

热应激环境下育成鸡肠道菌群多样性及黏膜结构的相关性分析

李永洙¹ 陈常秀¹ 金泽林¹ 郑中华²

(1. 临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276000;

2. 山东龙盛农牧集团, 山东 临沂 276005)

摘要 为分析热应激环境下育成鸡肠道菌群以及黏膜结构的变化,揭示热应激下家禽肠道中正常菌群定植与黏膜结构变化的相关性,选取健康状况相似的10周龄日照琅琊鸡96只,设适温对照组(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, I)和高温组(38 ± 1) $^{\circ}\text{C}$),随机分在2个人工环境气候舱中饲养,试验期为14 d。采用16S rDNA PCR-DGGE技术,分析热应激处理后1 d(II)、7 d(III)和14 d(IV)时十二指肠、空肠及回肠部位内容物细菌群落多样性以及组织黏膜形态变化、肠黏膜上皮内杯状细胞数量。结果表明:热应激持续时间越长,对回肠部位菌群影响越大,III组十二指肠与回肠部位优势细菌菌群组成成分明显;IV组十二指肠、空肠与回肠部位优势细菌菌群组成具有明显差异。不同热应激时段在空肠部位可检测到罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、螺旋链霉菌(*Streptomyces spiralis*)、*Plebeius* 杆菌属细菌(*Bacteroides plebeius strain*)和嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*),而回肠部位可检测到拟杆菌属(*Bacteroidetes*)和不可培养的细菌等;III组十二指肠、空肠和回肠的绒毛长度、宽度、隐窝深度及绒毛高度/隐窝深度(V/C)均发生了明显的变化,各肠段的绒毛长度均明显下降,其中回肠绒毛长度减少最为显著($P < 0.05$);十二指肠、空肠隐窝深度及V/C均出现明显下降($P < 0.05$),各肠段肠壁厚度均显著比对照组低($P < 0.05$)。III组空肠和回肠内杯状细胞的数量明显减少,其中回肠差异显著($P < 0.05$)。结果显示,热应激对育成鸡各肠段细菌菌群组成的影响很大,并且黏膜组织结构发生了明显变化,从而破坏消化道菌群平衡,导致消化吸收功能严重受阻。

关键词 热应激;育成鸡;肠道菌群;肠黏膜结构;多样性

中图分类号 Q 938.1⁺5

文章编号 1007-4333(2016)01-0071-10

文献标志码 A

Correlation analysis on adult chicken intestinal flora diversity and mucosal structure under heat stress environment

LI Yong-zhu¹, CHEN Chang-xiu¹, JIN Ze-lin¹, ZHENG Zhong-hua²

(1. College of Life Science, Linyi University, Linyi 276000, China;

2. Longshenggroup Shandong, Linyi 276005, China)

Abstract This study was designed to analyze changes in the intestinal flora grower and mucosal structure under heat stress and reveal the correlation between poultry intestinal normal flora colonizing and structure changes of mucosal. Ninety six 10-week-old chickens in similar health status were selected and randomly allotted to two groups: One is normal temperature control group (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, and the other is heat stress group (38 ± 1) $^{\circ}\text{C}$. These chickens were feed in two individual work environment and climate cabin for trial period of 14 d. The microbial diversity of the contents in duodenum, jejunum and ileum and organizational mucosa morphological changes, the number of goblet cells in the intestinal mucosa after exposed to heat stress were analyzed using 16S rDNA PCR-DGGE technique. The results showed that flora in ileum were greatly influenced, dominant bacterial microflora in duodenum and ileum of group III was clearly separated and there is significant difference in jejunum and ileum dominant bacteria microflora of group IV under the longer duration of heat stress. During heat stress periods, *Lactobacillus reuteri*, *Streptomyces spiralis*, *Bacteroides plebeius strain*, and *L. acidophilus* were detected in different parts of the jejunum. *Bacteroidetes* and uncultured

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA102501); 日本学生支援机构归国外国留学生短期研究制度基金(JP22GR037)

