

包膜丁酸钠对脂多糖刺激下断奶羔羊血清炎性细胞因子、肠道通透性及肠道组织形态的影响

王可鑫 左丽君 陈 想 姜 宁 潘春媛 李凌岩 张爱忠*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院,黑龙江省寒区饲料资源高效利用与营养调控重点实验室,大庆 163319)

摘要: 本试验旨在研究包膜丁酸钠(CSB)对脂多糖(LPS)刺激下断奶羔羊血清炎性细胞因子、肠道通透性及肠道组织形态的影响。试验选取(42±1)日龄、平均体重为(11.79±0.54) kg的断奶羔羊24只,按体重相近原则随机分为4组:空白组(CON组)、LPS组、CSB2L组、CSB3L组,其中CON和LPS组饲喂基础饲料,CSB2L和CSB3L组在基础饲料中分别添加2和3 g/kg CSB,每组6个重复,每个重复1只羊。在试验第28天每组选取3只羔羊进行屠宰,LPS、CSB2L和CSB3L组在屠宰前3 h腹腔注射100 μg/kg BW LPS,CON组腹腔注射等量无菌生理盐水。结果表明:1)与CON组相比,饲料中添加CSB可显著提高断奶羔羊的平均日采食量(ADFI)($P<0.05$),CSB3L组的平均日增重(ADG)显著高于CON和LPS组($P<0.05$)。2)与CON组相比,LPS组断奶羔羊血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-8(IL-8)含量显著升高($P<0.05$)。CSB2L和CSB3L组血清TNF- α 和IL-1 β 含量均低于LPS组($P<0.05$),血清TNF- α 含量显著高于CON组($P<0.05$)。CSB3L组血清IL-8含量显著低于LPS组($P<0.05$)。CSB2L和CSB3L组血清白细胞介素-10(IL-10)含量显著高于LPS组($P<0.05$)。3)断奶羔羊血清中D-乳酸(DLA)含量和二胺氧化酶(DAO)活性在LPS刺激下显著升高($P<0.05$)。CSB2L和CSB3L组可显著降低LPS注射后的血清DLA含量和DAO活性($P<0.05$)。4)CON组肠黏膜形态结构完整且绒毛排列整齐。注射LPS后,空肠和回肠绒毛排列紊乱,高矮不一,绒毛肿胀脱落。CSB2L和CSB3L组空肠和回肠绒毛形态较完整且排列整齐,肿胀程度降低,上皮轻度脱落。LPS组盲肠部分肠绒毛上皮脱落,腺体排列紊乱,结肠绒毛略微脱落。CSB2L组盲肠和结肠有轻微水肿,CSB3L组盲肠和结肠绒毛上皮未见明显脱落和水肿。LPS刺激显著降低了空肠和回肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度($P<0.05$)。CSB2L和CSB3L组空肠和回肠绒毛高度降低和绒毛高度/隐窝深度降低均得到缓解。CSB2L和CSB3L组十二指肠绒毛高度显著高于CON和LPS组($P<0.05$),CSB3L组回肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度显著高于CON组($P<0.05$)。由此可见,饲料中添加CSB可以提高断奶羔羊的生长性能并能缓解LPS刺激引起的断奶羔羊应激,抑制血清促炎性细胞因子水平升高和肠道通透性增加,从而在一定程度上改善肠道组织形态,维护肠道健康。

关键词: 包膜丁酸钠;断奶羔羊;脂多糖;肠道健康

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)02-0954-11

收稿日期:2020-07-15

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C053)

作者简介:王可鑫(1995—),女,黑龙江鹤岗人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养。E-mail: awkx5527@163.com

* 通信作者:张爱忠,教授,博士生导师,E-mail: aizhzhang@sina.com

近年来,舍饲养羊逐步走向现代集约化的道路。在现代化养羊生产中,由于早期断奶、饲养环境及疾病等原因,羔羊易受细菌、病毒等病原体及脂多糖(LPS)等非病原体的侵袭,激发羔羊产生免疫应激导致肠黏膜形态结构发生改变、肠道黏膜屏障功能受到破坏,从而引起消化功能紊乱、生长迟滞、腹泻等问题,给动物生产带来重大经济损失^[1-2]。添加饲用抗生素及改善畜舍环境等方法成为缓解免疫应激的主要措施。全球约73%的抗生素是用于动物疾病的预防和治疗,但长期饲喂抗生素易引发细菌耐药性且抗生素滥用会损伤机体胃肠道屏障功能,破坏菌群结构,导致肠道稳态失衡^[3]。

肠道健康发育是保障动物生长及发挥潜在生产性能的关键。肠道微生物在机体营养物质消化和肠道健康方面扮演着十分重要的角色。肠道微生物代谢产物短链脂肪酸主要包括乙酸、丙酸和丁酸。丁酸钠(SB)在动物胃肠道内水解形成丁酸,不仅是宿主肠上皮细胞的首选能量代谢原料和细胞增殖分化的主要调控因子,而且还具有抗炎、抗肿瘤、调控基因表达、调节肠道菌群平衡、改善肠道功能等重要作用;在临床上,丁酸也被认为是治疗肠炎的潜在治疗药物^[4-5]。据报道,在饲料中添加包膜丁酸钠(CSB)不仅可以提高反刍动物的生长性能^[6],还可以促进肠道发育并改善肠道菌群的丰度^[7]。有研究表明,CSB的添加可降低哺乳犊牛腹泻,缩短断奶持续时长^[8]。Chang等^[9]在饲料中添加SB可以降低反刍动物体内LPS和促炎性细胞因子的含量,并减弱细胞凋亡途径的活化,从而阻止乳腺细胞凋亡和维持乳腺健康。Górka等^[10]研究发现,饲料中外源SB的添加不仅会影响瘤胃的水解活性,而且对绵羊小肠发育也有积极影响。但是在免疫应激状态下,CSB对羔羊肠道健康的影响还鲜见报道。因此,本研究拟从营养与免疫相结合的角度,探讨CSB对LPS应激羔羊肠道免疫及组织形态的影响,为CSB缓解幼龄反刍动物细菌性疾病感染、维持羔羊肠道稳态、减少或杜绝饲用抗生素的添加提供数据支持,为其缓解羔羊免疫应激提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验所用CSB中的SB含量为30%,由某

