

口服益生菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 调控断奶仔猪空肠黏膜屏障功能的机理研究

唐志如*, 邓欢, 孙卫忠, 张小龙, 张翥

(西南大学动物科技学院, 生物饲料与分子营养实验室, 重庆 400715)

摘要: 旨在探讨口服益生菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) Nissle 1917 调控病原菌 *E. coli* Abbottstown 攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪肠道屏障功能的机理。将 20 头 21 d 断奶仔猪 (6.35±0.38 kg) 随机分为 4 组: (1) 饲喂基础日粮的对照组 (CON); (2) 正试期口服 *E. coli* Nissle 1917 组 (EcN); (3) 预试期 *E. coli* Abbottstown 攻毒组 (EcA); (4) 预试期 *E. coli* Abbottstown 攻毒和正试期口服 *E. coli* Nissle 1917 组 (EcN+EcA)。每个处理 5 个重复, 每个重复 1 头仔猪。试验分为 3 d 预试期和 21 d 正试期。预试期 EcA 和 EcN+EcA 组的断奶仔猪接种 5×10^9 *E. coli* Abbottstown。正试期 EcN 和 EcN+EcA 组仔猪每天每头口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917。试验结果表明, 未攻毒的断奶仔猪中, 与 CON 相比, 口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能显著改善生长性能 ($P < 0.05$), 降低腹泻率, 提高 occludin 蛋白水平 ($P < 0.05$), 显著降低空肠黏膜 calprotectin 蛋白水平 ($P < 0.05$), 显著下调空肠黏膜蛋白激酶 R (Protein kinase R, PKR)、toll 样受体-2 (Toll-like receptor-2, TLR-2) 和真核起始因子-5A (eukaryotic initiation factor-5A, eIF-5A) mRNA 的相对表达丰度 ($P < 0.05$), 上调空肠黏膜内皮生长因子 (Endothelial growth factor, EGF)、肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF-1)、三叶肽因子-3 (trefoil peptide factor-3, TFF-3) mRNA 的相对表达丰度 ($P < 0.05$); 在 *E. coli* Abbottstown 攻毒的断奶仔猪中, 与 EcA 组相比, 口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能显著改善生长性能 ($P < 0.05$), 降低腹泻率, 降低血清二胺氧化酶 (DAO) 活性 ($P < 0.05$) 和一氧化氮 (NO) 含量 ($P < 0.05$), 下调空肠黏膜 PKR、eIF-5A 和 TLR-2 mRNA 相对表达丰度 ($P < 0.05$), 显著降低空肠黏膜 calprotectin 蛋白水平和淋巴细胞数量 ($P < 0.05$), 显著提高空肠黏膜 occludin 蛋白水平 ($P < 0.05$), 上调空肠黏膜 IGF-1、HGF、TFF-3 和 EGF mRNA 相对表达丰度 ($P < 0.05$)。本试验结果提示, 口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能降低病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 日龄断奶仔猪空肠黏膜屏障功能的损伤。

关键词: 益生菌; *Escherichia coli* Nissle 1917; 仔猪; 肠道屏障; occludin; calprotectin

中图分类号: S816.79

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)01-0078-09

Study on the Mechanism of Orally Administered Probiotics *Escherichia coli* Nissle 1917 Regulating Intestine Barrier in Weaned Piglets

TANG Zhi-ru*, DENG Huan, SUN Wei-zhong, ZHANG Xiao-long, ZHANG Zhu

(Key Laboratory for Bio-feed and Molecular Nutrition, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: This research aimed to study the mechanism of orally administered probiotics *Escherichia coli* (*E. coli*) Nissle 1917 regulating intestine barrier in weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown. Twenty piglets with an average live body weight of (6.35±0.58) kg randomly assigned to 4 treatments: (1) Weaned piglets were provided a based

收稿日期: 2013-05-23

基金项目: 重庆市自然科学基金 (cstc2012jjA80001); 国家 973 重点基础研究发展计划项目 (2013CB127303); 西南大学基本科研业务费 (XDJK2011C030); 西南大学博士基金 (SWU111002)

