

# 丁酸梭菌对 2 种遗传背景仔猪肠道屏障功能的影响及其分子机制

李海花<sup>1</sup> 李玉鹏<sup>2\*</sup> 王柳懿<sup>3</sup> 王文杰<sup>2</sup> 乔家运<sup>3\*\*</sup>

(1.天津农学院动物科学与动物医学学院,天津 300384;2.天津市畜牧兽医研究所,天津 300381;

3.天津师范大学生命科学学院,天津 300387)

**摘要:** 本试验旨在研究丁酸梭菌对 2 种遗传背景断奶仔猪健康状况、肠道发育、肠道屏障功能、血清细胞因子含量和黏膜免疫关键蛋白表达的影响。试验采用 2×2 因子设计,选择(21±2)日龄、体重相近的“东北民猪×巴克夏”二元杂交黑猪 12 头,随机分成 2 个组(对照组和试验组);另选择(21±2)日龄、体重相近的“杜×长×大”三元杂交白猪 12 头,随机分成 2 个组(对照组和试验组);每个组均 6 个重复,单栏饲养。对照组均饲喂基础饲料,试验组均饲喂基础饲料+5×10<sup>11</sup> CFU/kg 丁酸梭菌制剂。试验预试期 3 d,正试期 14 d。结果表明:1)与相应的对照组相比,2 个试验组仔猪血小板数目均显著增加( $P<0.05$ ),空肠和回肠的绒毛高度/隐窝深度均显著提高( $P<0.05$ ),血清中 D-乳酸含量均显著降低( $P<0.05$ );二元杂交试验组仔猪空肠封闭蛋白 1(claudin-1)和回肠 claudin-1、紧密连接蛋白 1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin) mRNA 相对表达水平均显著提高( $P<0.05$ ),三元杂交试验组仔猪空肠 ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平均显著提高( $P<0.05$ );二元杂交试验组仔猪空肠黏膜中 Toll 样受体 2(TLR2)、Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)和回肠黏膜中 TLR2、TLR4、B 细胞淋巴瘤蛋白 3(Bcl3) mRNA 相对表达水平均显著提高( $P<0.05$ ),三元杂交试验组仔猪空肠黏膜中 TLR2 和回肠黏膜中 TLR2、TLR4、MyD88、Toll 作用蛋白(Tollip)、Bcl3 mRNA 相对表达水平均显著提高( $P<0.05$ )。2)二元杂交试验组仔猪空肠 claudin-1、TLR4 和 MyD88 和回肠 claudin-1、ZO-1、occludin mRNA 相对表达水平显著高于三元杂交试验组仔猪( $P<0.05$ ),但是二元杂交试验组仔猪回肠黏膜中 TLR2、TLR4、Tollip 和 Bcl3 mRNA 相对表达水平显著低于三元杂交试验组仔猪( $P<0.05$ )。综上所述,丁酸梭菌能够促进仔猪肠道发育,激活 2 种遗传背景仔猪肠黏膜 TLR2/4 信号通路,并促进其通路关键负反馈子的表达,提高紧密连接蛋白的表达,降低肠黏膜通透性,提高肠道屏障功能,并且对 2 种遗传背景仔猪肠道屏障功能的调节存在差异。

**关键词:** 丁酸梭菌;二元杂交;三元杂交;断奶仔猪;Toll 样受体 2;Toll 样受体 4

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)10-4647-12

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)是一种重要的益生菌,可以产生丁酸、氨基酸、维生素、消化

酶、纤维素和蛋白酶等营养物质和酶类,为机体提供营养<sup>[1]</sup>。我国农业农村部在 2009 年已批准其

收稿日期:2019-03-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31702147);天津市农业科学院青年科研人员创新研究与实验项目(编号:2018008);天津市“131”创新型人才团队(20180338)

作者简介:李海花(1981—),女,河南周口人,副研究员,博士,研究方向为动物营养与免疫。E-mail: lihaihuaok@126.com

\* 同等贡献作者

\*\* 通信作者:乔家运,研究员,硕士生导师,E-mail: qiaojy1979@126.com

为新型饲料添加剂。研究表明,丁酸梭菌具有促进动物生长、调节肠道微生态平衡、抑制肠道有害菌生长、抗炎和提高免疫力等作用<sup>[1-3]</sup>。在农业生产中,人们对杂交优势的认知和使用已广泛延伸至生产实践中的各个领域。杂种的亲本来自于不同的纯种,遗传物质互作形成一套新的遗传背景。畜牧业生产中常用养殖猪主要包括三元杂交猪、二元杂交猪和纯种猪。杂交猪和纯种猪有各自不同的优缺点,包括在生长速度、饲料转化率、自身免疫力和对不同疾病的抵抗能力方面均表现出一定的差异,这不仅与个体遗传差异有关,还与它们的遗传背景密切相关<sup>[4-6]</sup>。研究表明,宗地花猪三元杂交猪与二元杂交猪相比,具有较高的生长速度、日增重和屠宰率,而二元杂交猪的饲料转化率、饲料报酬高于三元杂交猪<sup>[4]</sup>。在长陆、长大陆和杜长大杂交猪的研究中发现,三元杂交猪比二元杂交猪具有较高的初生窝重和产仔率<sup>[7]</sup>。杜长大三元杂交猪与长大二元杂交猪相比较,三元杂交猪的料重比、胴体重、胴体斜长、瘦肉率、眼肌面积、腿臀率、皮厚和背膘厚均优于二元杂交猪<sup>[8]</sup>。但是,对不同遗传背景猪肠道屏障功能的调节作用是否存在差异及其分子机制目前还未见报道。因此,本研究利用2种遗传背景的断奶仔猪作为研究对象,通过比较分析丁酸梭菌对仔猪肠道发育、肠道紧密连接蛋白和微生物识别受体的表达和血清相关指标的影响,揭示丁酸梭菌调节2种遗传背景仔猪肠道屏障功能的作用及其分子机制,为理解丁酸梭菌对不同遗传背景猪肠道健康调节作用的差异提供帮助,还为丁酸梭菌在仔猪饲料上的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验设计