进出口有限公司提供;055:B5型大肠杆菌LPS(L2880)购自美国Sigma Chemical公司。

1.2 试验设计

本试验在黑龙江八一农垦大学动物科技学院动物试验中心进行。试验选用(42±1)日龄、平均体重为(11.79±0.54)kg的“德国美利奴×杜泊”断奶公羔羊24只,按体重相近原则随机分为4组:空白组(CON组)、LPS组、CSB2L组、CSB3L组,CON和LPS组饲喂基础饲料,CSB2L和CSB3L组在基础饲料中分别添加2和3g/kgCSB,每组6个重复,每个重复1只羊。CON组在屠宰前3h腹腔注射无菌生理盐水,其余各组腹腔注射100μg/kgBW055:B5型LPS。预试期7d,正试期28d。试验期间于每日07:00和17:00饲喂等量的饲料,羔羊自由饮水和采食。试验第28天,从每组中选取3只羔羊进行屠宰。

1.3 试验饲料

为满足断奶羔羊的营养需要,按照《肉羊饲养标准》(NY/T816—2004)配制不含抗生素的基础饲料,其组成及营养水平见表1。

1.4 样品采集

于试验第28天,在羔羊屠宰前进行颈静脉采血,室温下3000r/min离心10min,-80℃保存待测。沿腹部中线快速切开腹腔,用棉线结扎断奶羔羊小肠和大肠交界处。取小肠组织中段,立即用冰磷酸盐缓冲液冲洗3次。将肠道组织保存在4%多聚甲醛中,用于肠道组织形态分析。

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	
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	20.00
玉米蛋白粉 Corn protein meal	9.60
玉米 Corn	32.00
麦麸 Wheat bran	18.00
豆粕 Soybean meal	16.00
石粉 Limestone	1.00
食盐 NaCl	0.40
维生素预混料 Vitamin premix ¹⁾	2.00
微量元素预混料 Trace element premix ²⁾	1.00
合计 Total	100.00

续表 1

项目 Items	含量 Content
营养水平 Nutrient levels ³⁾	
干物质 DM	90.50
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.53
粗蛋白质 CP	19.71
中性洗涤纤维 NDF	30.46
酸性洗涤纤维 ADF	10.48
钙 Ca	0.51
磷 P	0.36

1) 每千克维生素预混料含有 One kilogram of vitamin premix contained as follows: VA 1 000 000 IU, VD₃ 50 000 IU, VE 500 IU, VK₃ 100 mg, VB₁ 100 mg, VB₂ 100 mg, VB₆ 200 mg, VB₁₂ 5 mg。

2) 每千克微量元素预混料含有 One kilogram of trace element premix contained as follows: 烟酸 nicotinic acid 100 mg, 泛酸钙 calcium pantothenate 200 mg, 蛋氨酸 methionine 1 000 mg, 赖氨酸 lysine 5 000 mg, Fe 83 g, Cu 5 g, Zn 65 g, Mn 65 g, I 150 mg, Se 130 mg。

3) 代谢能为计算值,其余为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

1.5 指标测定及方法

1.5.1 生长性能

每天准确称量羔羊的投喂量和剩料量,于试验第 28 天对羔羊进行空腹称重(LPS 刺激前),计算平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG)和料重比(F/G)。计算公式为:

$$ADG = (\text{末重} - \text{始重}) / \text{试验天数};$$

$$ADFI = \text{总采食量} / \text{试验天数};$$

$$F/G = ADFI / ADG。$$

1.5.2 血清促炎性细胞因子

用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定血

清中炎性细胞因子——肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-8 (IL-8)和白细胞介素-10 (IL-10)的含量,试剂盒由艾莱萨生物科技有限公司提供。用 iMark 酶标仪 (Bio-Rad, 美国) 检测在 450 nm 处的吸光度。

1.5.3 肠道通透性

按生产厂家提供的方法,用商品试剂盒(艾莱萨生物科技有限公司)测定血清中 D-乳酸(DLA)含量和二胺氧化酶(DAO)活性。

1.5.4 肠道组织形态

为了确定肠道组织形态,将组织样品脱水并用石蜡包埋,然后切成 6 μm 厚度,并用苏木精和曙红染色。使用光学显微镜系统(Olympus Corporation, 日本)观察组织切片。用 ImagePro plus 6.0 测定肠绒毛高度(绒毛顶端至绒毛与隐窝交界处)和隐窝深度(肠绒毛交界处至肠腺底部的垂直距离),并计算绒毛高度/隐窝深度。

1.6 数据分析

使用 SAS 9.2 软件的 GLM 程序进行单因素方差分析(one-way ANOVA),采用 Duncan 氏法进行多重比较。试验结果均以平均值 \pm 标准误表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 CSB 对断奶羔羊生长性能的影响

由表 2 可知,与 CON 组相比,饲料中添加 CSB 可显著提高断奶羔羊的 ADFI ($P < 0.05$), CSB3L 组 ADG 显著高于 CON 和 LPS 组 ($P < 0.05$), CSB2L 组 ADG 与其他各组无显著差异 ($P > 0.05$)。各组间的 F/G 差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 CSB 对断奶羔羊生长性能的影响

Table 2 Effects of CSB on growth performance of weaned lambs

项目 Items	对照组 CON group	LPS 组 LPS group	CSB2L 组 CSB2L group	CSB3L 组 CSB3L group	SEM	P 值 P-value
始重 IBW/kg	12.48	11.23	12.11	11.34	0.27	0.158
末重 FBW/kg	15.27	14.00	15.40	14.93	0.31	0.251
平均日增重 ADG/g	99.69 ^b	98.81 ^b	117.45 ^{ab}	128.33 ^a	5.46	0.039
平均日采食 ADFI/g	349.77 ^b	350.57 ^b	379.91 ^a	396.42 ^a	7.59	0.002
料重比 F/G	3.53	3.57	3.24	3.13	0.11	0.261