作者简介: 唐志如 (1977-), 女, 湖南安仁人, 博士, 教授, 主要从事肠道微生物研究, Tel: 023-68251196

* 通信作者: 唐志如, 教授, E-mail: tangzhiru2326@sina.com.cn

diet (CON); (2) Weaned piglets were orally administered probiotics *E. coli* Nissle 1917 in the test (EcN); (3) Weaned piglets were challenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown in the pre-test (EcA); (4) Weaned piglets were challenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown in the pre-test and orally administered probiotics *E. coli* Nissle 1917 (EcN + EcA) in the test. Each treatment had one repeat and one repeat had one piglet. This experiment had a 3 d pre-test and 21 d test. Weaned piglets in the EcA and EcN + EcA groups were challenged by 5×10^9 enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown in the pre-test (EcA). Weaned piglets in the EcN and EcN + EcA groups were daily orally administered probiotics 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 in the test. The results showed as follows: Compared with the CON group, orally administered 1×10^{10} probiotics *E. coli* Nissle 1917 could improve growth performance ($P < 0.05$), decrease diarrhea ratio, increase the concentration of occludin ($P < 0.05$), decrease the concentration of calprotectin ($P < 0.05$), down-regulate the mRNA expression levels of Protein kinase R (PKR), Toll-like receptor-2 (TLR-2) and eukaryotic initiation factor-5A (eIF-5A) ($P < 0.05$), and up-regulate the mRNA expression levels of Endothelial growth factor (EGF), Hepatocyte growth factor (HGF), Insulin-like growth factor (IGF-I), Trefoil peptide factor-3 (TFF-3) ($P < 0.05$) in jejunal mucous membrane in weaned piglets unchallenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown; Compared with the EcA group, orally administered 1×10^{10} probiotics *E. coli* Nissle 1917 could improve growth performance ($P < 0.05$), decrease diarrhea ratio, decrease serum concentration of DAO ($P < 0.05$) and NO ($P < 0.05$), increase the concentration of occludin ($P < 0.05$), decreased the concentration of calprotectin ($P < 0.05$), down-regulate the mRNA expression levels of PKR, eIF-5A and TLR-2 ($P < 0.05$), and up-regulate the mRNA expression levels of IGF-I, HGF, TFF-3 and EGF ($P < 0.05$) in jejunal mucous membrane in weaned piglets challenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown. These results indicate that orally administered 1×10^{10} probiotics *E. coli* Nissle 1917 can protect greatly the intestinal barrier of early weanling piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *E. coli* Abbottstown.

Key words: probiotics; *Escherichia coli* Nissle 1917; piglets; intestinal barrier; occludin; calprotectin

仔猪肠道发育不完善和肠道微生态区系复杂,断奶应激会损伤肠道黏膜,因此如何调控肠道健康已成为仔猪生长发育的关键。1917年,志贺菌病爆发,德国医生 Alfred Nissle 从疫区一位未患肠炎的士兵粪便中分离了一株无致病性的 *Escherichia coli* (*E. coli*) 菌株,命名为 *E. coli* Nissle 1917,其血清型为 O6:K5:H1,是少量非乳酸菌益生菌的一种,对肠道健康具有重要作用。*E. coli* Nissle 1917 拥有多种益生因子如:结合铁的物质(Siderophores)和小菌素(Microcins)^[1]。EcN 富含至少 6 种铁摄取系统(iron-uptake systems),产生的小菌素(Microcins)能有效拮抗其他肠道细菌。同时 EcN 表达的多种菌毛有利于其定植在肠道中形成自然屏障抵御致病菌的定植。L. Grozdanov 等^[2]发现, EcN 具有特殊的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)结构,推测这种结构与其特殊的免疫调控特点有关。体外试验

表明, EcN 的生物学功能与在肠道微生物的调控和肠内细胞因子引起免疫反应相关联^[3]。另外, *E. coli* Nissle 1917 通过上调闭锁小带(OZ-1, OZ-2)的表达,增强肠上皮细胞的紧密连接,减少因为肠漏(Leaky-gut)引起的细菌异位与代谢产物穿过肠上皮细胞^[4]。目前, *E. coli* Nissle 1917 对早期断奶仔猪肠屏障影响的研究较少,就 *E. coli* Nissle 1917 对早期断奶仔猪肠黏膜屏障的作用机理未见研究报道。

本试验采用大肠杆菌攻毒或未攻毒早期断奶仔猪,研究口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 对仔猪肠黏膜通透性及空肠 occludin、calprotectin 和再生因子的表达水平的影响,以期探明 *E. coli* Nissle 1917 调控断奶仔猪空肠黏膜屏障功能的机理,为其在断奶仔猪中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种

E. coli. Nissle 1917 购自德国微生物菌种中心(编号为 DSM 6601),血清型为 O6:K5:H1。攻毒大肠杆菌菌株 *E. coli* Abbottstown 为导致仔猪下痢的大肠杆菌典型病原菌株,其血清型为 O149:K91,购自中国兽医药品监察所。*E. coli* Nissle 1917 和 *E. coli* Abbottstown 菌株在肉汤培养基中振荡培养 12 h。

1.2 试验猪分组与试验日粮

选购胎次相近的健康三元杂交去势 21 d 断奶仔猪((6.35±0.38) kg)(杜洛克×长白×大约克)20 头,采用单因素完全随机分组试验设计,分为 4 个处理:(1)饲喂基础日粮的对照组(CON);(2)正试期口服 *E. coli* Nissle 1917 组(EcN);(3)预试期 *E. coli* Abbottstown 攻毒组(EcA);(4)预试期 *E. coli* Abbottstown 攻毒和正试期口服 *E. coli* Nissle 1917 组(EcN+EcA)。每个处理 5 个重复,每个重复 1 头仔猪,单栏饲养。试验分为 3 d 预试期和 21 d 正试期。预试期第 1 天对 EcA 组和 EcA+EcN 组的断奶仔猪接种 5×10^9 *E. coli* Abbottstown,第 2 天观察腹泻情况,对未腹泻的 2 头仔猪再次接种 5×10^9 *E. coli* Abbottstown,第 3 天再次观察腹泻情况。正试期 EcN 组和 EcA+EcN 组仔猪每天每头口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917。试验在高床猪舍进行,每日于 08:00、12:00 和 18:00 共投料 3 次,自由饮水。