试验采用2×2因子设计,选择(21±2)日龄、健康状况良好、体重为(8.59±2.08) kg的“东北民猪×巴克夏”二元杂交黑猪12头,随机分成2个组(A组为对照组,B组为试验组),每组6个重复,单栏饲养。选择(21±2)日龄、健康状况良好、体重为(6.97±0.68) kg的“杜洛克×长白×大白”三元杂交白猪12头,随机分成2个组(C组为对照组,D组为试验组),每组6个重复,单栏饲养。对照组均饲喂基础饲料,试验组均饲喂基础饲料+5×10<sup>11</sup> CFU/kg 丁酸梭菌制剂。饲料配方参考 Li

等<sup>[9]</sup>,基础饲料组成及营养水平见表1。

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	63.20
豆粕 Soybean meal	19.00
乳清粉 Dried whey powder	4.80
鱼粉 Fish meal	8.60
葡萄糖 Glucose	1.00
酸化剂 Acidifier	0.30
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	0.60
碳酸钙 CaCO <sub>3</sub>	0.70
氯化钠 NaCl	0.30
L-赖氨酸盐酸盐 L-Lys·HCl	0.30
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.10
L-色氨酸 L-Trp	0.10
预混料 Premix <sup>1)</sup>	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
代谢能 ME/(MJ/kg)	13.60
赖氨酸 Lys	1.39
蛋氨酸 Met	0.53
粗蛋白质 CP	18.75
粗脂肪 EE	3.42
钙 Ca	0.88
总磷 TP	0.71
粗纤维 CF	2.20

<sup>1)</sup> 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 12 500 IU, VD 1 250 IU, VE 125 IU, VB<sub>12</sub> 90 μg, VB<sub>2</sub> 10 mg, VB<sub>3</sub> 35 mg, VB<sub>5</sub> 48 mg, 叶酸 folic acid 4.5 mg, 生物素 biotin 0.25 mg, Fe (as ferrous sulfate) 130 mg, Zn (as zinc sulfate) 180 mg, Cu (as copper sulfate) 15 mg, Mn (as manganese sulfate) 30 mg, I (as potassium iodide) 0.25 mg, Se (as sodium selenite) 0.25 mg。

<sup>2)</sup> 代谢能、赖氨酸和蛋氨酸为计算值,其余为实测值。ME, Lys and Met were calculated values, while the others were measured values.

本试验在天津市畜牧兽医研究所动物试验中心进行。所有猪只自由采食和饮水,猪舍温度控制在25~28℃。试验分为预试期(3 d)和正试期(14 d),预试期仔猪无不良反应后进入正试期。试验期内每日观察仔猪的健康状况,记录死淘仔猪、腹泻和用药情况,其他饲养管理和免疫程序参考仔猪饲养商业推荐程序进行。

## 1.2 血样、空肠和回肠肠段的采集

试验结束后剖杀,剖杀前 12 h 禁食,用真空促凝管进行前腔静脉采血 10 mL,待血液凝固后 4 ℃、4 000×g 离心 10 min,取上清,-80 ℃保存备用。用含有乙二胺四乙酸二钾(K<sub>2</sub>EDTA)的无菌管进行前腔静脉采血 10 mL,轻摇混匀,4 ℃保存备用。采血结束后将仔猪处死,无菌条件下迅速打开腹腔,分离并采集空肠和回肠中段肠管,用磷酸缓冲液(PBS)冲洗后,分为 2 部分:一部分用玻片刮取肠道黏膜分装于冻存管中,-80 ℃保存备用;另一部分立即置于 4%的福尔马林液中充分固定后备用。所采空肠和回肠肠段均分别截取相同部位。

## 1.3 指标测定和方法

采用全自动血液分析仪 BC-2800(深圳迈瑞)检测血常规指标。使用徕卡切片器(RM2235)制作石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,并用 Image Plus 6.0 软件和病理图像分析系统测量绒毛高度和隐窝深度。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清中 D-乳酸(上海酶联生物科技有限公司)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(上海康朗生物工程有限公司)、白细胞介素-8(IL-8)(上海康朗生物工程有限公司)含量和二胺氧化酶(DAO)活性(上海酶联生物科技有限公司)。

采用实时荧光定量 PCR 检测肠黏膜中封闭蛋

白 1(claudin-1)、紧密连接蛋白 1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin)、TNF-α、IL-8、Toll 样受体 2(TLR2)、Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、B 细胞淋巴瘤蛋白 3(Bcl3)、Toll 作用蛋白(Tollip)和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的表达,上述 11 个基因的上、下游引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 2;利用 T165-48 多样品组织研磨机对定量空肠和回肠样品破碎,用 Taco™ RNA 试剂盒提取仔猪空肠和回肠组织中总 RNA,按照 All-in-One™ First-cDNA Synthesis 试剂盒说明书操作步骤将总 RNA 逆转录为 cDNA。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 荧光定量试剂盒操作说明进行实时荧光定量 PCR 反应体系的配制,以 3 μL cDNA 为模板、最终反应体系为 20 μL 进行 PCR 扩增,检测 claudin-1、ZO-1、occludin、TNF-α、IL-8、TLR2、TLR4、MyD88、Bcl3 和 Tollip 的 mRNA 相对表达水平。实时荧光定量 PCR 反应条件为:95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,62 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s 并采集荧光信号,32 个循环;72 ℃ 10 s,95 ℃ 10 s,自动采集荧光信号。每个样品均设置相应未经逆转录的模板作为阴性对照,同时每个样品均设置相应的内参作为对照,得到各自的荧光阈值循环数(Ct 值),采用相对定量法 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行计算。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	片段大小 Product size/bp	退火温度 Dissolution temperature/℃
闭合蛋白 Occludin	F: ATGCTTTCTCAGCCAGCGTA R: AAGGTTCCATAGCCTCGGTC	176	62
封闭蛋白 1 Claudin-1	F: AGATTTACTCCTACGCTGGTGAC R: GCAAAGTGGTGTTTCAGATTCAG	141	62
紧密连接蛋白 1 ZO-1	F: GAGGATGGTCACACCGTGGT R: GGAGGATGCTGTTGTCTCGG	169	62
肿瘤坏死因子-α TNF-α	F: GCATGGTGGTGGTTGTTTCTGACGAT R: GCTTCTGTTGGACACCTGGAGACA	99	62
白细胞介素-8 IL-8	F: ACTGGCTGTTGCCTTCTT R: CAGTTCTCTCAAAAATATCTG	278	62
Toll 样受体 2 TLR2	F: TCATCTCCAAATCTGCGAAT R: GGCTGATGTCTGAATTGACCTC	167	62
Toll 样受体 4 TLR4	F: CCGTCATTAGTGCCTCAGTTCT R: TTGCAGCCCACAAAAGCA	100	62