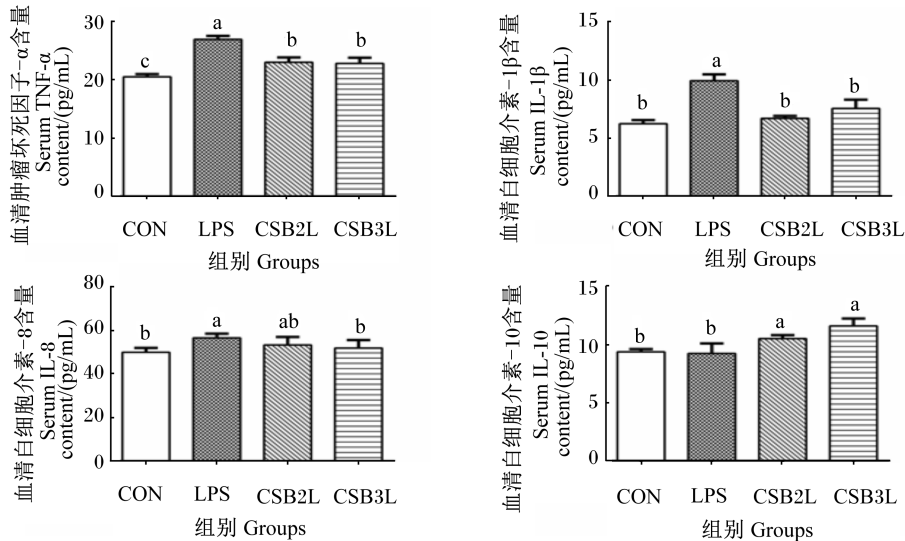
同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊血清炎性细胞因子含量的影响

由图 1 可知,断奶羔羊经 LPS 刺激后,血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量显著升高 ($P<0.05$)。CSB2L 和 CSB3L 组血清 TNF- α 和 IL-1 β 含量均低于 LPS 组 ($P<0.05$),血清 TNF- α 含量显著高于 CON 组 ($P<0.05$)。CSB3L 组血清 IL-8 含量显著

低于 LPS 组 ($P<0.05$),CSB2L 组血清 IL-8 含量与各组差异均不显著 ($P>0.05$)。与 CON 组相比,LPS 组血清中 IL-10 含量无显著差异 ($P>0.05$),CSB2L 和 CSB3L 组血清 IL-10 含量显著高于 LPS 组 ($P<0.05$)。CSB2L 和 CSB3L 组间血清炎性因子含量无显著差异 ($P>0.05$)。



数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。图 2 同。

Value columns with different small letters mean significant difference ($P<0.05$). The same as Fig.2.

图 1 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊血清炎性细胞因子含量的影响

Fig.1 Effects of CSB on serum inflammatory cytokine contents of weaned lambs challenged with LPS

2.3 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊肠道通透性的影响

由图 2 可知,断奶羔羊血清中 DLA 含量和 DAO 活性在 LPS 刺激下显著升高 ($P<0.05$)。饲

粮中添加 2 和 3 g/kg CSB 可显著降低 LPS 注射后断奶羔羊血清 DLA 含量和 DAO 活性 ($P<0.05$)。CSB2L 和 CSB3L 组间断奶羔羊血清 DLA 含量和 DAO 活性差异不显著 ($P>0.05$)。

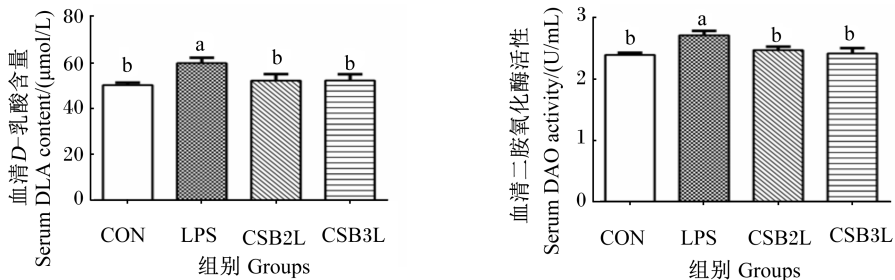


图 2 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊肠道通透性的影响

Fig.2 Effects of CSB on intestinal permeability of weaned lambs challenged with LPS

2.4 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊肠道组织形态的影响

染色观察各组断奶羔羊小肠组织形态

(图 3),CON 组肠黏膜形态结构完整且绒毛排列整齐;注射 LPS 后,十二指肠有轻微水肿,空肠和回肠绒毛排列紊乱,高矮不一,绒毛呈现出变短且

略微肿胀、脱落现象;CSB2L 和 CSB3L 组空肠和回肠绒毛形态较完整且排列整齐,肿胀程度降低,上皮轻度脱落。

盲肠和结肠形态如图 4 所示,CON 组肠组织整体结构正常,肠绒毛排列较整齐。LPS 组盲肠部分肠绒毛上皮脱落,腺体排列紊乱,结肠绒毛略微脱落。CSB2L 组盲肠和结肠有轻微水肿,CSB3L 组盲肠和结肠绒毛上皮未见明显脱落和水肿。

由表 3 可知,与 CON 组相比,LPS 刺激显著降低了空肠和回肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度

($P<0.05$),对十二指肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度无显著影响($P>0.05$),且对小肠各肠段隐窝深度均无显著影响($P>0.05$)。与 CON 组相比,饲料中添加 CSB 后,空肠和回肠绒毛高度降低和绒毛高度/隐窝深度降低均得到缓解($P<0.05$)。CSB2L 和 CSB3L 组十二指肠绒毛高度显著高于 CON 组和 LPS 组($P<0.05$),CSB3L 组回肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度显著高于 CON 组($P<0.05$),而 CSB2L 组回肠绒毛高度、隐窝深度和绒毛高度/隐窝深度与 CON 组均无显著差异($P>0.05$)。