试验基础日粮参照 NRC(2012)标准设计^[5],各试验组基础日粮组成和营养水平见表 1,各组日粮中未添加抗生素和除表 1 以外的其他添加剂。

1.3 称重和记录

试验第 1 和第 25 天 08:00 空腹称重记录始重和末重,每天记录采食量,每天记录腹泻情况。根据以下公式计算生长性能和腹泻指数:平均日增重(ADG)=全期增重(kg)/天数(d);平均日采食量(ADFI)=全期采食量/天数(d);饲料转化率:料肉比(F/G)=饲料消耗/增重;腹泻率=腹泻仔猪头次/仔猪总头次×100%。腹泻指数(%)=Σ(腹泻头数×腹泻天数)/(试验头数×正试期天数)×100。

1.4 血清一氧化氮和二胺氧化酶的含量检测

试验结束后,每组 5 头猪进行前腔静脉采血,分离血清。血清一氧化氮(Nitrogen, NO)和二胺氧化

表 1 21 日龄断奶仔猪玉米-豆粕型日粮组成及其营养水平

Table 1 The dietary ingredients and nutritional level of 21-day weaned pig %

项目 Item	含量 Content
日粮组成 Ingredient	
玉米(CP8% 水分<13%)Corn	58.42
豆粕(CP 43%) Soybean meal	25.00
鱼粉(CP 65%) Fish meal	5.00
乳清粉(90%) Whey	4.00
乳脂粉(50%脂肪)Cream	5.00
石粉 Limestone	0.30
磷酸氢钙 Monocalcium phosphate	1.10
防霉剂 Moldproofant	0.10
抗氧化剂 Antioxidant	0.02
多维预混料 ^a Vitamin premix	0.04
氯化胆碱(50%) Choline chloride	0.08
微量元素预混料 ^b Trace mineral premix	0.30
食盐 NaCl	0.30
甜味料 Flavor	0.06
赖氨酸盐酸盐 L-Lysine · HCl	0.23
蛋氨酸 Met	0.05
总量 Total	100.00
营养水平 Nutritional level	
消化能/(MJ · kg ⁻¹) DE	14.3
粗蛋白质 CP	19
钙 Ca	0.58
有效磷 AP	0.42
赖氨酸 Lys	1.2
蛋氨酸 Met	0.4
苏氨酸 Thr	0.85

a. 多维预混料向每千克试验日粮提供:11 000 IU 维生素 A, 1 100 IU 维生素 D₃, 16 IU 维生素 E, 1 mg 维生素 K, 6 mg 泛酸, 2 mg 核黄素, 0.8 mg 叶酸, 10 mg 尼克酸, 0.6 mg 硫胺素, 0.6 mg 维生素 B₁, 0.08 mg 生物素, 0.03 mg 维生素 B₁₂。b. 微量元素预混料向每千克试验日粮提供:95 mg Zn (ZnSO₄), 100 mg Fe(FeSO₄), 3.7 mg Mn(MnSO₄), 16.5 mg Cu(CuSO₄), 140 μg I(KI), 286 μg Se(Na₂SeO₃)

a. Vitamin premix provide the following per kilogram of diet: 11 000 IU vitamin A, 1 100 IU vitamin D₃, 16 IU vitamin E, 1 mg vitamin K, 6 mg pantothenate, 2 mg retinoic acid, 0.8 mg folic acid, 10 mg nicotinic acid, 0.6 mg thiamine, 0.6 mg vitamin B₁, 0.08 mg biotin; 0.03 mg vitamin B₁₂。b. Trace mineral premix provide the following per kilogram of diet: 95 mg Zn(ZnSO₄), 100 mg Fe(FeSO₄), 3.7 mg Mn(MnSO₄), 16.5 mg Cu(CuSO₄), 140 μg I(KI), 286 μg Se(Na₂SeO₃)

酶(Diamine oxidase, DAO)含量按试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)进行测定。

1.5 肠道淋巴细胞数量测定

采血后,每组屠宰 5 头仔猪,取空肠肠壁,用中性甲醛磷酸盐缓冲液固定,委托中南大学湘雅医学院病理教研室测定。

1.6 Western blot 检测 occludin 蛋白水平

采血后,每组屠宰 5 头仔猪,无菌取 100 mg 空肠黏膜组织样加 1 mL RIPA 蛋白裂解液进行匀浆,离心分离上清,每泳道以 20 μg 蛋白上样,进行 10% SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至硝酸纤维素膜后,进行 Western blot,兔抗猪 occludin 多抗(1 : 1 000)(购自 LifeSpan BioSciences)为目的基因的一抗, β -actin(1 : 1 000)(购自 LifeSpan BioSciences)为参照基因的一抗,二抗为结合有 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1 : 2 500, 购自 LifeSpan BioSciences),用 GIS1000 分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化,并将目的蛋白的灰度值除以内参 β -actin 的灰度值以校正误差。

1.7 免疫组织化学法检测 calprotectin 蛋白浓度

每组取 5 头猪,采集空肠黏膜组织,采用免疫组织化学 SP 法检测 calprotectin 蛋白浓度,一抗为兔抗猪 calprotectin(购自 Abcam, 1 : 1 000)。显微镜下呈棕黄色为阳性,每张切片于光镜下($\times 400$)随机选取 5 个视野,固定窗口面积,利用 Image-Pro Plus 图像分析系统测定各组空肠黏膜中阳性产物平均积

