着饲料中丁酸梭菌添加量的增加而呈现出递增趋势。

1 000 mg/kg 添加组的脾脏指数最高, 比对照组提高了 24.87% ($P < 0.05$), 比抗生素组提高了 10.55% ($P > 0.05$), 其他各试验组也比对照组略有升高, 但与对照组和抗生素组均差异不显著 ($P > 0.05$)。

各组之间的法氏囊指数均差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡生长性能的影响

Table 3 Effects of dietary *Clostridium butyricum* level on growth performance of egg-laying male chicks

项目 Items	日龄 Days of age/d	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	丁酸梭菌组 <i>Clostridium butyricum</i> group			
				250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg	1 000 mg/kg
平均体重 ABW/g	14	98.00 ±2.16 ^a	103.50 ±0.50 ^b	102.50 ±1.50 ^{ab}	104.50 ±1.89 ^b	105.50 ±2.06 ^b	104.50 ±1.26 ^b
	28	255.28 ±5.56 ^a	264.00 ±3.12 ^a	261.33 ±3.02 ^a	266.56 ±3.28 ^{ab}	266.61 ±3.30 ^{ab}	277.23 ±2.90 ^b
平均日增重 ADG/g	42	469.83 ±11.45 ^a	482.62 ±10.03 ^{ab}	493.40 ±8.47 ^{ab}	496.60 ±11.09 ^{ab}	499.64 ±3.82 ^{ab}	513.30 ±9.46 ^b
	1~42	10.23 ±0.27 ^a	10.82 ±0.21 ^{ab}	10.56 ±0.24 ^{ab}	10.87 ±0.26 ^{ab}	10.96 ±0.09 ^{ab}	11.28 ±0.23 ^b
平均日采食量 ADFI/g	1~42	26.47 ±0.48	27.39 ±2.73	26.01 ±0.45	26.95 ±0.64	26.64 ±0.67	27.13 ±0.25
	1~42	2.59 ±0.31	2.53 ±0.05	2.46 ±0.06	2.47 ±0.05	2.43 ±0.08	2.40 ±0.03

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same small letter or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

表 4 饲料中丁酸梭菌水平对 42 日龄蛋用仔公鸡胸腺、脾脏、法氏囊指数的影响

Table 4 Effects of dietary *Clostridium butyricum* level on the indices of thymus, spleen and bursa of Fabricius of egg-laying male chicks aged 42 days

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	丁酸梭菌组 <i>Clostridium butyricum</i> group			
			250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg	1 000 mg/kg
胸腺指数 Thymus index	5.48 ± 0.77	7.57 ± 0.88	5.79 ± 0.96	6.34 ± 0.59	6.70 ± 0.51	7.80 ± 0.74
脾脏指数 Spleen index	1.93 ± 0.02 ^a	2.18 ± 0.12 ^{ab}	2.00 ± 0.28 ^{ab}	2.14 ± 0.13 ^{ab}	2.30 ± 0.07 ^{ab}	2.41 ± 0.09 ^b
法氏囊指数 Bursa of Fabricius index	2.00 ± 0.22	2.29 ± 0.55	2.16 ± 0.36	2.20 ± 0.56	2.74 ± 0.66	2.67 ± 0.75

2.3 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡血清免疫指标的影响

由表 5 可知,随着饲料中丁酸梭菌添加量的增加,检测的蛋用仔公鸡各项血清免疫指标均有增加的趋势。1 000 mg/kg 添加组对试验期各免疫指标的影响最大。

42 日龄时,各添加组血清 IgG 的含量与对照组相比均显著提高 ($P < 0.05$), 750 mg/kg 添加组、1 000 mg/kg 添加组血清 IgG 的含量与抗生素组相比均有提高,差异显著 ($P < 0.05$), 试验组中血清 IgG 含量最高的是 1 000 mg/kg 添加组,与 250 mg/kg 添加组、500 mg/kg 添加组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