续表 2

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	片段大小 Product size/bp	退火温度 Dissolution temperature/°C
髓样分化因子 88 <i>MyD88</i>	F:GTGCCGTCGGATGGTAGT R:CAGTGATGAACCGCAGGAT	173	62
B 细胞淋巴瘤蛋白 3 <i>Bcl3</i>	F:CGACGCGGTGGACATTAAG R:ACCATGCTAAGGCTGTTGTTTC	73	62
Toll 作用蛋白 <i>Tollip</i>	F:TACCGTGGGCCGTCTCA R:CCGTAGTTCTTCGCCAATTG	57	62
磷酸甘油醛脱氢酶 <i>GAPDH</i>	F:GAAGGTCGGAGTGAACGGAT R:CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	150	62

#### 1.4 数据统计

以每头猪为单位进行统计,用 Excel 2007 对试验数据进行初步处理;采用 SAS 9.2 统计软件中的 GLM 模型,按照 2×2 因子处理,进行方差分析和多重比较,结果以平均值和均值标准误表示, $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 丁酸梭菌对 2 种仔猪血常规指标的影响

由表 3 可知,二元杂交猪对照组 (A 组) 和三

元杂交猪对照组 (C 组) 相比,白细胞数目、红细胞数目、血红蛋白含量和血小板数目无显著差异 ( $P > 0.05$ )。分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组 (B 组) 和三元杂交猪试验组 (D 组) 的白细胞数目、红细胞数目、血红蛋白含量和血小板数目均属于参考范围内正常数值,其中白细胞数目、红细胞数目和血红蛋白含量差异不显著 ( $P > 0.05$ ),血小板数目均显著增加 ( $P < 0.05$ );二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比,白细胞数目、红细胞数目、血红蛋白含量和血小板数目无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 丁酸梭菌对 2 种仔猪血常规指标的影响

Table 3 Effects of *Clostridium butyricum* on blood routine indices in two breeds of piglets

项目 Items	组别 Groups				参考范围 Reference range	SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D			品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
白细胞数目 WBC/(×10 <sup>9</sup> /L)	17.75	16.32	17.03	15.75	11.0~22.0	1.65	NS	NS	NS
红细胞数目 RBC/(×10 <sup>12</sup> /L)	6.89	6.43	6.78	6.31	5.0~9.5	0.32	NS	NS	NS
血红蛋白 HGB/(g/L)	124.50	111.90	121.30	107.70	99~165	5.26	NS	NS	NS
血小板数目 PLT/(×10 <sup>9</sup> /L)	388.60 <sup>a</sup>	679.10 <sup>b</sup>	381.70 <sup>a</sup>	657.80 <sup>b</sup>	200~700	11.70	NS	<0.05	NS

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

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

### 2.2 丁酸梭菌对 2 种仔猪肠道发育的影响

丁酸梭菌对二元杂交猪和三元杂交猪空肠和

回肠形态结构的影响见表 4。由表可知,二元杂交猪对照组与三元杂交猪对照组相比,仔猪空肠绒

毛高度、隐窝深度和绒毛高度/隐窝深度均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 分别与相应的对照组相比, 二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组仔猪空肠绒毛高度显著升高 ( $P<0.05$ ), 隐窝深度差异不显著 ( $P>0.05$ ), 绒毛高度/隐窝深度显著升高 ( $P<0.05$ ); 二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比, 仔猪空肠隐窝深度显著降低 ( $P<0.05$ ), 而绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度则差异不显著 ( $P>0.05$ )。

二元杂交猪对照组与三元杂交猪对照组相比, 仔猪回肠绒毛高度、隐窝深度和绒毛高度/隐

窝深度均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 分别与相应的对照组相比, 二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组仔猪回肠绒毛高度显著升高 ( $P<0.05$ ), 隐窝深度显著降低 ( $P<0.05$ ), 绒毛高度/隐窝深度显著升高 ( $P<0.05$ ); 二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比, 仔猪回肠绒毛高度、隐窝深度和绒毛高度/隐窝深度均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

从试验结果可知, 饲料添加丁酸梭菌对仔猪小肠形态发育有促进作用。

表 4 丁酸梭菌对 2 种仔猪空肠和回肠形态结构的影响

Table 4 Effects of *Clostridium butyricum* on morphological structures of jejunum and ileum in two breeds of piglets

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D		品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
空肠 Jejunum								
绒毛高度 VH/ $\mu\text{m}$	328.90 <sup>a</sup>	349.10 <sup>bc</sup>	337.70 <sup>ab</sup>	360.20 <sup>c</sup>	5.42	NS	<0.05	NS
隐窝深度 CD/ $\mu\text{m}$	133.20 <sup>ab</sup>	130.20 <sup>a</sup>	137.80 <sup>b</sup>	137.90 <sup>b</sup>	2.78	<0.05	NS	NS
绒毛高度/隐窝深度 V/C	2.47 <sup>a</sup>	2.68 <sup>b</sup>	2.45 <sup>a</sup>	2.61 <sup>b</sup>	0.04	NS	<0.05	NS
回肠 Ileum								
绒毛高度 VH/ $\mu\text{m}$	342.10 <sup>a</sup>	361.20 <sup>b</sup>	341.70 <sup>a</sup>	360.50 <sup>b</sup>	5.58	NS	<0.05	NS
隐窝深度 CD/ $\mu\text{m}$	139.30 <sup>bc</sup>	129.10 <sup>a</sup>	140.10 <sup>c</sup>	131.50 <sup>ab</sup>	3.57	NS	<0.05	NS
绒毛高度/隐窝深度 V/C	2.46 <sup>a</sup>	2.80 <sup>b</sup>	2.44 <sup>a</sup>	2.74 <sup>b</sup>	0.06	NS	<0.05	NS