分光密度值,通过平均积分光密度值的大小来反映 calprotectin 蛋白浓度。

1.8 荧光定量 PCR 法检测空肠黏膜相关基因 mRNA 相对表达量

采血后,每组屠宰 5 头仔猪,取空肠中段 10 cm 黏膜,冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。根据猪 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogease gene, GAPDH)、内皮生长因子(Endothelial growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF-I)、三叶肽因子-3(Trefoil peptide factor-3, TFF-3)、蛋白激酶 R(Protein kinase R, PKR)、toll 样受体-2(Toll-like receptor-2, TLR-2)和真核起始因子-5A(Eukaryotic initiation factor-5A, eIF-5A)的基因序列,采用 DNA MAN 设计引物。引物由宝生物(大连)工程有限公司合成,序列见表 2。按照 Trizol(购自 Invitrogen)说明书提取组织总 RNA,按反转录试剂盒(购自 Promega)操作方法合成 cDNA,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存以备 Real-time PCR 使用。每个样品 2 个重复,Real-time PCR 反应体系(10 μL): cDNA 1 μL , SYBR (2 \times) 5 μL , ROX (0.2 μL), Primer S (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , Primer A (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , DEPC- H_2O 3.4 μL 。反应程序:预变性(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),接下来 40 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s)。

表 2 空肠黏膜相关基因 PCR 扩增引物序列

Table 2 Primers used to amplify jejunum mucosa genes

基因 Gene	序列号 Accession number	上游引物(5'→3') Sense primer	下游引物(5'→3') Antisense primer	PCR 产物 大小/bp PCR products size
<i>GAPDH</i>	AF017079	GAAGGTCGGAGTGAACGGAT	CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	149
<i>HGF</i>	XM_003130222.2	CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	TTTACCAATGATGCAGTTTCTAATG	165
<i>IGF-I</i>	NM_214256.1	CTTCAGTTCGTGTGCGGAGAC	TGGCAGGCTTGAGGGGTG	163
<i>TFF-3</i>	XM_003358970.1	CTGTCCGGCGAACCCAGTGTG	CAGGGGCTTGAAGCACCAG	141
<i>EGF</i>	NM_214084.1	GGAGACCAGAAACCCACG	GCACACACTCCAGACCTTCG	190
<i>PKR</i>	NM_214319.1	GAGCACATCGGCTTCAGAGTC	ATGGGCGAGGTAATGTAGGTG	171
<i>TLR2</i>	NM_213761.1	CAGCACGAGAATACACAGTTTAACC	AACGAGTTGAGATTGTTATGTCTAATCT	84
<i>eIF-5A</i>	XM_003131933.1	CTCAGCCACCTTCCCAATGC	CCCAGTAAAGATGTCAATACCAACC	157

1.9 统计分析

采用 SAS9.1 统计软件 GLM 程序进行方差分析,差异显著性分析用 Duncan 进行多重比较,数据采用平均值、SEM 和 P 值表示;基因表达量分析以内参为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行比较,对照组平均值归一法参考文献[6]。

2 结果

2.1 *E. coli* Nissle 1917 对仔猪生长性能和腹泻的影响

如表 3 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对

病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪末重、ADG、ADFI 和 F/G 具有显著的影响 ($P < 0.001$),与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪末重、ADG、ADFI 显著增加 ($P < 0.05$),料肉比显著降低,而 CON 和 EcN+EcA 组之间断奶仔猪末重、ADG、ADFI 和 F/G 差异不显著 ($P > 0.05$)。

CON 组断奶仔猪腹泻率为 27.5%,与 CON 组相比,未攻毒断奶仔猪口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 后未曾出现腹泻。试验期内 EcA 组仔猪腹泻率达到 100%,与 EcA 组相比,攻毒断奶仔猪口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 后,腹泻率下降到 26.7%。

表 3 口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 日龄断奶仔猪生长性能的影响 ($n=5$)

Table 3 Effects of orally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 on growth performance in weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$)

项目 Item	组别 Group				P
	CON	EcN	EcA	EcN+EcA	
始重/kg Initial weight	6.35±0.44	6.35±0.35	6.34±0.45	6.35±0.40	0.999 9
末重/kg Final weight	11.75±0.57 ^b	14.17±0.26 ^a	7.63±0.40 ^c	11.77±0.62 ^b	<0.000 1
平均日增重/(g·d ⁻¹) ADG	225.0±6.7 ^b	325.9±6.9 ^a	53.3±9.4 ^c	226.4±10.3 ^b	<0.000 1
平均日采食量/(g·d ⁻¹) ADFI	544.9±17.7 ^b	635.7±28.5 ^a	191.9±48.7 ^c	540.2±29.2 ^b	<0.000 1
料肉比 F/G	2.42±0.13 ^b	1.95±0.11 ^c	3.59±0.52 ^a	2.39±0.15 ^b	<0.000 1
腹泻指数/% Diarrhea index	27.5	0	100	26.7	