1 000 mg/kg 添加组血清 IgA 的含量最高,显著高于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$), 与 250 mg/kg 添加组、500 mg/kg 添加组相比也均差异显著 ($P < 0.05$), 但与 750 mg/kg 添加组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

各试验组血清 IgM 含量与对照组和抗生素组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

血清 C3 含量的检测结果显示,各试验组血清 C3 含量与对照组相比显著提高 ($P < 0.05$), 除 250 mg/kg 添加组外,其余各试验组血清 C3 含量与抗生素组相比也显著提高 ($P < 0.05$), 其中 1 000 mg/kg 添加组血清 C3 含量最高,比对照组提高 62.82%, 比抗生素组提高 51.18%, 各试验

组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

血清 C4 的含量随着丁酸梭菌添加量的增加有增加趋势,但组间差异不显著 ($P > 0.05$),与对

照组相比也均差异不显著 ($P > 0.05$)。

各试验组血清溶菌酶活性与对照组相比均略有提高,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 5 饲料中丁酸梭菌水平对 42 日龄蛋用仔公鸡血清 IgG、IgA、IgM、C3、C4 含量和溶菌酶活性的影响

Table 5 Effects of dietary *Clostridium butyricum* level on the contents of IgG, IgA, IgM, C3 and C4 and the activity of lysozyme in serum of egg-laying male chicks aged 42 days

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	丁酸梭菌组 <i>Clostridium butyricum</i> group			
			250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg	1 000 mg/kg
免疫球蛋白 G IgG/($\mu\text{g/mL}$)	102.44 \pm 6.83 ^a	118.15 \pm 5.19 ^{ab}	120.31 \pm 6.26 ^{bc}	124.59 \pm 2.28 ^{bc}	135.87 \pm 6.37 ^{cd}	150.94 \pm 8.26 ^d
免疫球蛋白 A IgA/($\mu\text{g/mL}$)	51.52 \pm 0.41 ^a	57.08 \pm 3.43 ^{ab}	60.60 \pm 2.98 ^{ab}	61.10 \pm 1.88 ^b	64.91 \pm 2.90 ^{bc}	73.39 \pm 3.58 ^c
免疫球蛋白 M IgM/($\mu\text{g/mL}$)	91.25 \pm 0.85	91.50 \pm 0.29	92.00 \pm 0.00	92.25 \pm 0.48	92.25 \pm 0.85	92.50 \pm 0.29
补体 3 C3/($\mu\text{g/mL}$)	92.14 \pm 4.77 ^a	99.23 \pm 2.96 ^{ab}	137.60 \pm 5.34 ^{bc}	144.19 \pm 4.20 ^c	141.82 \pm 3.69 ^c	150.02 \pm 6.37 ^c
补体 4 C4/($\mu\text{g/mL}$)	58.11 \pm 2.28	60.37 \pm 3.53	59.26 \pm 3.29	59.83 \pm 2.51	60.48 \pm 2.36	61.62 \pm 1.72
溶菌酶 Lysozyme/(U/mL)	75.15 \pm 2.56	80.00 \pm 3.72	80.00 \pm 2.89	81.82 \pm 4.08	98.18 \pm 2.53	92.73 \pm 2.91

2.4 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡空肠组织中 IL-6、IFN- γ 及 TNF- α mRNA 相对表达水平的影响

由表 6 可知,关于 42 日龄时蛋用仔公鸡空肠组织中 IL-6 mRNA 相对表达水平,750 mg/kg 添加组、1 000 mg/kg 添加组与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$),与抗生素组均差异不显著 ($P > 0.05$),250 mg/kg 添加组、500 mg/kg 添加组与对照组和抗生素组均差异不显著 ($P > 0.05$),各试验组之间差异也不显著 ($P > 0.05$)。

关于 IFN- γ mRNA 相对表达水平,各试验组

与对照组和抗生素组相比均差异不显著 ($P > 0.05$),各试验组之间也差异不显著 ($P > 0.05$),但随着饲料中丁酸梭菌添加量的增加,蛋用仔公鸡空肠组织中 IFN- γ mRNA 相对表达水平呈现下降的趋势。