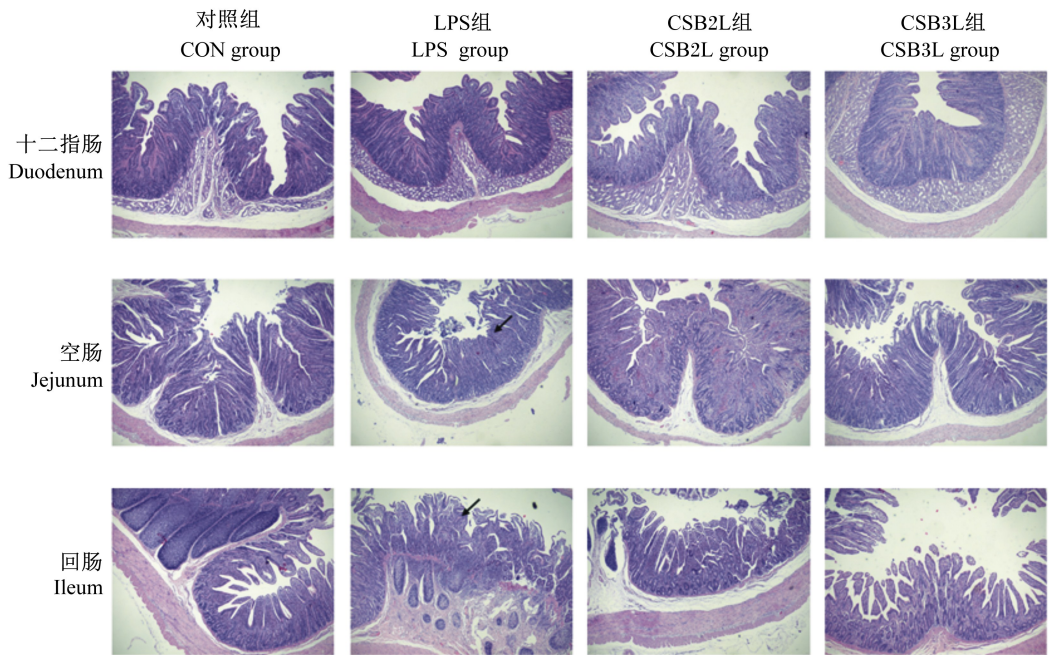


图 3 断奶羔羊小肠组织形态

Fig.3 Small intestinal morphology of weaned lambs (40×)

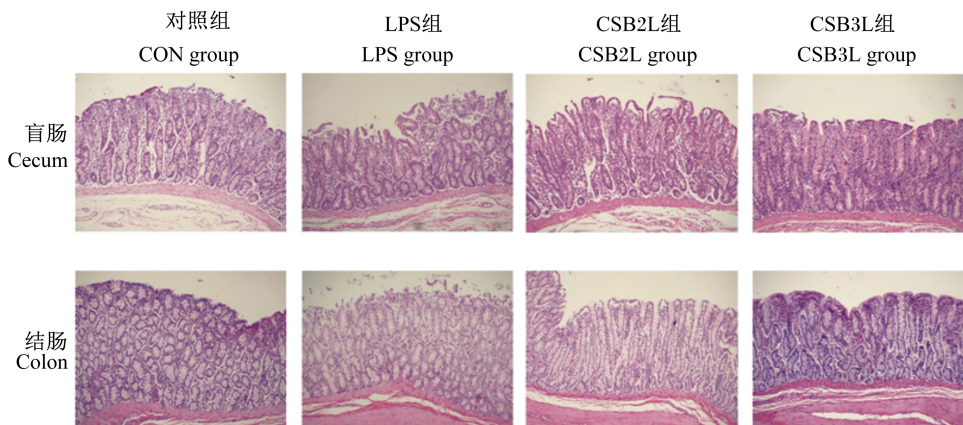


图 4 断奶羔羊盲肠和结肠组织形态

Fig.4 Cecal and colonic morphology of weaned lambs (100×)

表 3 CSB 对 LPS 刺激下断奶羔羊肠道组织形态的影响

Table 3 Effects of CSB on intestinal morphology of weaned lambs challenged with LPS

项目 Items	对照组 CON group	LPS 组 LPS group	CSB2L 组 CSB2L group	CSB3L 组 CSB3L group	SEM	P 值 P-value
十二指肠 Duodenum						
绒毛高度 Villus height/ μm	240.02 ^b	241.89 ^b	272.21 ^a	279.25 ^a	5.63	0.014
隐窝深度 Crypt depth/ μm	79.68	68.63	65.19	69.81	3.81	0.591
绒毛高度/隐窝深度 VH/CD	3.64	3.77	4.21	4.16	0.18	0.633
空肠 Jejunum						
绒毛高度 Villus height/ μm	309.93 ^a	272.49 ^b	325.03 ^a	321.76 ^a	6.93	0.021
隐窝深度 Crypt depth/ μm	75.06	78.42	68.90	67.64	2.23	0.276
绒毛高度/隐窝深度 VH/CD	4.48 ^{ab}	3.54 ^b	4.80 ^a	4.82 ^a	0.19	0.044
回肠 Ileum						
绒毛高度 Villus height/ μm	259.30 ^b	215.19 ^c	290.17 ^{ab}	321.22 ^a	9.42	<0.001
隐窝深度 Crypt depth/ μm	71.54	72.81	66.89	66.72	2.81	0.830
绒毛高度/隐窝深度 VH/CD	3.80 ^b	3.07 ^c	4.45 ^{ab}	4.91 ^a	0.17	<0.001

3 讨论

SB 作为一种饲料添加剂在动物饲料中广泛应用。熊海涛^[11]研究发现,在饲料中添加 2 g/kg 的 SB 可以提高仔猪的 ADG 和 ADFI。邴新帅等^[6]研究也证实,在饲料中添加 0.5% 的 CSB 可以显著提高羔羊的 ADG。本试验研究发现,在饲料中添加 CSB 可显著提高羔羊的 ADFI,且添加 3 g/kg 的 CSB 可显著提高羔羊的 ADG,但对 F/G 无显著影响,这与上述结果基本一致。SB 有一种脂臭味,而 CSB 可以掩盖这种异味并促进动物采食量的增加,进而促进羔羊的生长发育。在转录组学水平上研究发现,丁酸可以促进绵羊小肠葡萄糖摄取和糖酵解途径上调以及线粒体功能相关基因的表达^[12]。丁酸可以促进营养物质在肠道的吸收,进而促进肠道营养物质代谢相关基因的表达,使羔羊的生长性能得到提高。