同行肩注为不同小写字母者差异显著 ($P < 0.05$)。表 4 同

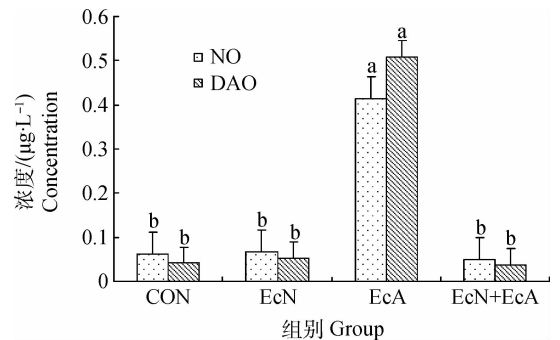
Values with different small letter superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as Table 4

2.2 *E. coli* Nissle 1917 对仔猪肠道黏膜通透性的影响

如图 1 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪血清 NO 和 DAO 具有显著的影响 ($P < 0.005$),与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪血清 NO 和 DAO 浓度具有显著下降的趋势 ($P < 0.05$),而在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中两两之间仔猪血清 NO 和 DAO 浓度差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 *E. coli* Nissle 1917 对仔猪肠道黏膜 occludin 和 calprotectin 蛋白水平的影响

如图 2 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪空肠黏膜 occludin 蛋白水平具有显著的影响 ($P < 0.005$)。在 4 组中,两两之间仔猪空肠黏膜 occludin 蛋白水平差异显著 ($P < 0.05$)。仔猪空肠黏膜 occludin 蛋白水平从高到低分别为:EcN、EcN+EcA、CON 和 EcA 组。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同

The different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below figures

图 1 口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪血清 NO 和 DAO 的影响 ($n=5$)

Fig. 1 Effects of orally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 on NO and DAO content in serum of weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$)

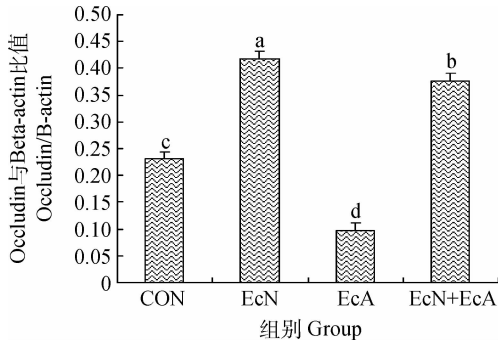


图2 口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪肠道黏膜 occludin 蛋白浓度的影响 ($n=5$)

Fig. 2 Effects of orally administered *E. coli* Nissle 1917 on jejuleum occludin concentration in 21 d weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$)

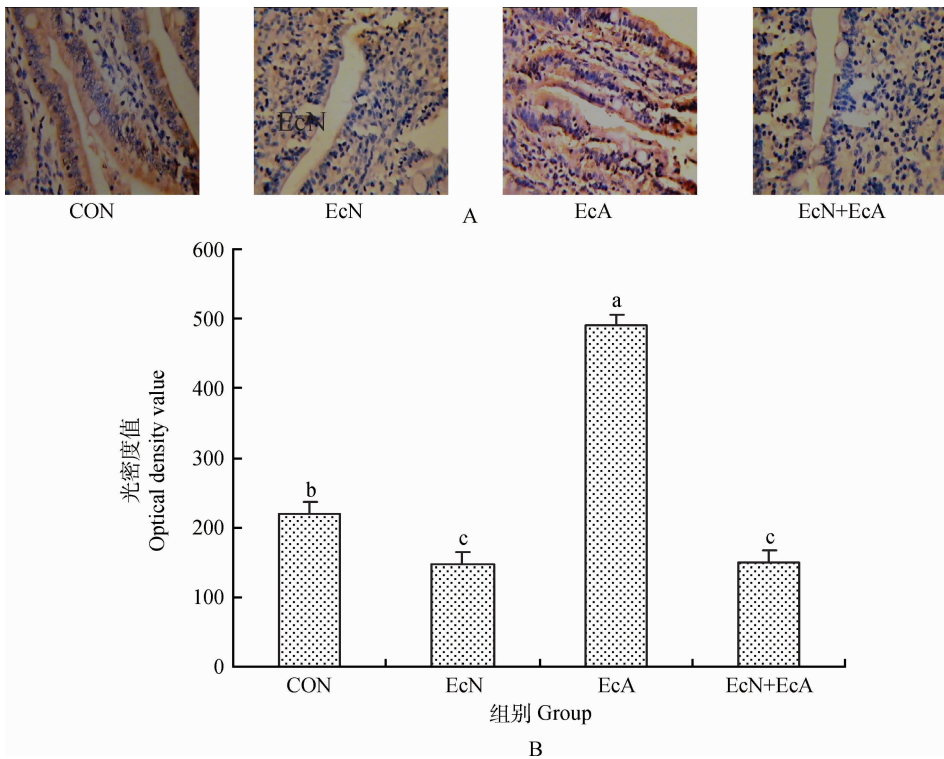


图3 各组 calprotectin 蛋白免疫组化代表性图片 (棕黄色, $400\times$, A) 和口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪肠道黏膜 calprotectin 的影响 ($n=5$, B)

Fig. 3 Calprotectin immunohistochemical picture in groups (brownish yellow, $400\times$, A) and effects of orally administered *E. coli* Nissle 1917 on jejuleum calprotectin in 21 d weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$, B)