关于 TNF- α mRNA 相对表达水平,1 000 mg/kg 添加组最低,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),比对照组降低了 45.91%,与抗生素组差异不显著 ($P > 0.05$),其余各试验组与对照组和抗生素组均差异不显著 ($P > 0.05$),各试验组之间也差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 6 饲料中丁酸梭菌水平对 42 日龄蛋用仔公鸡空肠组织中 IL-6、IFN- γ 及 TNF- α mRNA 相对表达水平的影响

Table 6 Effects of dietary *Clostridium butyricum* level on IL-6, IFN- γ and TNF- α mRNA relative expression levels in jejunum tissue of egg-laying male chicks aged 42 days

基因 Genes	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	丁酸梭菌组 <i>Clostridium butyricum</i> group			
			250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg	1 000 mg/kg
白细胞介素-6 IL-6	1.089 \pm 0.120 ^a	0.740 \pm 0.196 ^{ab}	0.837 \pm 0.130 ^{ab}	0.696 \pm 0.232 ^{ab}	0.629 \pm 0.121 ^b	0.583 \pm 0.468 ^b
干扰素- γ IFN- γ	0.820 \pm 0.144	0.548 \pm 0.078	0.736 \pm 0.256	0.515 \pm 0.209	0.432 \pm 0.129	0.421 \pm 0.010
肿瘤坏死因子- α TNF- α	0.954 \pm 0.041 ^a	0.829 \pm 0.167 ^{ab}	0.803 \pm 0.106 ^{ab}	0.812 \pm 0.121 ^{ab}	0.701 \pm 0.195 ^{ab}	0.516 \pm 0.042 ^b

3 讨论

3.1 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡生长性能的影响

畜禽平均日增重和料重比是反映丁酸梭菌饲喂效果的重要指标。丁酸梭菌的促生长作用已经被很多试验证实。杜云平等^[2]研究表明,基础饲料中添加0.3%的丁酸梭菌制剂能够改善肉鸡的生产性能,有提高日增重、降低料重比的趋势,还有效预防了肠炎的发生,提高了肉鸡的抗病力和免疫力。杨欣^[3]在不同油脂类型饲料中添加丁酸梭菌饲喂肉仔鸡,显著降低了肉仔鸡盲肠食糜pH,显著增加了盲肠乳酸杆菌数,同时还显著增加了盲肠中丁酸、乙酸、戊酸及总短链脂肪酸含量和空肠黏膜碱性磷酸酶活性,这表明丁酸梭菌可以提高肠道食糜中主要代谢产物丁酸的含量,降低pH,进而抑制大肠杆菌等有害菌生长,促进乳酸菌等有益菌的繁殖,并进一步增加其他短链脂肪酸的含量,从而改善肠道环境,起到促生长的作用。Araki等^[4-6]报道,丁酸梭菌在肠道内能产生丁酸、B族维生素、维生素K、叶酸等物质,对机体具有保健作用,还能产生淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等,这些酶系有重要的生理功能,这可能也是丁酸梭菌改善动物生长性能的机理之一。本试验结果表明,丁酸梭菌添加水平为1 000 mg/kg时,平均日增重最高,料重比最小,说明适宜的丁酸梭菌添加水平对蛋用仔公鸡的生长性能有一定的促进作用。但蛋用仔公鸡42日龄时体重总体上偏低,推测可能在试验后期饲养环境温度较高,超过了生长适宜温度范围,仔公鸡采食量下降,导致42日龄时平均体重偏低。

3.2 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡免疫器官指数的影响

胸腺、脾脏和法氏囊是禽类的重要免疫器官。胸腺和法氏囊是鸡的中枢免疫器官,胸腺参与机体非特异性免疫,对细胞免疫以及体液免疫都有重要的调节作用。法氏囊是禽类特有的,是B细胞分化成熟的场所。脾脏是禽类最大的外周免疫器官,是机体细胞免疫和体液免疫的中心,是产生致敏淋巴细胞和抗体的重要场所。上述3个器官的发育状态和机能强弱直接影响家禽全身的免疫水平。一般认为免疫器官质量增加是由于其自身细胞生长发育和分裂增殖所致,是免疫增强的表