在本试验中,LPS 注射后,断奶羔羊表现出精神沉郁、站立不稳、腹腔内腹水等情况。LPS 是位于革兰氏阴性菌细胞壁最外层的类脂多糖,可直接或间接诱导细胞凋亡调控机体免疫反应,当机体受到 LPS 等微生物抗原的刺激时会刺激体内巨噬细胞、单核细胞和内皮细胞释放一系列细胞因子、氧自由基和组胺等炎性介质等引起炎症反应,降低屏障功能^[13-14]。经典的 LPS 细胞因子级联系统包括 IL-1 β 和 TNF- α 等,TNF- α 能够激活中性粒细胞和淋巴细胞,是炎症反应过程中出现最早、

最重要的炎性介质,参与核转录因子- κB (NF- κB) 的活化和程序性细胞凋亡过程,且与诱导型一氧化氮合成酶的上调有关,可促进一氧化氮的生成,在机体的免疫应答过程中发挥重要的作用^[15-16]。IL-1 β 可由单核细胞和巨噬细胞释放,在炎症反应过程中 IL-1 β 最初以前体形式产生,响应 Toll 样受体配体,并通过炎性小体成熟进而调控炎症^[17]。IL-8 是一种多细胞来源的细胞因子,在细胞的多种炎症反应中起调节作用^[18]。IL-10 是由巨噬细胞分泌的一种抗炎细胞因子,能够通过阻止 NF- κB 的活化来抑制其他炎性细胞因子的产生^[19]。众多研究表明,SB 能够缓解炎症反应。Zhang 等^[20]研究表明,LPS 应激可显著升高肉鸡血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量,饲料中补充 SB 可抑制血清中 IL-6 和 TNF- α 含量的升高。饲料中补充 SB 可显著降低葡聚糖硫酸钠模型肉鸡血清中 IL-1 β 含量,升高 IL-10 含量^[21]。有研究表明,大肠杆菌攻毒能够显著升高仔猪血清中促炎性细胞因子的水平,饲喂 SB 可以缓解这一现象^[11]。SB 能够抑制 LPS 诱导的炎症反应引起的促炎性细胞因子含量的升高^[22-23]。本试验结果显示,LPS 刺激能使断奶羔羊血清中促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量上升,CSB2L 和 CSB3L 组能抑制血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 含量上升,促进 IL-10 含量升高。这表明饲料中添加 CSB 可缓解 LPS 激发断奶羔羊产生的炎症反应。原因可能是 CSB 水解的丁酸可以通过抑制 LPS 诱导的 NF- κB 通路的活性,进而

抑制促炎性细胞因子的释放缓解炎症反应。

保持肠道的完整性和功能性是维持肠道发挥正常屏障功能的前提,小肠受到损伤会引起肠上皮细胞数量下降,肠道通透性增加。DLA 主要是乳酸杆菌、大肠杆菌等肠道细菌的代谢和裂解产物。由于哺乳动物体内不具有直接分解 DLA 的 D-乳酸脱氢酶,当机体发生严重创伤、感染后引起肠黏膜缺血缺氧时,DLA 可在肠黏膜受损早期透过肠黏膜进入血门静脉循环,引起 DLA 含量上升^[24-25]。DAO 是一种含有脱氨的腐胺和组胺的有较高活性细胞内酶,大约有 95% 存在于哺乳动物小肠黏膜和柱状上皮细胞中,其活性与肠绒毛高度和黏膜细胞内核酸蛋白的合成有关,当肠黏膜屏障受损时,其进入血液和淋巴导致其在血液中的活性升高^[26-28]。因此,检测外周血中 DLA 含量和 DAO 活性可反映肠黏膜损伤、修复和通透性变化情况。有研究表明,适当浓度的丁酸盐能够保护单层细胞不被破坏,改善肠屏障的功能^[29]。Zou 等^[21]研究发现,补充 300 mg/kg SB 可显著降低葡聚糖硫酸钠模型肉鸡血清中 DLA 含量。本试验结果显示,LPS 刺激可以使断奶羔羊血清 DLA 含量和 DAO 活性上升,说明 LPS 刺激破坏了肠道屏障,但饲料中添加 CSB 可以缓解肠道通透性的升高。这可能是由于 SB 可以通过促进小肠黏膜紧密连接蛋白的表达,抑制炎症细胞因子的表达,从而降低对肠道黏膜屏障的损伤。此外,有研究表明,SB 可以通过与细胞表面的 G 蛋白偶联受体结合激活调控免疫反应的信号转导途径维护肠道屏障功能^[30]。本研究表明,CSB 能够降低 LPS 诱导的断奶羔羊血清 TNF- α 和 IL-1 β 的释放,并进一步验证了其可对肠道通透性的改变产生积极影响,然后通过染色从病理形态学角度探讨了 CSB 对肠道形态的改善作用。

有研究表明,在饲料中添加 CSB 可降低坏死性结肠炎模型组肉鸡肠道病变评分,能够减轻肉鸡坏死性肠炎^[31]。Dou 等^[32]研究发现,口服丁酸钠可减轻小鼠结肠炎的严重程度。在本试验中,通过组织切片观察可知 LPS 组回肠和盲肠绒毛脱落、水肿且伴有炎症细胞浸润增加(如图 3 黑色箭头所示)。而 CSB2L 和 CSB3L 组肠绒毛损伤较轻,说明 CSB 能够减轻 LPS 对肠黏膜的刺激,对肠绒毛的完整性起到一定的保护作用,使断奶羔羊在应激情况下能够缓解肠黏膜损伤。但是,从