### 2.3 丁酸梭菌对 2 种仔猪肠道通透性的影响

丁酸梭菌对 2 种仔猪血清 D-乳酸含量和 DAO 活性的影响见表 5。由表可知, 二元杂交猪对照组与三元杂交猪对照组相比, 仔猪血清 D-乳酸含量和 DAO 活性均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 分别与相应的对照组相比, 二元杂交猪试验组和三元

元杂交猪试验组仔猪血清 D-乳酸含量均显著下降 ( $P<0.05$ ), 血清 DAO 活性均降低, 但差异并不显著 ( $P>0.05$ ); 二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比, 仔猪血清 D-乳酸含量和 DAO 活性均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 5 丁酸梭菌对 2 种仔猪血清 D-乳酸含量和 DAO 活性的影响

Table 5 Effects of *Clostridium butyricum* on serum D-lactic acid content and DAO activity in two breeds of piglets

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D		品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
D-乳酸 D-lactic acid/(mmol/L)	2.30 <sup>a</sup>	1.85 <sup>b</sup>	2.25 <sup>a</sup>	1.70 <sup>b</sup>	0.09	NS	<0.05	NS
二胺氧化酶 DAO/(U/L)	4.03	3.61	3.91	3.82	0.25	NS	NS	NS

## 2.4 丁酸梭菌对2种仔猪肠道紧密连接蛋白表达的影响

丁酸梭菌对2种仔猪肠道紧密连接蛋白表达的影响见表6。由表可知,二元杂交猪对照组与三元杂交猪对照组相比,仔猪空肠 claudin-1、ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平均无显著差异 ( $P>0.05$ )。分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪空肠 claudin-1 mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ ),空肠 ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平虽有提高,但差异不显著 ( $P>0.05$ );三元杂交猪试验组仔猪空肠 ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.03$ ),空肠 claudin-1 mRNA 相对表达水平虽有提高,但无显著差异 ( $P>$

0.05)。二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比,仔猪空肠 claudin-1 mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ ),空肠 ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪回肠 claudin-1、ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平均显著提高 ( $P<0.05$ ),三元杂交猪试验组仔猪回肠 claudin-1、ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平虽有提高,但差异不显著 ( $P>0.05$ );二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比,仔猪回肠 claudin-1、ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平均显著提高 ( $P<0.05$ )。

表6 丁酸梭菌对2种仔猪肠道紧密连接蛋白表达的影响

Table 6 Effects of *Clostridium butyricum* on intestinal tight junction protein expression in two breeds of piglets

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D		品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
空肠 Jejunum								
封闭蛋白 1 Claudin-1	0.99 <sup>a</sup>	2.16 <sup>b</sup>	1.01 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>	0.18	<0.05	<0.05	<0.05
紧密连接蛋白 1 ZO-1	1.00 <sup>a</sup>	1.41 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>a</sup>	1.62 <sup>b</sup>	0.21	NS	<0.05	NS
闭合蛋白 Occludin	0.99 <sup>a</sup>	1.38 <sup>ab</sup>	0.98 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>	0.22	NS	<0.05	NS
回肠 Ileum								
封闭蛋白 1 Claudin-1	1.00 <sup>ab</sup>	2.69 <sup>c</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.13 <sup>b</sup>	0.15	<0.05	<0.05	<0.05
紧密连接蛋白 1 ZO-1	1.00 <sup>ab</sup>	1.76 <sup>c</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.08 <sup>b</sup>	0.14	<0.05	<0.05	<0.05
闭合蛋白 Occludin	1.00 <sup>ab</sup>	3.28 <sup>c</sup>	0.99 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	0.22	<0.05	<0.05	<0.05

## 2.5 丁酸梭菌对2种仔猪血清促炎性细胞因子含量的影响

丁酸梭菌对2种仔猪血清促炎性细胞因子含量的影响见表7。由表可知,二元杂交猪对照组和三元杂交猪对照组相比,仔猪血清中促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-8 的含量无显著差异 ( $P>0.05$ )。

分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组仔猪血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-8 的含量虽均提高,但差异均不显著 ( $P>0.05$ );二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组仔猪血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-8 的含量也差异不显著 ( $P>0.05$ )。

表7 丁酸梭菌对2种仔猪血清促炎性细胞因子含量的影响

Table 7 Effects of *Clostridium butyricum* on serum pro-inflammatory cytokine content in two breeds of piglets ng/L

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D		品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$	23.62	24.13	26.75	29.02	3.89	NS	NS	NS
白细胞介素-8 IL-8	17.08	17.52	25.31	28.89	5.20	NS	NS	NS

## 2.6 丁酸梭菌对 2 种仔猪小肠 Toll 样受体免疫信号通路相关因子表达的影响

丁酸梭菌对 2 种仔猪小肠 Toll 样受体免疫信号通路相关因子表达的影响见表 8。由表可知,二元杂交猪对照组和三元杂交猪对照组相比,仔猪空肠和回肠黏膜中 *TLR2*、*TLR4*、*MyD88*、*Tollip* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平无显著差异 ( $P>0.05$ ); 各组空肠和回肠黏膜中 *TNF- $\alpha$*  和 *IL-8* mRNA 相对表达水平差异不显著 ( $P>0.05$ ), 与血清含量的研究结果趋势一致。分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪空肠黏膜中 *TLR2*、*TLR4* 和 *MyD88* mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ ), 空肠黏膜中 *Tollip* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平虽有提高,但无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 三元杂交猪试验组仔猪空肠黏膜中 *TLR2* mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ ), 空肠黏膜中 *TLR4*、*MyD88* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平虽有提高,但无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 同时空肠黏膜中 *Tollip* mRNA 相对表达水平虽有降低,但无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组相比,仔