第一作者: 李永洙, 教授, 主要从事家禽营养生理与遗传育种研究, E-mail: liyongzhu@lyu.edu.cn

bacteria were also found in ileum. In group III, villus length, width, crypt depth and villus height/crypt depth (V/C) have all undergone significant changes. Length of all bowel villus was significantly decreased, villus length in ileum is the most significant ($P < 0.05$); Duodenum, jejunum crypt depth and V/C were significant declined ($P < 0.05$); Thickness of bowel wall were significantly lower than in the control group ($P < 0.05$). The number of goblet cells in Jejunum and ileum of group III were significantly reduced and it showed significant difference in ileum ($P < 0.05$). The results showed that long thermal stress had strong effect on bowel bacterial microflora of adult chicken, and caused significant changes in the organizational structure of the mucosa, thereby the gastrointestinal flora balance was broke by long thermal stress, resulting in severe disrupting on digestion and absorption of chicken.

Keywords heat stress; adult chicken; intestinal bacterial microflora; intestinal mucosal structure; diversity

家禽的肠道正常菌群是天然生物屏障, 菌群通过相互竞争排斥作用, 影响侵入的致病菌在肠黏膜上定植, 引起消化吸收机能的紊乱。正常菌群在正常生理环境下刺激和激活宿主的免疫系统, 产生非特异性免疫调节因子, 还可参与食物的消化吸收, 为肠黏膜细胞提供某些营养成分, 维持肠道微生态平衡^[1]。随着地球温暖化进程的加快, 对养殖业带来严重威胁, 家禽在高温环境下宿主热平衡失调引起热应激, 使得腺胃、十二指肠、空肠和回肠均有明显的病理损伤性变化^[2]以及胃酸、胃蛋白酶合成增多, 同时黏液分泌减少, 胃肠黏膜上皮细胞的再生能力下降, 这些黏膜结构的改变可引起肠屏障功能的改变, 导致肠道消化生理机能的紊乱, 使生产性能下降, 严重时甚至因抵抗力下降而大批死亡, 造成巨大的经济损失。当环境温度超过 28 °C 时, 家禽体内代谢就会发生变化, 可导致鸡十二指肠、空肠和回肠绒毛顶端轻微破裂、肠绒毛局部区域水肿、断裂和成片绒毛严重缺失^[3]。研究表明家禽经过热应激刺激后, 在肠道微生态中好氧菌和乳酸菌数量所占比率均呈显著上升趋势。所以热应激对家禽肠道微生物群落和消化功能特性影响较大。因此, 近几年关于肠道菌群的研究颇受关注, 并证实肠道菌群与宿主免疫^[4]、物质代谢^[5]紧密相关。但是对热应激环境下育成阶段家禽肠道微生物菌群多样性及肠道黏膜结构变化的相关性研究机制尚不清楚。本研究通过分析热应激处理对育成鸡小肠微生物菌群结构的变化以及黏膜结构的影响, 揭示热应激下肠道中的正常菌群定植和增殖能力与其黏膜结构相关性, 并分离抗热应激的有益菌, 旨在对维护家禽肠道健康、提高养禽业的经济效益提供参考。

1 材料与方法

1.1 环境控制舱中实验动物的处理

选择体质健康的 10 周龄日照琅琊鸡 96 只, 随

机分在 2 个人工环境气候舱中饲养, 设适温对照组 (24 ± 1) °C (I) 和高温组 (38 ± 1) °C, 各设 3 个重复, 每个重复 16 只, 试验期为 14 d。高温组中在 1 d (II)、7 d (III) 和 14 d (IV) 等 3 个时间点采集相关样本, 在每采样点从每个重复中取 5 只鸡进行剖杀。试验期间自由饮水, 其他饲养管理按常规进行。舱内除温度外, 其他各环境因素(饲料原料组成、饲养条件)保持一致, 相对湿度 55%, 光照 10 h, 强度 10 lx, 舱内持续均匀通风。研究期间所有试验鸡饲喂相同的玉米-豆粕型日粮, 参照黄羽肉鸡饲养标准 (NY/T33-2004) 配制, 其日粮组成为玉米 61.4%、麦麸 14%、豆粕 21%、磷酸氢钙 1.2%、石粉 1.1%、食盐 0.3% 和添加剂 1%, 营养水平为粗蛋白质含量要达到 14.8%, 代谢能 11.50 MJ/kg, 钙 1.68%, 磷 0.57%, 并在饲喂前进行灭菌处理。