切片来看 LPS 刺激对回肠损伤更为严重,盲肠和结肠损伤较小。可能是由于 LPS 刺激时间较短或剂量较小。也可能是由于后肠道含有大量微生物,具有更有效的杀灭移位细菌的能力。此外,与小肠相比,结肠具有更高的电阻,对离子被动运动的渗透性较低^[33]。先前有研究表明,一氧化氮合酶的基因表达沿着肠的纵轴存在差异性调节,其中在回肠中最为突出^[34]。有报道表明,回肠对 LPS 更敏感,回肠细菌移位发病的阈值比结肠低^[35-36]。

小肠的绒毛高度、隐窝深度及绒毛高度/隐窝深度是评价动物消化道对养分消化吸收的重要指标。肠绒毛高度越大表明肠上皮细胞发育越好,绒毛高度影响养分吸收能力的强弱,相反,隐窝深度越浅表明肠上皮细胞成熟率越高。绒毛高度/隐窝深度降低表明吸收功能受到损伤,进而导致腹泻的可能性增加^[37]。徐磊^[38]研究发现,内源性 LPS 的产生可导致奶牛瘤胃和盲肠出现炎症损伤,上皮完整性遭到破坏。此外,有研究发现 LPS 刺激会引起肠道损伤,导致小肠绒毛高度下降,隐窝深度变大,二者比值下降^[39-41]。短链脂肪酸已被证明可以为肠上皮细胞提供最直接、最有效的能量物质,促进肠上皮细胞分化和增殖,有效维持肠道形态。邴新帅^[6]研究表明,饲料中添加 0.5% 的 CSB 可以提高断奶羔羊小肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度。Wang 等^[42]研究表明,饲喂 SB 提高了断奶仔猪的空肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度。本试验结果表明,饲喂 CSB 能够抑制 LPS 刺激引起的小肠绒毛高度及绒毛高度/隐窝深度的降低,与上述报道结果相一致。因此,SB 对肠黏膜的免疫屏障的保护作用对于减少机体炎症反应的发生、维护机体免疫平衡起着重要的作用,可能原因如下:1) CSB 在肠道内水解成丁酸,不仅可以为肠上皮细胞提供能量促进肠上皮细胞的增殖分化,而且作为营养活性物质可以促进肠上皮组织中生长因子的表达,促进小肠的成熟速度及肠上皮对营养物质的吸收。2) 有研究表明,肠道内短链脂肪酸含量升高可下调消化道上皮中胰岛素结合蛋白 3 的基因表达,进而促进胰岛素样生长因子 1 的表达量增加,可促进肠上皮细胞的生长^[43]。3) SB 能够使细胞线粒体免受 LPS 刺激引起氧化应激造成的损伤,进而抑制肠上皮细胞凋亡速率,进而维护肠黏膜的完整性。4) 丁酸抑制

LPS 与 Toll 样受体结合,抑制炎性细胞因子产生。炎性细胞因子的释放减少会导致小肠绒毛脱落和屏障功能受损程度降低^[44]。此外,我们还需要进一步对肠道基因及肠道微生物的表达情况进行研究,以探讨其机制。

4 结 论

饲料中添加 3 g/kg 的 CSB 可显著提高羔羊的 ADG。添加 2 种剂量的 CSB 均可抑制 LPS 刺激引起的血清促炎性细胞因子含量的升高,改变肠道通透性,并在一定程度上改善肠道组织形态,减少肠道损伤,缓解应激并改善肠道健康。综合来看,2 和 3 g/kg 的 CSB 对 LPS 刺激下羔羊的影响基本一致。

参考文献:

- [1] SHYER A E, HUYCKE T R, LEE C, et al. Bending gradients: how the intestinal stem cell gets its home [J]. *Cell*, 2015, 161 (3) : 569–580.
- [2] RIGBY R J, CARR J, ORGEL K, et al. Intestinal bacteria are necessary for doxorubicin-induced intestinal damage but not for doxorubicin-induced apoptosis [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7 (5) : 414–423.
- [3] VAN BOECKEL T P, PIRES J, SILVESTER R, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries [J]. *Science*, 2019, 365 (6459) : eaaw1944.
- [4] CHEN J Z, VITETTA L. Inflammation-modulating effect of butyrate in the prevention of colon cancer by dietary fiber [J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2018, 17 (3) : e541–e544.
- [5] PEREGO S, SANSONI V, BANFI G, et al. Sodium butyrate has anti-proliferative, pro-differentiating, and immunomodulatory effects in osteosarcoma cells and counteracts the TNF α -induced low-grade inflammation [J]. *International Journal of Immunopathology & Pharmacology*, 2018, 32 : 394632017752240. doi: 10.1177/0394632017752240.
- [6] 邴新帅. 丁酸钠与沙蒿多糖对断奶羔羊肠道发育及胰高血糖素样肽-2 的影响 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- WO X S. Effect of sodium butyrate and artemisia seed polysaccharides on intestinal development and glucagon-like peptide-2 of weaning lambs [D]. Master's Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [7] O' HARA E, KELLY A, MCCABE M S, et al. Effect of a butyrate-fortified milk replacer on gastrointestinal microbiota and products of fermentation in artificially reared dairy calves at weaning [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1) : 14901.
- [8] ROH S, KIMURA N, SAKAMOTO K, et al. Effects of butyrate supplementation in antibiotic-free milk replacer and starter on growth performance in suckling calves [J]. *Animal Science Journal*, 2018, 89 (10) : 1486–1491.
- [9] CHANG G J, YAN J Y, MA N N, et al. Dietary sodium butyrate supplementation reduces high-concentrate diet feeding-induced apoptosis in mammary cells in dairy goats [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66 (9) : 2101–2107.
- [10] GÓRKA P, ŚLIWINSKI B, FLAGA J, et al. Effect of exogenous butyrate on the gastrointestinal tract of sheep. II. Hydrolytic activity in the rumen and structure and function of the small intestine [J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96 (12) : 5325–5335.
- [11] 熊海涛. 丁酸钠对仔猪抗大肠杆菌感染的作用及其机制研究 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2016.
- XIONG H T. Effects and mechanism of butyrate on disease resistant in piglets [D]. p.H. D. Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese)
- [12] FOOTE A P, ZAREK C M, KUEHN L A, et al. Effect of abomasal butyrate infusion on gene expression in the duodenum of lambs [J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95 (3) : 1191–1196.
- [13] BRUEWER M, LUEGERING A, KUCHARZIK T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms [J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171 (11) : 6164–6172.
- [14] TAZUKE Y, DRONGOWSKI R A, TEITELBAUM D H, et al. Interleukin-6 changes tight junction permeability and intracellular phospholipid content in a human enterocyte cell culture model [J]. *Pediatric Surgery International*, 2003, 19 (5) : 321–325.
- [15] 陈佳佳. 感染金黄色葡萄球菌后小尾寒羊乳腺组织及外周血中 TLRs 和 CK 的表达 [D]. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- CHEN J J. Expression of TLRs and CK in breast tissue and peripheral blood of small tail Han sheep infected with *Staphylococcus aureus* [D]. Master's Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018. (in Chinese)