猪空肠黏膜中 *TLR4* 和 *MyD88* mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ )。

分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪回肠黏膜中 *TLR2*、*TLR4* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平显著提高 ( $P<0.05$ ), 回肠黏膜中 *MyD88* 和 *Tollip* mRNA 相对表达水平虽有提高,但差异不显著 ( $P>0.05$ ); 三元杂交猪试验组仔猪回肠黏膜中 *TLR2*、*TLR4*、*MyD88*、*Tollip* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平均显著提高 ( $P<0.05$ )。二元杂交猪试验组与三元杂交猪试验组相比,仔猪回肠黏膜中 *TLR2*、*TLR4*、*Tollip* 和 *Bcl3* mRNA 相对表达水平显著降低 ( $P<0.05$ )。

因此,饲料添加丁酸梭菌可以提高二元杂交猪和三元杂交猪小肠中 *TLR2/4* 信号通路上相关蛋白的 mRNA 相对表达水平,但是对二元杂交猪和三元杂交猪肠道中 Toll 样受体免疫信号通路的调控强度存在差异,其中空肠中对二元杂交猪的调控程度较强,回肠中对三元杂交猪的调控程度较强。

表 8 丁酸梭菌对 2 种仔猪小肠 Toll 样受体免疫信号通路相关因子表达的影响

Table 8 Effects of *Clostridium butyricum* on expression of cytokines related to small intestinal Toll-like receptor immune signaling pathway in two breeds of piglets

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value		
	A	B	C	D		品种 Breed	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	品种×丁酸梭菌 Breed× <i>Clostridium butyricum</i>
空肠 Jejunum								
肿瘤坏死因子- $\alpha$ <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	0.98	1.08	1.01	1.21	0.11	NS	NS	NS
白细胞介素-8 <i>IL-8</i>	0.99	1.08	1.05	1.19	0.11	NS	NS	NS
Toll 样受体 2 <i>TLR2</i>	1.00 <sup>a</sup>	1.86 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.62 <sup>b</sup>	0.26	NS	<0.05	NS
Toll 样受体 <i>TLR4</i>	1.01 <sup>a</sup>	2.13 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	0.15	<0.05	<0.05	<0.05
髓样分化因子 88 <i>MyD88</i>	1.00 <sup>a</sup>	2.41 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	0.18	<0.05	<0.05	<0.05
Toll 作用蛋白 <i>Tollip</i>	1.00	1.13	1.00	0.91	0.11	NS	NS	NS
B 细胞淋巴瘤蛋白 3 <i>Bcl3</i>	1.00	1.42	1.01	1.19	0.13	NS	NS	NS
回肠 Ileum								
肿瘤坏死因子- $\alpha$ <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	1.00	1.23	1.02	1.09	0.11	NS	NS	NS
白细胞介素-8 <i>IL-8</i>	0.98	1.22	1.00	1.19	0.11	NS	NS	NS
Toll 样受体 2 <i>TLR2</i>	0.99 <sup>a</sup>	1.81 <sup>b</sup>	1.03 <sup>a</sup>	4.46 <sup>c</sup>	0.25	<0.05	<0.05	<0.05
Toll 样受体 <i>TLR4</i>	0.97 <sup>a</sup>	1.78 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	6.55 <sup>c</sup>	0.27	<0.05	<0.05	<0.05
髓样分化因子 88 <i>MyD88</i>	1.00 <sup>a</sup>	1.21 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.50 <sup>b</sup>	0.16	NS	<0.05	NS
Toll 作用蛋白 <i>Tollip</i>	1.00 <sup>a</sup>	1.23 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	2.95 <sup>b</sup>	0.20	<0.05	<0.05	<0.05
B 细胞淋巴瘤蛋白 3 <i>Bcl3</i>	0.99 <sup>a</sup>	1.86 <sup>b</sup>	1.02 <sup>a</sup>	3.92 <sup>c</sup>	0.32	<0.05	<0.05	<0.05

### 3 讨论

#### 3.1 丁酸梭菌对2种仔猪血常规指标的影响

白细胞是机体防御系统的重要组成部分之一,具有吞噬病原体、防御疾病等作用<sup>[10]</sup>。红细胞广泛参与机体内特异性和非特异性免疫反应,具有识别、黏附、浓缩抗原、消除循环免疫复合物等能力,并且还参与机体的免疫调控等。血红蛋白不仅具有运载氧气的功能,还具有氧化酶活性、过氧化物酶活性和抗菌等功能。血小板具有聚集和黏附作用,参与机体的凝血和止血过程,在免疫系统也具有重要作用<sup>[11]</sup>。从2种仔猪试验结果可知,饲料添加丁酸梭菌对2种仔猪的白细胞数目、红细胞数目及血红蛋白含量影响不显著,血小板数目显著增多,没有对仔猪造成不良影响,仔猪处于健康状态。