现,免疫指数的提高表明该器官成熟快。本试验的结果表明,42日龄时,蛋用仔公鸡的胸腺指数和法氏囊指数与对照组均差异不显著,但随着饲料中丁酸梭菌添加量的增加均有升高的趋势,1 000 mg/kg丁酸梭菌添加组的脾脏指数,虽与抗生素组相比差异不显著,但显著高于对照组,这表明丁酸梭菌对蛋用仔公鸡生长发育前期的免疫器官发育有积极作用,能够促进仔公鸡免疫系统发育,增强机体对外界刺激的抵抗能力,达到健康生长的目的。

3.3 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡血清免疫指标的影响

免疫是机体识别和排除抗原性异物、保持体内平衡的生理反应。动物机体的免疫功能主要是通过免疫分子(免疫球蛋白、细胞因子和补体)来发挥作用,提高抗体免疫应答能力。免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM等)是主要的免疫分子。IgG是单体免疫球蛋白,其血清含量远高于其他免疫球蛋白,且维持时间长,是机体抗感染的主要力量。IgM产生时间最早,其调理、杀菌和凝集作用均强于IgG,但半衰期短,作用范围窄,在感染早期起先锋免疫作用。IgA是外分泌液中的主要免疫球蛋白,在保护肠道、呼吸道等抵抗微生物入侵方面起关键作用,能凝集颗粒性抗原和中和病毒。C3、C4是补体系统中含量最多、最重要的组成部分,对免疫功能起着重要的作用,它们在机体防御过程中可以通过调理吞噬、裂解细胞、清除免疫复合物等机理对病原微生物进行清除及活化炎性细胞对靶细胞的杀伤作用。溶菌酶主要由巨噬细胞分泌,是非特异性免疫的效应物,通过降解细菌多糖细胞壁杀灭细菌,保护机体免受感染^[7]。

张彩云等^[8]选用160头21日龄杜×长×大断奶仔猪作研究,结果表明,与对照组相比,饲料中添加丁酸梭菌组血清中IgG和C3含量显著提高,还具有提高血清IgA含量的趋势。宋增福^[9]的研究表明了丁酸梭菌对鲢鱼消化酶、体液免疫等方面的影响,该菌可以提高鲢鱼肠道消化酶、血清和体表黏液溶菌酶等的活性,增加血浆中的IgM含量。上述报道与本研究相一致,本试验的结果表明,丁酸梭菌可以提高血清中IgG、IgA、C3的含量,1 000 mg/kg添加组显著高于对照组和抗生素组,说明一定剂量的丁酸梭菌可提高机体的体液免疫水平,改善蛋用仔公鸡免疫功能,增强疾病抵