膜淋巴细胞数量具有显著的影响 ($P<0.05$)。与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜淋巴细胞数量具有显著下降的趋势 ($P<0.05$)。而在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中两两之间仔猪空肠黏膜淋巴细胞数量差异不显著 ($P>0.05$)。

如图 3 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪空肠黏膜 calprotectin 蛋白水平具有显著的影响 ($P<0.05$)。与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 calprotectin 蛋白表达水平具有显著下降的趋势 ($P<0.05$)。与 CON 相比,在 EcN 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 calprotectin 蛋白表达水平差异显著 ($P<0.05$)。在 EcN 和 EcN+EcA 组之间仔猪空肠黏膜 calprotectin 蛋白表达水平差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4 *E. coli* Nissle 1917 对仔猪空肠黏膜淋巴细胞数量的影响

如图 4 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪空肠黏

2.5 *E. coli* Nissle 1917 对仔猪空肠黏膜相关基因 mRNA 相对表达丰度的影响

如表 4 所示,口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪空肠黏膜相关基因 (*IGF-1*、*HGF*、*TFF-3*、*EGF*、*PKR*、*eIF-5A* 和 *TLR-2*) mRNA 相对表达丰度具有明显的影

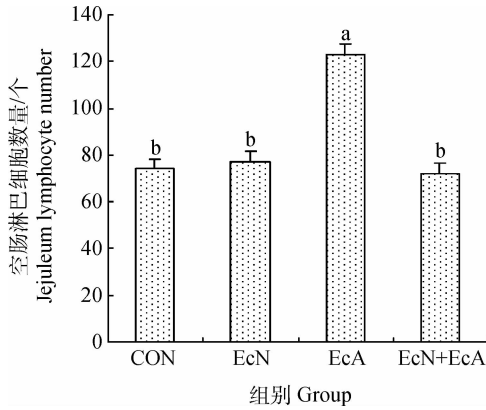


图4 口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪肠道黏膜淋巴细胞数量的影响 ($n=5$)

Fig. 4 Effects of orally administered *E. coli* Nissle 1917 on jejuleum lymphocyte number in 21 d weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$)

表4 口服益生菌 *E. coli* Nissle 1917 对病原大肠杆菌攻毒或未攻毒 21 d 断奶仔猪空肠黏膜基因 mRNA 相对表达丰度 ($n=5$) 的影响

Table 4 Effects of orally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 on jejuleum gene mRNA expression level in 21-d weaned piglets challenged or unchallenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* Abbottstown ($n=5$)

基因 Gene	组别 Group				P
	CON	EcN	EcA	EcN+EcA	
<i>IGF-I</i>	1.00±0.26 ^b	4.55±0.65 ^a	0.37±0.14 ^c	2.10±0.52 ^b	<0.001
<i>HGF</i>	1.00±0.16 ^c	2.99±0.28 ^a	0.36±0.05 ^d	1.75±0.17 ^b	<0.001
<i>TFF-3</i>	1.00±0.14 ^c	3.16±0.32 ^a	0.31±0.07 ^d	1.75±0.19 ^b	<0.001
<i>EGF</i>	1.00±0.16 ^b	3.81±0.33 ^a	0.50±0.13 ^b	3.13±0.30 ^a	<0.001
<i>PKR</i>	1.00±0.14 ^b	0.36±0.06 ^c	2.06±0.33 ^a	0.38±0.07 ^c	<0.001
<i>eIF-5A</i>	1.00±0.18 ^b	0.34±0.06 ^c	3.42±0.67 ^a	0.73±0.07 ^{bc}	<0.001
<i>TLR-2</i>	1.00±0.25 ^b	0.12±0.11 ^c	3.89±0.53 ^a	0.42±0.15 ^{bc}	<0.001

而在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中两两之间仔猪空肠黏膜淋巴细胞数量差异不显著 ($P>0.05$)。与 CON 组相比,在 EcN 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 *PKR* mRNA 相对表达丰度具有显著下调的趋势 ($P>0.05$),2 组之间差异不显著 ($P>0.05$)。与 CON 组相比,在 EcN 组中仔猪空肠黏膜 *eIF-5A* 和 *TLR-2* mRNA 相对表达丰度显著下调 ($P<0.05$),在 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 *eIF-5A* 和 *TLR-2* mRNA 相对表达丰度无显著差异 ($P>0.05$);而 EcN 与 EcN+EcA 组之间仔猪空肠黏膜 *eIF-5A* 和 *TLR-2* mRNA 相对表达丰度差异不显著 ($P>0.05$)。

响 ($P<0.001$)。

与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 *IGF-I*、*HGF*、*TFF-3* 和 *EGF* mRNA 相对表达丰度具有显著上升的趋势 ($P<0.05$)。与 EcN 组相比,CON 和 EcN+EcA 组仔猪空肠黏膜 *IGF-I* mRNA 相对表达丰度显著下调 ($P>0.05$),2 组之间差异不显著 ($P>0.05$)。在 4 组中,两两之间仔猪空肠黏膜 *HGF* 和 *TFF-3* mRNA 相对表达丰度差异显著 ($P<0.05$),从高到低分别为:EcN 组、EcN+EcA 组、CON 组和 EcA 组。与 CON 组相比,在 EcN 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 *EGF* mRNA 相对表达丰度具有显著下调的趋势 ($P<0.05$),2 组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