#### 3.2 丁酸梭菌对2种仔猪肠道发育的影响

猪的肠道形态尤其是绒毛长度和隐窝深度,是影响猪肠道健康的重要指标。绒毛边缘可分泌多种消化酶,因此,绒毛越长,动物的消化吸收能力越强。隐窝深度决定肠绒毛有丝分裂生成上皮细胞的速度,反映细胞生成率,而隐窝变浅,表明细胞成熟率提高,分泌功能增强。因此,绒毛高度/隐窝深度可综合反映小肠消化吸收功能状况。绒毛高度/隐窝深度下降,黏膜很可能受损,消化吸收能力下降,常会伴随有腹泻、生长受阻现象;而绒毛高度/隐窝深度提高,肠道上皮细胞数量增加,肠道吸收面积增大,进而提高营养物质的吸收利用率,同时也有利于功能性物质的合成。有研究表明,断奶仔猪饲料中添加丁酸梭菌,其十二指肠和回肠的绒毛高度显著高于对照组,且隐窝深度显著小于对照组<sup>[12]</sup>。饲喂仔猪添加植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的饲料,能够显著提高小肠绒毛高度、降低隐窝深度,改善致病性大肠杆菌对小肠绒毛高度和隐窝深度造成的影响,降低仔猪腹泻率<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,二元杂交猪试验组和三元杂交猪试验组仔猪空肠和回肠绒毛高度/隐窝深度较相应对照组均显著提高,因此,丁酸梭菌对2种猪空肠的肠道发育有促进作用,这与前人研究结果<sup>[1,12]</sup>相似。但是丁酸梭菌对二元杂交猪和三元杂交猪肠道绒毛高度/隐窝深度的影响差异不显著。试验结果表明,丁酸梭菌能够促进2种遗传背景仔猪的肠道发育,改善肠绒毛

形态,提高肠上皮屏障功能,具有促进仔猪肠道消化吸收营养物质的潜能。

#### 3.3 丁酸梭菌对2种仔猪肠道通透性的影响

肠道形态结构的完整性是肠道发挥一切正常功能的基础。当肠道黏膜受损时,通透性增加,肠道屏障被破坏,导致肠源性感染疾病的发生。肠道多种细菌可以产生D-乳酸代谢产物,当肠黏膜通透性增加时,肠道中细菌产生的大量D-乳酸通过受损黏膜进入血液,使血清D-乳酸含量升高。DAO是动物小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶,其活性与黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关,能够反映肠道机械屏障的完整性和受损程度。因此,血清中的D-乳酸含量和DAO活性可反映上皮细胞黏膜的受损程度,通常作为检测肠道通透性变化的内源指标<sup>[14]</sup>。有研究表明,饲料添加丁酸梭菌ZJU-F1复合菌,对断奶仔猪血清中D-乳酸含量和DAO活性均有不同程度的降低<sup>[1]</sup>。本研究结果表明,二元杂交猪与三元杂交猪之间的血清D-乳酸含量和DAO活性没有显著差异;比较2种猪各自的试验组和对照组,试验组D-乳酸含量较对照组均显著下降,DAO活性虽有下降,但差异不显著,与上述前人研究结果相似。因此,丁酸梭菌能够降低肠黏膜通透性,并且在降低不同遗传背景仔猪肠黏膜通透性方面有所差异,但是并不显著。

#### 3.4 丁酸梭菌对2种仔猪肠道紧密连接蛋白表达的影响

肠道屏障是由单层肠上皮细胞通过紧密连接蛋白结合形成的,具有防止有害微生物、抗原和毒素从肠腔进入血液的功能。肠上皮细胞间的紧密连接是参与控制细胞旁渗透的关键分子,在调节肠道屏障的通透性、维持上皮结构的完整性中发挥重要作用。紧密连接由多个蛋白组成,其中claudin、ZO和occludin是最为重要的紧密连接蛋白;occludin的功能是进入紧密连接,降低与其连接的膜的通透性,有效过滤小分子和大分子;claudin是继occludin之后发现的参与紧密连接的四次跨膜蛋白,发挥调节细胞连接和黏附的作用<sup>[2,15]</sup>。ZO是一类外周膜蛋白,包括ZO-1、ZO-2和ZO-3,它们共同参与内皮细胞和上皮细胞的紧密连接,经细胞骨架影响细胞形态和信号传递。因此,检测claudin、ZO和occludin的mRNA表达量变化是研究肠道屏障功能完整性的重要指标<sup>[2-3]</sup>。丁酸



梭菌能够促进肠道内有益菌群的增殖和肠道健康发育,通过细胞紧密接触抑制有害菌毒性蛋白的表达,降低病原体的入侵和定植<sup>[16]</sup>。研究表明,一些益生菌可以调节紧密连接蛋白的表达,预防或逆转一些病原体给机体造成的肠道损伤<sup>[17]</sup>。饲喂仔猪添加鼠李糖乳酸菌(*Lactobacillus rhamnosus*)的饲料,提高了空肠黏膜中 ZO-1 和 occludin mRNA 相对表达水平,改善了肠道通透性,缓解了轮状病毒对仔猪造成的肠道损伤<sup>[18]</sup>。罗伊氏乳酸菌(*Lactobacillus reuteri*)能够增加新生仔猪肠上皮中 claudin-1、ZO-1 和 occludin 的表达,还可以扭转由脂多糖引起的猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)屏障功能损伤<sup>[19]</sup>。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)能够扭转大肠杆菌 K88 引起的 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白表达下调,改善上皮屏障功能<sup>[20]</sup>。我们前期研究中也发现,丁酸梭菌能够提高断奶仔猪紧密连接蛋白的表达,进而提高肠道屏障功能<sup>[3]</sup>。本研究中,饲料添加丁酸梭菌对 2 种遗传背景仔猪空肠和回肠的 claudin-1、ZO-1 和 occludin 的 mRNA 相对表达水平或有显著提高,或有一定程度提高,这与上述前人研究结果相似,因此丁酸梭菌可提高肠道上皮中紧密连接相关蛋白的表达,有利于机体发挥肠道屏障功能。丁酸梭菌对 2 种遗传背景仔猪肠道功能调节的差异主要表现在回肠紧密连接蛋白表达量上,二元杂交猪回肠中紧密连接蛋白表达水平显著高于三元杂交猪,因此,丁酸梭菌调节 2 种遗传背景仔猪肠道屏障功能的差异主要表现在回肠中,这为后续研究丁酸梭菌调节 2 种背景猪肠道屏障功能的差异提供了基础数据。