抗力。

3.4 饲料中丁酸梭菌水平对蛋用仔公鸡空肠组织中 *IL-6*、*IFN- γ* 及 *TNF- α* mRNA 相对表达水平的影响

细胞因子包括淋巴因子、干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子、趋化因子等,主要是由免疫细胞分泌的能调节细胞功能的参与炎症反应、免疫反应、创伤愈合等过程的蛋白质和小分子多肽组成^[10]。*IL-6*、*TNF- α* 是黏膜免疫中介导炎症的细胞因子,在急慢性炎症反应中起重要作用,*IFN- γ* 是获得性免疫的细胞因子,可介导获得性免疫的3个时相,使机体获得性免疫得到加强^[11]。*IL-6* 等前炎症细胞因子可促进免疫细胞增殖和分化,从而提高动物机体的抵抗力。有试验证明,丁酸梭菌对于葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的急性溃疡性结肠炎(UC)小鼠有治疗作用,可以抑制 *TNF- α* 的基因表达^[12]。其实,在正常情况下,这些细胞因子的过度分泌会对机体产生负面影响,即导致营养物质的重新分配,将用于维持生长和骨骼肌沉积的营养物质转向于维持免疫反应,从而降低营养物质的利用效率,最终影响机体生长^[13]。这说明正常的生理情况下,没有病毒或其他诱生剂的作用,机体的免疫功能处于平稳状态,细胞因子的分泌受到一定程度的抑制,对于机体是有利的。本试验的结果表明,1 000 mg/kg 丁酸梭菌添加组与对照组相比显著降低了 *IL-6* 和 *TNF- α* mRNA 相对表达水平,*IFN- γ* mRNA 相对表达水平与对照组差异不显著,但随着丁酸梭菌添加量的增加也呈现下降的趋势。分析其作用机理可能与丁酸的作用密不可分,丁酸梭菌的主要代谢产物是丁酸,丁酸能够促进动物肠道的上皮细胞繁殖,尤其对于炎症性肠疾病,具有肠道黏膜修复和逆转黏膜通透性增加的功能,并且丁酸能够刺激肠道黏膜免疫活性,影响参与免疫调节的某些细胞因子等^[14-16]。另外一个原因可能是与其对肠道微生物群平衡的调整有关,益生菌的增加,导致致病菌和潜在致病菌无法或较少与肠黏膜接触,其启动下游事件的能力被降低,结果表现为各种促炎细胞因子、组织因子表达的下调,从而免疫功能增强,抑制炎症^[17]。也有一些试验结果与本试验不一致,可能是由于各试验所使用的菌株、试验地点、试验时间(季节)、饲养条件、动物生理状态的不同而导致的。

4 结论

① 本试验条件下,饲料中添加适量丁酸梭菌可以促进蛋用仔公鸡的生长,提高平均体重和日增重,降低料重比。

② 饲料中添加适量丁酸梭菌可以提高免疫器官指数,促进免疫器官发育;能够增加血清中 IgG、IgA 等免疫指标的含量,增强免疫功能。

③ 饲料中添加适量丁酸梭菌可以降低空肠组织中 *IL-6*、*IFN- γ* 及 *TNF- α* mRNA 相对表达水平,从而增强机体的免疫力,减轻肠道炎症的发生。

④ 本试验条件下,1 000 mg/kg 的添加量效果最好。

参考文献:

- [1] 李研东,韩雪,王颖,等. 动物微生态制剂的研究进展[J]. 饲料研究,2008(2):22-24.
- [2] 杜云平,周庆丰,郑泽铭,等. 丁酸梭菌对肉鸡生产性能的影响[J]. 饲料广角,2009(22):22-34.
- [3] 杨欣. 丁酸梭菌与日粮油脂调控肉仔鸡肌肉品质的研究[D]. 博士学位论文. 北京:中国农业大学,2010:43-50.
- [4] ARAKI Y, ANDOH A, TAKIZAWA J, et al. *Clostridium butyricum*, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2004, 13:577-580.
- [5] ARAKI Y, ANDOH A, FUJIYAMA Y, et al. Oral administration of a product derived from *Clostridium butyricum* in rats [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2002, 9:53-57.
- [6] ARAKI Y, ANDOH A, FUJIYAMA Y, et al. Short-term oral administration of a product derived from a probiotic, *Clostridium butyricum* induced no pathological effects in rats [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2002, 9:173-177.
- [7] 高俊. 酵母培养物对肉仔鸡的作用及其机理[D]. 博士学位论文. 北京:中国农业科学院,2008.
- [8] 张彩云,刘来亭,杜灵广,等. 酪酸芽孢杆菌对断奶仔猪生产性能和血清生化指标的影响[J]. 中国畜牧杂志,2009,45(13):43-45.
- [9] 宋增福. 丁酸梭菌 C2 菌株对鲢鱼肠道微生态调控作用与机理研究[D]. 博士学位论文. 杭州:浙江大学,2006.
- [10] 马双余,李爱民,李宗芳,等. 门静脉高压症脾功能亢进与正常脾组织细胞因子表达差异的研究[J].