与 EcA 组相比,在 EcN、CON 和 EcN+EcA 组中仔猪空肠黏膜 *PKR*、*eIF-5A* 和 *TLR-2* 基因 mRNA 相对表达丰度具有显著下调的趋势 ($P<0.05$)。

3 讨论

肠道通透性增高是肠道黏膜机械屏障功能受损的间接反映指标。DAO 是哺乳动物肠黏膜上层绒毛细胞胞质中具有高度活性的细胞内酶,在正常情况下,血浆 DAO 活性很低,当肠黏膜上皮细胞受到损伤后释放至肠细胞间隙、淋巴管和血液,使血浆 DAO 升高。血浆和肠黏膜 DAO 活性作为反映肠道屏障结构损伤与修复情况的标志物,间接反映肠黏膜通透性^[7]。NO 作为内源性舒张因子,是肠道炎症的标志物^[8]。calprotectin 的分子量为 36 ku,

是钙和锌的结合蛋白,可抵抗消化酶的降解,易于在粪便、内容物和粘膜中被检出,因此 calprotectin 已作为炎症肠道疾病的生物标志物^[9]。本研究结果显示:(1)未攻毒的 EcN 和 CON 组中断奶仔猪血清 DAO 和 NO 浓度和空肠黏膜 calprotectin 蛋白维持在低水平,这暗示断奶仔猪未受到病原菌攻击时肠道黏膜通透性低,肠道屏障结构完好。(2)断奶仔猪在致病性 *E. coli* Abbottstown 攻击下,血清 DAO 和 NO 和空肠黏膜 calprotectin 蛋白水平浓度快速升高,而口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能显著降低血清二胺氧化酶(DAO)活性($P < 0.05$)和一氧化氮(NO)含量($P < 0.05$),显著降低淋巴细胞数量($P < 0.05$),这表明口服 1×10^{10} EcN 能有效保护肠道屏障结构。(3)口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能显著改善生长性能($P < 0.05$)和断奶仔猪腹泻,这也验证了 *E. coli* Nissle 1917 对断奶仔猪肠道屏障结构的有效保护作用。

EcN 保护肠道屏障结构的机理在于以下几个方面:(1)本试验结果表明,无论在致病菌 *E. coli* Abbottstown 攻击下,还是在未受致病菌 *E. coli* Abbottstown 攻击下,口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 显著下调空肠黏膜 PKR、eIF-5A 和 TLR-2 mRNA 相对表达丰度($P < 0.05$)。PKR 是干扰素诱导的、并在干扰素抗病毒过程中起重要作用的蛋白激酶,但在未受病原菌攻击时不会被激活^[10],eIF-5A 是细胞增殖的必需蛋白,能启动蛋白的合成和重新分配,在组织出现炎症时 eIF-5A 表达量受抑制^[11]。肠道黏膜受到细菌的入侵后,肠道上皮组织作为先天免疫系统将会表达并分泌产生 toll 样受体(TLR2、TLR3、TLR4 和 TLR5)和细胞因子(TNF- α 、IL-15 和 TL-8 等)^[12],因此 EcN 能有效阻止致病性 *E. coli* Abbottstown 对肠道的攻击。

(2)occludin 主要集中于紧密连接纤维内,其功能维持关系到紧密连接的完整性,因此,occludin 蛋白是肠道屏障的重要组成部分^[13]。本试验免疫组化结果表明,无论在致病菌 *E. coli* Abbottstown 的攻击下,还是在未受致病菌 *E. coli* Abbottstown 的攻击下,断奶仔猪口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 能提高空肠黏膜上皮细胞 occludin 的表达($P < 0.05$),从而提高肠道紧密连接性,有效封闭上皮细胞间隙,从而有效阻止肠腔内细菌、毒素及炎性介质等物质的旁细胞转运,维持肠黏膜上皮屏障功能的完整性,降低肠黏膜损伤,保护肠道屏障功能。细

菌、病毒和内毒素可以通过调节或影响某些细胞因子及蛋白激酶 C 等来调控跨膜蛋白 occludin 的表达,从而降低肠道上皮细胞的屏障功能^[14]。刘海萍等^[15]认为,早期断奶通过破坏肠道黏膜结构,增加肠道通透性,从而破坏肠道屏障功能,可能归因于肠上皮细胞紧密连接蛋白 occludin mRNA 表达下降。