### 3.5 丁酸梭菌对 2 种仔猪小肠 Toll 样受体免疫信号通路相关因子表达的影响

丁酸梭菌既有直接的营养功能,又能刺激动物肠黏膜免疫反应<sup>[2]</sup>。Toll 样受体属于模式识别受体,TLR2 和 TLR4 是 Toll 样受体的 2 个受体,分布在细胞膜上,参与机体免疫应答。在介导机体肠黏膜免疫反应中,固有免疫反应的主要途径是 MyD88 依赖型信号通路。MyD88 为 Toll 样受体的下游接头蛋白,活化免疫反应触发核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),调控促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-8 等基因的转录和表达,调节肠道结构和功能<sup>[21-22]</sup>。这些炎性细胞因子还可与肠道微环境中多种细胞分泌的转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )共同作

用,促进免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G 和免疫球蛋白 M 等多种免疫球蛋白的分泌,维护肠道健康。Tollip 和 Bcl3 共同参与负性调控,进而调节促炎性细胞因子的表达。Tollip 是介导固有免疫反应的关键内源性调控因子<sup>[23]</sup>,它对炎症反应的发生具有抑制作用,其表达量下降可能会导致机体发生慢性炎症疾病。Bcl3 与 Tollip 有相似的功能,在 NF- $\kappa$ B 通路中,Bcl3 的正常表达对免疫反应的形成和过度炎症反应的控制也发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。IL-8 是一种炎性趋化因子,表达程度受 NF- $\kappa$ B 调控,与病原等刺激物诱导的紧密连接的改变有关,在肠道的炎症反应中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。适量的 TNF- $\alpha$  对免疫应答起一定的调节作用,具有抗病原体感染,促进损伤组织的修复,引起肿瘤细胞凋亡等作用,过量的 TNF- $\alpha$  能够造成肠组织损伤,破坏机体的免疫平衡。本试验结果显示,2 种仔猪饲料中添加丁酸梭菌能够提高血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-8 的含量及肠黏膜中的表达,但均未达到显著性水平,这可能是由于 NF- $\kappa$ B 被触发,在一定水平上激活了机体的免疫反应。进一步对 TLR2/4 及其通路下游接头蛋白 MyD88 mRNA 相对表达水平进行了测定,结果显示:分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪空肠黏膜中 TLR2、TLR4 和 MyD88 mRNA 相对表达水平量显著提高,空肠黏膜中 Tollip 和 Bcl3 mRNA 相对表达水平差异不显著;三元杂交猪试验组空肠黏膜中 TLR2 mRNA 相对表达水平显著提高,其他指标差异不显著。二元杂交猪试验组仔猪空肠黏膜中 TLR4 和 MyD88 mRNA 相对表达水平显著高于三元杂交猪试验组。分别与相应的对照组相比,二元杂交猪试验组仔猪回肠黏膜中 TLR2、TLR4 和 Bcl3 mRNA 相对表达水平显著提高,回肠黏膜中 MyD88 和 Tollip mRNA 相对表达水平均无显著变化;三元杂交猪试验组仔猪回肠黏膜中 TLR2、TLR4、MyD88、Tollip 和 Bcl3 mRNA 相对表达水平均显著提高。三元杂交猪试验组仔猪回肠黏膜中 TLR2、TLR4、Tollip 和 Bcl3 mRNA 相对表达水平均显著高于二元杂交猪。结果表明,仔猪饲料中添加丁酸梭菌可以激活机体的免疫反应,使机体维持在一个免疫平衡稳定的状态,有助于提高不同遗传背景仔猪对病原菌的识别能力和信号传递能力,提高仔猪免疫力。

## 4 结论

丁酸梭菌能够促进仔猪肠道发育,激活2种遗传背景仔猪肠黏膜TLR2/4信号通路,并促进其通路关键负反馈子的表达,提高紧密连接蛋白的表达,降低肠黏膜通透性,提高肠道屏障功能。其中,在肠上皮细胞间紧密连接方面,丁酸梭菌对二元杂交猪回肠的调控尤为明显;在Toll样受体信号通路关键蛋白方面,丁酸梭菌对二元杂交猪空肠调控程度较强,对三元杂交猪回肠的调控程度较强。

## 参考文献:

- [1] 王腾浩.新型丁酸梭菌筛选及其对断奶仔猪生长性能和肠道功能影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2015.
- [2] LI H H, LI Y P, ZHU Q, et al. Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* helps to improve the intestinal barrier function of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(4): 964-975.
- [3] 李玉鹏,李海花,王柳懿,等.丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、肠道屏障功能和血清细胞因子含量的影响[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(8): 2961-2968.
- [4] 田松军,魏小红,顾丽菊,等.宗地花猪二元和三元杂交猪生产性能的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(2): 63-65.
- [5] FUENTES V, VENTANAS S, VENTANAS J, et al. The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: purebred Iberian versus reciprocal Iberian × Duroc crossbred pigs[J]. *Meat Science*, 2014, 96: 737-743.
- [6] XU X F, XU P P, MA C, et al. Gut microbiota, host health, and polysaccharides [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(2): 318-337.
- [7] 陈秀扬.不同杂交组合的肉猪生产性能及经济效益对比试验[J]. *广西畜牧兽医*, 2014(3): 133-135.
- [8] 孙静泉.杜长大三元杂交猪和长大二元杂交猪生产性能及胴体性状的测定[J]. *当代畜牧*, 2010(7): 42-43.
- [9] LI H H, HANG L, CHEN L B, et al. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- $\kappa$ B and P38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 273.
- [10] 郭军蕊,董晓芳,佟建明.枯草芽孢杆菌联合苜蓿多糖对蛋鸡生产性能、蛋品质、血液指标及粪和肠道微生物区系的影响[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(5): 1687-1703.
- [11] TAMAGAWA-MINEOKA R, KATOH N. Platelets [M]//KABASHIMA K. *Immunology of the skin*. Tokyo: Springer, 2016: 213-226.
- [12] ZONG X, WANG T H, LU Z Q, et al. Effects of *Clostridium butyricum* or in combination with *Bacillus licheniformis* on the growth performance, blood indexes, and intestinal barrier function of weanling piglets [J]. *Livestock Science*, 2019, 220: 137-142.
- [13] YANG K M, JIANG Z Y, ZHENG C T, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(4): 1496-1503.
- [14] ZHAO L, LUO L, JIA W K, et al. Serum diamine oxidase as a hemorrhagic shock biomarker in a rabbit model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102285.
- [15] ROBINSON K, DENG Z, HOU Y Q, et al. Regulation of the intestinal barrier function by host defense peptides [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2015, 2: 57.
- [16] YANG C M, CAO G T, FERKET P R, et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2012, 91(9): 2121-2129.
- [17] ULLUWISHEWA D, ANDERSON R C, MCNABB W C, et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components [J]. *The Journal of Nutrition*, 2011, 141(5): 769-776.
- [18] MAO X B, GU C S, HU H Y, et al. Dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation improves the mucosal barrier function in the intestine of weaned piglets challenged by porcine rotavirus [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146312.
- [19] YANG F J, WANG A N, ZENG X F, et al. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 32.
- [20] WU Y P, ZHU C, CHEN Z, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016, 172: 55-63.