1.2 样品收集与处理

1) 分别在 1、7 和 14 d 屠宰试鸡, 每重复随机选取 5 只, 禁食 12 h 后颈静脉放血屠宰, 5% 的新洁尔灭溶液浸泡 5 min, 全身消毒; 此后分离肠道, 沿纵向剖开, 将各肠端分别结扎, 转移至超净工作台, 用无菌剪刀剪开肠壁, 从十二指肠 U 状弯曲的起始处和结束处向下取 3 cm 肠段, 作为十二指肠和空肠样品; 从回盲韧带起始处向下取 3 cm 肠段, 作为回肠样品。采集十二指肠、空肠及回肠内容物为样本, 并将相同 5 只鸡的肠内容物均匀混合, 然后按 0.2 g/管分装到 2 mL 离心管, 置液氮速冻, -80 °C 冷冻保存。

2) 各取一小段十二指肠、空肠及回肠, 用 4% 磷酸缓冲液固定, 待测定空肠绒毛高度、隐窝深度和肠壁厚度及 V/C 比值。

1.3 主要试剂及仪器

Taq DNA 聚合酶及 PCR 反应缓冲液购自 Takara 公司 (日本); PCR 引物由 Laboratory of Animal Genetics Okayama University of Guelph 合

成; DGGE 成套试剂购自 Bio-Rad 公司(日本); QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit 和 QIAprep[®] Spin Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司(日本); TOPO TA Cloning[®] Kit 购自 Biodyna-mics Laboratoy Inc 公司(日本); 银染药品和试剂购自 Thermo Fisher Scientific K. K. 公司(日本)。PCR 仪(MJ Research PTC-200); DGGE 电泳仪(Bio-Rad, Benchmark 公司, 美国)。核酸浓度测定仪(BioSpec-mini, Shimadzu Kyoto); 310 型 DNA 测序仪(ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer, Laboratory of Animal Genetics Okayama University Japan Okayama)。冷暖恒湿电子控制仪(TLA 型, 山东泰安天龙农业电子科技中心); 荧光倒置显微镜及显微图像分析系统(Nikon TE-2000, NIKON 公司, 日本); 透射电子显微镜(JEM-1200E 型, JEOL 公司, 日本); 透射电子显微镜扫描附件(IB-5 型, Hitachi 公司, 日本); Leica 图像分析仪(Leica Q500MC 型, Leica 公司, 德国)。

1.4 肠道微生物菌群多样性分析

1.4.1 细菌总 DNA 的提取

采用 QIAamp[®] DNA Stool MiniKit 方法提取细菌总 DNA。用核酸浓度测定仪测定总 DNA 浓度, -20 °C 保存备用。

1.4.2 基因组总 DNA 16S rDNA V₃ 区特异性扩增片段

参考文献[6], PCR 反应体系(50 μL): 10 × 缓冲液 5 μL (含 15 mmol/L MgCl₂), dNTP (10 mmol/μL) 4 μL, 引物(357f-GC、517r; 10 pmol/μL) 1 μL, 模板 DNA 1.0 μL, TaqDNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 补足 50 μL。同时设置不添加模板的阴性对照。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。根据大肠杆菌 16S rDNA V₃ 区片段设计合成, 上游引物为: 357f-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGG-CGGGGCGGGGCACGGGGGCCTACGGGAG-GCAGCAG-3'), 357f(5'-CCTACGGGAGGCAGC-AG-3') 和下游引物 517r(5'-ATTACCGCGCT-GCTGG-3')。

1.4.3 基因组总 DNA 16S rDNA V₃ 区扩增片段变性梯度凝胶电泳

利用已获得 DNA 16S rDNA V₃ 区扩增片段产

物, 用相应的微卫星引物和 PCR 扩增条件^[7] 进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。参照文献[8], 使用 Bio-Rad Dcode 进行 DGGE 凝胶电泳。8% 的聚丙烯酰胺胶上进行分离, 变性剂梯度范围为 20%~60% (100% 变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。电泳在恒温 60 °C 下 1 × TAE 缓冲液中进行, 电压 150 V, 时间 12 h。电泳结束后进行 SYBRgreen I (100 × 稀释倍) 染色, 用 UVI 成像系统检测照相。将 DGGE 图谱上的差异条带和共性条带分别回收, 从凝胶上小心切下 DGGE 条带, 放入 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 10 μL 无菌水, 在暗处 4 °C 中放置 12 h。用相应的微卫星引物(357f 和 517r) 进行二次 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小和浓度。