- [16] 邱敏,董国忠.脂多糖对奶牛胃肠道屏障功能的影响及其在胃肠道的易位[J].中国奶牛,2014(7):17-21.
 QIU M, DONG G Z. The tranlocation of lipopolysaccharides in cow's gastrointestinal tract [J]. China Dairy Cattle, 2014(7):17-21. (in Chinese)
- [17] AHN H, KWON H M, LEE E, et al. Role of inflammasome regulation on immune modulators[J]. Journal of Biomedical Research, 2018, 32(5):401-410.
- [18] 杜孟威,白雪,李佳琪,等.白细胞介素-8与肿瘤免疫逃逸[J].生命科学,2020,32(6):523-533.
 DU M W, BAI X, LI J Q, et al. Interleukin-8 and tumor immune escape [J]. Life Science, 2020, 32(6):523-533. (in Chinese)
- [19] 任亚雪,郭乾鹏,李媛媛,等.尿肠球菌活菌和热灭活菌对 RAW264.7 细胞肿瘤坏死因子- α /白细胞介素-10平衡以及丝裂原活化蛋白激酶信号通路的影响[J].动物营养学报,2020,32(9):4345-4357.
 REN Y X, GUO Q P, LI Y Y, et al. Effects of viable and heat-inactivated *Enterococcus faecium* on tumor necrosis factor- α /interleukin-10 balance and mitogen-activated protein kinase signaling pathway in RAW264.7 Cells [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(9):4345-4357. (in Chinese)
- [20] ZHANG W H, JIANG Y, ZHU Q F, et al. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens [J]. British Poultry Science, 2011, 52(3):292-301.
- [21] ZOU X, JI J, QU H X, et al. Effects of sodium butyrate on intestinal health and gut microbiota composition during intestinal inflammation progression in broilers [J]. Poultry Science, 2019, 98(10):4449-4456.
- [22] GUO J, WANG Y N, JIANG P, et al. Sodium butyrate alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice through inhibiting inflammatory response [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 137:103792.
- [23] LIU J, CHANG G J, HUANG J, et al. Sodium butyrate inhibits the inflammation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating the toll-like receptor 4/nuclear factor κ B signaling pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2019, 67(6):1674-1682.
- [24] 程源.血清 D-乳酸、I-FABP 在腹部大手术后不同时间点肠屏障功能障碍中的预警价值研究[D].硕士学位论文.昆明:昆明医科大学,2019.
 CHENG Y. Research on early warning value of serum D-lactate and I-FABP in the intestinal barrier dysfunction at different time after abdominal operation [D]. Master's Thesis. Kunming: Kunming Medical University, 2019. (in Chinese)
- [25] 何志捷,植耀炜,黄超泰,等.血清二胺氧化酶、D-乳酸和细菌内毒素在重症患者肠道功能评估中的作用[J].岭南现代临床外科,2017,4(4):400-403.
 HE Z J, ZHI Y W, HUANG C T, et al. Clinical significances of plasma diamineoxidase, D-lactate and endotoxin activity in critical ill patient with gastrointestinal dysfunction [J]. Lingnan Modern Clinicsin Surgery, 2017, 4(4):400-403. (in Chinese)
- [26] 李军.多发伤患者二胺氧化酶的变化及与胃肠功能的相关性研究[D].硕士学位论文.石河子:石河子大学,2016.
 LI J. Changes of plasma diamine oxidase levels in multiple-injury patients and its relation with gastrointestinal dysfunction [D]. Master's Thesis. Shihezi: Shihezi University, 2016. (in Chinese)
- [27] 王凯,欧阳军.二胺氧化酶对腹部闭合性损伤致小肠破裂的诊断价值[J].中华灾害救援医学,2018,6(4):228-229.
 WANG K, OU Y J. The value of diamine oxidase in diagnosis of small intestinal rupture caused by closed abdominal injury [J]. Chinese Journal of Disaster Medicine, 2018, 6(4):228-229. (in Chinese)
- [28] ASCHENBACH J R, AHRENS F, SCHWELBERGER H G, et al. Functional characteristics of the porcine colonic epithelium following transportation stress and Salmonella infection [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2007, 42(6):708-716.
- [29] DENGLER F, RACKWITZ R, BENESCH F, et al. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2015, 99(2):379-390.
- [30] LI M, VAN ESCH B C A M, HENRICKS P A J, et al. The anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on lipopolysaccharide-or tumor necrosis factor α -stimulated endothelial cells via activation of GPR41/43 and inhibition of HDACs [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9:533.
- [31] LIU J D, LUMPKINS B, MATHIS G, et al. Evaluation of encapsulated sodium butyrate with varying releasing times on growth performance and necrotic enteritis mitigation in broilers [J]. Poultry Science, 2019, 98(8):3240-3245.
- [32] DOU X J, GAO N, YAN D, et al. Sodium butyrate alleviates mouse colitis by regulating gut microbiota