- [21] LI H H, ZHANG L, CHEN L B, et al. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets [J]. BMC Microbiology, 2016, 16:273.
- [22] ENSIGN S P F, ROOS A, MATHEWS I T, et al. SGEF is regulated via TWEAK/Fn14/NF- $\kappa$ B signaling and promotes survival by modulation of the DNA repair response to temozolomide [J]. Molecular Cancer Research, 2016, 14(3):302-312.
- [23] HUMBERT-CLAUDE M, DUC D, DWIR D, et al. Tollip, an early regulator of the acute inflammatory response in the substantia nigra [J]. Journal of Neuroinflammation, 2016, 13:303.
- [24] POVEDA J, SANZ A B, CARRASCO S, et al. Bcl3: a regulator of NF- $\kappa$ B inducible by TWEAK in acute kidney injury with anti-inflammatory and antiapoptotic properties in tubular cells [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2017, 49(7):e352.
- [25] ROSTAMI K, NEJAD M R, ASADZADEH H, et al. PTU-199 proinflammatory cytokine (IL-8) in microscopic enteritis [J]. Gut, 2013, 62(Suppl.1):A130.

## Effects of *Clostridium butyricum* on Intestinal Barrier Function of Piglets with Two Genetic Backgrounds and Its Molecular Mechanism

LI Haihua<sup>1</sup> LI Yupeng<sup>2\*</sup> WANG Liuyi<sup>3</sup> WANG Wenjie<sup>2</sup> QIAO Jiayun<sup>3\*\*</sup>

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Tianjin 300381, China; 3. Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract:** This study was aimed to investigate the effects of *Clostridium butyricum* on the health status, intestinal development, intestinal barrier function, serum cytokine contents and mucosal immunity key protein expression of weaned piglets with two genetic backgrounds. A 2×2 factors design was used in this experiment, 12 “Northeastern indigenous×Berkshire” black piglets with similar body weight and (21±2) days of age were selected and divided into 2 groups (control group and experimental group), randomly, and 12 “Duroc×Landrace×Yorkshire” white piglets with similar body weight and (21±2) days of age were selected and divided into 2 groups (control group and experimental group), randomly. Each group was divided into 6 replicates and each pig was fed in single column. Weaned piglets in control groups were fed basal diets, and those in experimental groups were fed the basal diets supplemented with 5×10<sup>11</sup> CFU/kg *Clostridium butyricum* preparation for 14 days after 3 days adaption. The results showed as follows: 1) compared with the each control group, the platelet counts of piglets in the two experimental groups were both increased significantly ( $P<0.05$ ), the villus length to crypt depth ratios in both jejunum and ileum of the two kinds of piglets were increased significantly ( $P<0.05$ ), the serum D-lactic contents of the two kinds of weaned piglets were decreased significantly ( $P<0.05$ ), the claudin-1 mRNA relative expression level in jejunum, and the mRNA relative expression levels of claudin-1, zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin in ileum of piglets in binary hybridization experimental group were all increased significantly ( $P<0.05$ ), the mRNA relative expression levels of ZO-1 and occludin in jejunum of piglets in ternary hybridization experimental group were both increased significantly ( $P<0.05$ ), the mRNA relative expression levels of Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in jejunum mucosa and TLR2, TLR4 and B-cell lymphoma 3 protein (Bcl3) in ileum mucosa of piglets in binary hybridization experimental group were increased significantly ( $P<0.05$ ),

\* Contributed equally

\*\* Corresponding author, professor, E-mail: qiaojy1979@126.com

and the mRNA relative expression levels of *TLR2* in jejunum mucosa and *TLR2*, *TLR4*, *MyD88*, Toll-interacting protein (*Tollip*) and *Bcl3* in ileum mucosa of piglets in ternary hybridization experimental group were increased significantly ( $P < 0.05$ ). 2) Compared with the ternary hybridization experimental group, the mRNA relative expression levels of claudin-1, *TLR4* and *MyD88* in jejunum and claudin-1, *ZO-1* and occludin in ileum of piglets in binary hybridization experimental group were increased significantly ( $P < 0.05$ ), but the mRNA relative expression levels of *TLR2*, *TLR4*, *Tollip* and *Bcl3* in ileum mucosa of piglets in binary across experimental group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). In conclusion, *Clostridium butyricum* can improve intestinal development of piglets, activate TLR2/4 signaling pathway in intestinal mucosa of two genetic background piglets, promote the expression of key negative feedback factors in the pathway, increase the expression of tight junction proteins, decrease the intestinal mucosal permeability, improve intestinal barrier function, and there are certain differences in the regulation of intestinal barrier function of the two genetic background weaned piglets. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(10):4647-4658 ]

**Key words:** *Clostridium butyricum*; binary hybridization; ternary hybridization; weaned piglets; Toll-like receptor 2; Toll-like receptor 4