中华普通外科学文献,2008,2(6):24-27.

- [11] 宫德正,邹原,梅华. 肠黏膜免疫系统与细胞因子[J]. 大连医科大学学报,2002,24(1):56-60.
- [12] 刘凌云,左和宁,杨伟峰. 联用乳酸杆菌和丁酸梭菌治疗小鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 实用预防医学,2009,16(4):1255-1258.
- [13] 刘军,周安国,王之盛. 日粮锌与蛋白质水平对断奶仔猪前炎症细胞因子和肠道黏膜免疫分子的影响[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(5):24-28.
- [14] VENKATRAMAN A, RAMAKRISHNA B S, PULIMOOD A B, et al. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*,2000,35:1053-1059.
- [15] SAKATA T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors[J]. *British Journal of Nutrition*,1987,58:95-103.
- [16] SAKATA T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation of isolated and denervated jejunal segment of the rat[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*,1989,24:886-890.
- [17] 刘凌云,杨伟峰. 联用乳酸杆菌和丁酸梭菌治疗小鼠急性溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 实用医学杂志,2009,25(18):3019-3021.

Clostridium butyricum Affects Growth Performance, Immune Indices and mRNA Expression of Related Cytokine Genes in Jejunum of Egg-Laying Male Chicks

LIU Tingting¹ HUA Jing² WANG Xiaoxia^{3*} LIU Liru⁴ HAI Peng⁵

(1. College of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural University, Beijing 102206, China; 2. College of Biotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 102206, China; 3. District Commission of Beijing's Changping District, Beijing 102200, China; 4. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 5. Fuxin City Animal Health Inspection of Liaoning Province, Fuxin 123000, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, immune indices and the mRNA relative expression of some related cytokine genes in jejunum of egg-laying male chicks. A total of 240 one-day-old healthy Hy-Line egg-laying male chicks were randomly divided into 6 groups with 4 replicates in each group and 10 chicks in each replicate. The basal diet was supplemented with 0 (control group) and 150 mg/kg aureomycin (antibiotic group), 250 (EG250), 500 (EG500), 750 (EG750), and 1 000 mg/kg (EG1 000) *Clostridium butyricum*, respectively. Growth performance, immune organ indices, serum immune indices and mRNA relative expression of some related cytokines were determined in different periods. The experiment lasted for 42 days. The results showed as follows: 1) compared with the control group, average body weight and average daily gain of chicks in EG1 000 were significantly increased ($P < 0.05$), but the supplementation of *Clostridium butyricum* had no effects on average daily feed intake and feed/gain ratio during the whole experimental period ($P > 0.05$). 2) Spleen index of chicks in EG 1 000 was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), but there were no significant differences in thymus index and bursa of Fabricius index of chicks among all groups ($P > 0.05$). 3) The serum IgG content in all *Clostridium butyricum* groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and serum IgG content in EG750 and EG1 000 was significantly higher than that in the antibiotic group ($P < 0.05$). The serum IgA content of chicks in EG1 000 was the highest during the whole experimental period, and there was a significant difference between EG1 000 and the control group or antibiotic group ($P < 0.05$). The serum C3 content of chicks in all *Clostridium butyricum* groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). 4) The relative expression level of IL-6 mRNA in jejunum of chicks in EG750 and EG1 000 was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$); the relative expression of TNF- α mRNA in EG1 000 was the lowest during the whole experimental period, and there was a significant difference between EG1 000 and the control group ($P < 0.05$). In conclusion, adding appropriate level of *Clostridium butyricum* to the diet can improve growth performance, enhance immune organ growth and function of chicks, and suppress the inflammation. The 1 000 mg/kg *Clostridium butyricum* had the best effect among the six groups. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(7):1302-1310]

Key words: *Clostridium butyricum*; growth performance; immune indices; cytokine; mRNA relative expression level