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳割胶回收、纯化与载体的连接、测序

用无菌手术刀将琼脂糖凝胶电泳割胶回收。回收产物用 Wizard PCR Prep sDNA Purification System 进行纯化, 纯化产物采用 DynaExpressTA PCR Cloning Kit (TaKaRa), 构建克隆文库, 用 QIAamp[®] DNA Stool MiniKit, 抽提质粒, 经 PCR 和电泳确证克隆片段的正确性。将筛选后的细菌 DNA 应用 PCR 的 ByeDye25 法全域增幅。PCR 产物经处理后在 310 型 DNA 测序仪进行测序。所得结果在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中进行检索, 确定细菌的种类和名称, 寻找亲缘关系最近的细菌或菌群。

1.5 肠道组织结构观察

按常规组织切片制作要求, 将固定的标本经水洗、脱水、透明、浸蜡和包埋等处理后, 在室温下切成约 10 μm 厚的切片, 用苏木精-伊红染色法染色后制成组织切片。在不同肠段部位中选出 4 张不连续切片典型视野(绒毛完整且走向平直), 采用荧光倒置显微镜及显微图像分析系统, 选取 4 个最高绒毛高度和最深隐窝深度, 测定其绒毛高度和隐窝深度, 并计算绒毛高度/隐窝深度(V/C); PAS 染色切片检测肠黏膜上皮内杯状细胞数量的变化。

1.6 数据统计分析

1.6.1 肠道微生物菌群的数据以及相似性分析

使用分析软件 BioNumerics 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) 对 PCR-DGGE 指纹图谱进行条带计数, 应用主成分分析

(Principal Components Analysis, PCA)法对数字化的 PCR-DGGE 图谱进行分析。

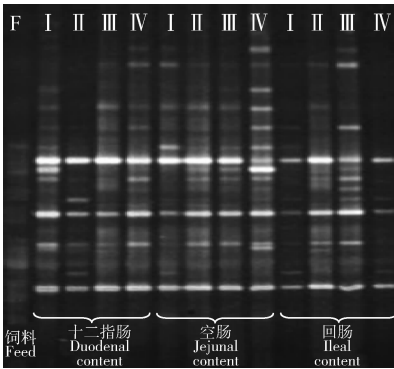
1.6.2 试验数据

用 SPSS12.0 数据处理软件进行单因素方差分析,并对均数作 LSD 多重比较。

2 结果

2.1 热应激环境下饲料微生物因素对肠道菌群的影响

热应激环境下饲料微生物因素对蛋鸡肠道菌群的影响结果见图 1。从图 1 指纹图谱中可以看出,经过灭菌处理后的饲料组与不同肠段、不同日龄间均没有共性条带。结果表明,不同肠段、不同日龄鸡群小肠微生物菌群,并未受到空腹前饲喂的经过灭菌后饲料因素的影响。



F 条带表示饲料, I 条带表示对照组, II、III、IV 条带分别表示热应激 2、7 和 14 d 时采样组,下同。

F is the sample of feed; I is the sample taken from control group, II、III、IV are samples taken at 2, 7 and 14 d after exposed to heat stress respectively. The same as below.