- dysbiosis[J]. *Animals*, 2020, 10(7):1154–1165.
- [33] POWELL D W. Barrier function of epithelia[J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1981, 241(4):G275–G288.
- [34] MORIN M J, UNNO N, HODIN R A, et al. Differential expression of inducible nitric oxide synthase messenger RNA along the longitudinal and crypt-villus axes of the intestine in endotoxemic rats[J]. *Critical Care Medicine*, 1998, 26(7):1258–1264.
- [35] PULEO F, ARVANITAKIS M, VAN GOSSUM A, et al. Gut failure in the ICU[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011, 32(5):626–638.
- [36] DEITCH E A, SPECIAN R D, BERG R D, et al. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products[J]. *Critical Care Medicine*, 1991, 19(6):785–791.
- [37] PLUSKE J R, THOMPSON M J, ATWOOD C S, et al. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning[J]. *British Journal of Nutrition*, 1996, 76(3):409–422.
- [38] 徐磊. 内源性 LPS 对奶牛瘤胃与盲肠的炎性损伤机理[D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2014.
- XU L. Inflammatory damage mechanism of endogenous LPS on rumen cecum of dairy cows[D]. Master's Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [39] LUO J Q, CHEN D W, MAO X B, et al. Purified β -glucans of different molecular weights enhance growth performance of LPS-challenged piglets via improved gut barrier function and microbiota[J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(9):602.
- [40] CHEN Y P, ZHANG H, CHENG Y F, et al. Dietary l-threonine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and intestinal barrier damage of broiler chickens at an early age[J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, 119(11):1254–1262.
- [41] CHEN L, LI S, ZHENG J, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance, intestinal development, and immune response of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9:62.
- [42] WANG C C, WU H, LIN F H, et al. Sodium butyrate enhances intestinal integrity, inhibits mast cell activation, inflammatory mediator production and JNK signaling pathway in weaned pigs[J]. *Innate Immunity*, 2018, 24(1):40–46.
- [43] VAN LANDEGHEM L, SANTORO M A, MAH A T, et al. IGF1 stimulates crypt expansion via differential activation of 2 intestinal stem cell populations[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(7):2828–2842.
- [44] ZHU H L, LIU Y L, XIE X L, et al. Effect of *L*-arginine on intestinal mucosal immune barrier function in weaned pigs after *Escherichia coli* LPS challenge[J]. *Innate Immunity*, 2013, 19(3):242–252.

Effects of Coated Sodium Butyrate on Serum Inflammatory Cytokines, Intestinal Permeability and Intestinal Morphology of Weaned Lambs Challenged with Lipopolysaccharide

WANG Kexin ZUO Lijun CHEN Xiang JIANG Ning PAN Chunyuan

LI Lingyan ZHANG Aizhong*

(Key Laboratory of Feed Resource Efficient Utilization and Nutrition Manipulation in Cold Region of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of coated sodium butyrate (CSB) on serum inflammatory cytokines, intestinal permeability and intestinal morphology in weaned lambs challenged with lipopolysaccharide (LPS). Twenty-four weaned lambs with an average body weight (11.79 ± 0.54) kg were

randomly allocated to 4 groups with 6 replicates per group and 1 lamb per replicate according to similar body weight: control group (CON), LPS group, CSB2L group and CSB3L group. CON and LPS groups were fed a basal diet, CSB2L and CSB3L groups were supplemented with 2 and 3 g/kg CSB, respectively. Three lambs in each group were slaughtered on the 28th day. LPS, CSB2L and CSB3L groups were intraperitoneally injected with 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW LPS, and CON group was intraperitoneally injected with the same amount of sterile normal saline 3 h before slaughter on the 28th day. The results showed as follows: 1) the addition of CSB to the diet could significantly increase average daily feed intake (ADFI) of weaned lambs ($P<0.05$). The average daily gain (ADG) in CSB3L group was significantly higher than that in CON group or LPS group ($P<0.05$). 2) Compared with CON group, the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-8 in serum of weaned lambs were significantly higher in LPS group ($P<0.05$). The contents of serum TNF- α and IL-1 β in CSB2L and CSB3L groups were significantly lower than those in LPS group ($P<0.05$), and the content of serum TNF- α was significantly higher than that in CON group ($P<0.05$). The content of serum IL-8 in CSB3L group was significantly lower than that in LPS group ($P<0.05$). The content of IL-10 in CSB2L and CSB3L groups was significantly higher than that in LPS group ($P<0.05$). 3) LPS challenge significantly increased the *D*-lactate (DLA) content and diamine oxidase (DAO) activity in serum of weaned lambs ($P<0.05$). CSB2L and CSB3L groups can significantly decreased the DLA content and DAO activity after LPS challenge ($P<0.05$). 4) The morphology and structure of intestinal mucosa were intact and the villi were arranged neatly in CON group. After challenge with LPS, the villi of jejunum and ileum were disorderly arranged, with different heights and swollen villi. In CSB2L and CSB3L groups, the villi of jejunum and ileum were relatively complete and neatly arranged, the degree of swelling decreased, and the epithelium was slightly exfoliated. In LPS group, villi epithelial cells were shed, glands were arranged disorderly and colonic villi fell were slightly shed. There was slight edema of cecum and colon in CSB2L group, and there was no obvious exfoliation and edema of cecal and colonic villous epithelium in CSB3L group. The villi height and villi height/crypt depth of the jejunum and ileum were significantly decreased ($P<0.05$). The decrease of villus height and villus height/crypt depth in jejunum and ileum were relieved in CSB2L and CSB3L groups ($P<0.05$). The villus height of duodenum in CSB2L and CSB3L groups was significantly higher than that in CON and LPS groups ($P<0.05$). Compared with CON group, ileum villi height and villi height/crypt depth were significantly increased in CSB3L group ($P<0.05$). It is concluded that dietary CSB can alleviate the stress of weaned lambs challenged with LPS, inhibit the increase of serum proinflammatory cytokines and intestinal permeability, then improve intestinal morphology and maintain intestinal health to a certain extent. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(2):954-964]

Key words: coated sodium butyrate; weaned lambs; lipopolysaccharide; intestinal health