(3)在肠黏膜修复过程中肠道上皮细胞处于一种动态平衡状态,这一过程涉及多种因子(EGF、HGF、IGF-I 和 TFF-3)的调控^[16]。当黏膜受损时,通过细胞补偿性增殖、分化和血管生成,最终恢复正常黏膜表面。IGF-I 对复杂的细胞保护系统起到至关重要的作用,有利于保护细胞免受缺氧、免疫应激、氧化应激等损伤^[17]。传统断奶仔猪血清 IGF-I 高于早期断奶仔猪,可能是由于免疫原对机体的刺激引起细胞因子的释放,从而降低了血清中 IGF-I 的水平^[18],免疫应激期内 GH 和 IGF-I 的关系不再偶联,血浆 GH 的下降先于 IGF-I 的下降^[19]。本研究发现,IGF-I mRNA 表达的升高也揭示 EcN 与缓解仔猪免疫应激有关,由于 IGF-I 保护细胞免受免疫应激损伤,刺激细胞因子产生,抵抗炎症,从而口服 *E. coli* Nissle 1917 的仔猪抗腹泻能力增强。EGF 可促进细胞有丝分裂以及糖、蛋白质、DNA 和 RNA 合成,增强谷氨酰胺对小肠黏膜的营养作用^[20]。HGF 参与黏膜修复过程中的上皮重建和上皮细胞分裂增殖 2 种机制,是影响胃、肠上皮细胞迁移和增殖最主要的内源性刺激物^[21]。TFF-3 在全小肠和大肠上皮表达,由大小肠的隐窝及绒毛中的杯状细胞分泌,在黏膜层聚集。分泌的 TFF-3 进入肠腔与黏液糖蛋白相互作用,稳定肠黏液层,防止有害物质对肠黏膜的损伤,并能促进肠上皮细胞的增殖与移行,修复受损肠黏膜^[22]。三叶肽家族与 HGF 和 EGF 家族可协同作用利于黏膜保护和修复^[23]。本试验荧光定量结果表明,无论在致病菌 *E. coli* Abbottstown 攻击下,还是在未受致病菌 *E. coli* Abbottstown 攻击下,断奶仔猪口服 1×10^{10} *E. coli* Nissle 1917 可上调空肠黏膜 EGF、HGF 和 TFF-3 mRNA 相对表达丰度($P < 0.05$)。因此 *E. coli* Nissle 1917 可通过上调空肠黏膜 EGF、HGF、和 TFF-3 mRNA 的表达来修复受损空肠黏膜,维持完整的空肠黏膜屏障。

4 结 论

本研究结果表明,*E. coli* Nissle 1917 能降低肠

黏膜通透性、维护肠道形态结构、提高肠黏膜紧密连接性,维持肠道功能完整性,保护肠道屏障,进而提高断奶仔猪生长性能和降低断奶仔猪腹泻率。

参考文献:

- [1] PATZER S I, BAQUERO M R, BRAVO D, et al. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechololate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN [J]. *Microbiology*, 2003, 149(9): 2557-2570.
- [2] GROZDANOV L, ZHRINGER U, BLUM-OEHLER G, et al. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(21): 5912-5925.
- [3] VAARALA O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli [J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(12): 1634-1640.
- [4] UKENA S N, SINGH A, DRINGENBERG U, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(12): e1308.
- [5] National Research Council. Nutrient requirements of swine. Eleventh Revised Edition [M]. National Academic Press, Washington, D. C. 20418 U. S. A. , 2012.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T W. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [7] 王 蕾, 刘 坚, 侯永清, 等. α -酮戊二酸对 LPS 慢性应激仔猪小肠黏膜形态与功能的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(1): 46-52.
- [8] KIM J W, KIM C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-K β [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1352-1360.
- [9] TIBBLE J, TEAHON K, THJODLEIFSSON B, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease [J]. *Gut*, 2000, 47: 506-513.
- [10] HOTAMISLIGIL G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 900-917.
- [11] ALLEN H, JOHN W. Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *PNAS*, 2011, 24: 1-5.
- [12] YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4 [J]. *Nature*, 2002, 420(6913): 324-329.
- [13] ROXAS J, KOUTSOURIS A, BELLMEYER A, et al. Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in a Shiga toxin independent manner [J]. *Lab Invest*, 2010, 90(8): 1152-1168.
- [14] WEILER F, MARBE T, SCHEPPACH W, et al. Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 204(1): 83-86.
- [15] 刘海萍, 胡彩虹, 徐 勇. 早期断奶对仔猪肠通透性和肠上皮紧密连接蛋白 occludin mRNA 表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2008, 20(4): 442-446.
- [16] 王 玮, 孙 梅. 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展 [J]. *世界华人消化杂志*. 2005, 13(19): 2355-2359.
- [17] CONTI E, MUSUMECI M B, DE GIUSTI M, et al. IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy [J]. *Clin Sci*, 2011, 120(9): 377-402.
- [18] 范志勇, 王康宁. 猪生长因子释放基因对早期断奶仔猪生产性能、免疫功能及消化道发育的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2003, 39(3): 16-17, 43.
- [19] KAREN L T, SUSANNE S N, HENNING G B, et al. Effects of lipopolysaccharide endotoxin on the insulin-like growth factor I system in rats with cirrhosis [J]. *In Vivo*, 2008, 22: 655-662.
- [20] FALCONE R A, SHIN C E, ERWIN C R. The effect of epidermal growth factor on differentiation of isolated enterocytes after small bowel resection [J]. *J Pediatr Surg*, 1999, 34: 209-213.
- [21] HORI K, SHIOTA G, KAWASAKI H. Expression of hepatocyte growth factor and c-met receptor in gastric mucosa during gastric ulcer healing [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35: 23-31.
- [22] TAUPIN D R, KINOSHITA K, PODOLSKY D K. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 799-804.
- [23] FRAN V, EBBA N, ROSEMARY G, et al. Trefoil factor family peptides are increased in the saliva of children with mucositis clinical [J]. *Chem Lab Med*, 2011, 49: 2051-2055.