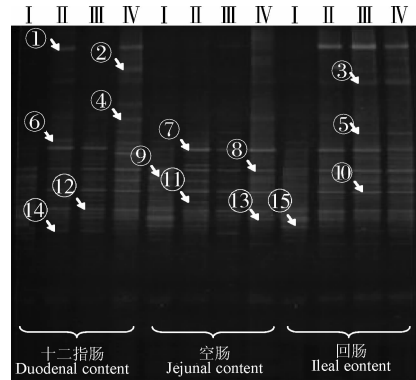
图 1 饲料中微生物菌落与肠道菌群的比较分析

Fig. 1 Comparative analysis of microbial colonies in feed and intestinal Bacteria

2.2 热应激环境下育成鸡肠道内容物中菌群相似性分析

对于 PCR-DGGE 方法,不同细菌的条带分得越开,条带数越多,反映细菌菌群的多样性越丰富。从图 2 指纹图谱中可以看出,尽管高温持续时间不同也存在一些共性条带;肠道相同部位内指纹图谱的平均条带数差异不显著 ($P > 0.05$),但肠道不同部位间指纹图谱的平均条带数差异显著 ($P < 0.05$)。回肠内容物混合物中细菌种类最丰富,电泳条带最多,分别为 14、15、16 和 18;其次是空肠,电泳条带数分别为 13、14、14 和 15;而十二指肠,电泳

条带数分别为 10、12 和 14。由此可见,热应激条件下回肠部位菌群的影响较大,而十二指肠部位菌群的影响较小。



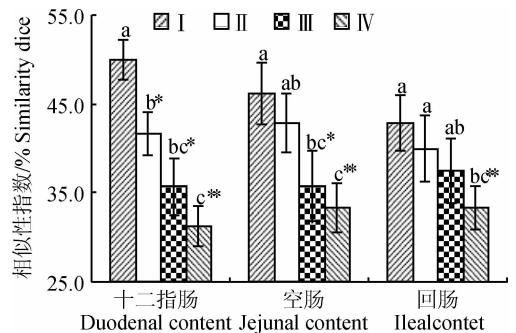
圈码数字表示特异性条带顺序。

Circle code number represents the order of specific bands.

图 2 不同肠段微生物细菌 16S rDNA V3 区基因共性、特异性 PCR-DGGE 指纹图谱分析

Fig. 2 Common character and Specificity PCR-DGGE DNA fingerprint of the V3 region of 16S rDNA gene of bacteria in different parts of bowel

菌群相似性指数是测量群落间或样方间相似程度的指数指标。相似性指数的高低间接地说明共性菌群以外的菌群情况。本试验菌群相似性指数分析见图 3。从图中可知,对照组与高温组的各肠段内容物细菌的组成有不同的倾向,热应激 1 d 后,细菌菌群相似性指数在空肠、回肠与对照组的相同部位比较无显著差异 ($P > 0.05$),其指数为 42.9、40.0,



标注无相同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), * 表示同一肠段间差异显著 $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 5$ 。

Values in the figure without a common letter are significantly different at $P < 0.05$. * Indicating significant difference between the same bowel at $P < 0.05$, ** represents significant difference at $P < 0.01$; $n = 5$.

图 3 肠道不同部位主要菌群相似性指数

Fig. 3 Dominant microflora similarity in different parts of tract layers

而十二指肠表现显著差异 ($P < 0.05$), 其指数为 41.7; 到 7 d 时, 十二指肠、空肠与对照组的相同部位比较表现显著差异 ($P < 0.05$), 其指数为 35.7、35.7, 而回肠表现无显著差异 ($P > 0.05$), 其指数为 37.5, 与热应激 1 d 各相同部位相互比较均无显著差异 ($P > 0.05$); 到 14 d 时, 十二指肠、空肠、回肠与对照组的相同部位比较均表现极显著差异 ($P < 0.01$), 其指数为 31.3、33.3 和 33.3, 与热应激 7 d 各相同部位相互比较均无显著差异 ($P > 0.05$), 但与热应激 1 d 各相同部位相互比较均表现

显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 热应激对育成鸡肠道内容物中菌群组成的影响

适温对照组与热应激鸡群的 16S rDNA 基因 V₃ 区 PCR-DGGE 图谱的 PCA 分析见图 3。PCA 分析结果显示, II、III 组的空肠部位优势菌群组成与 I 组相似, 而 II 组的十二指肠与回肠部位优势细菌菌群组成有分开趋势 (图 4(a)); III 组的十二指肠与回肠部位优势细菌菌群组成分开明显 (图 4(b)); IV 组的十二指肠、空肠与回肠部位优势细菌菌群组成具有明显差异 (图 4(c))。

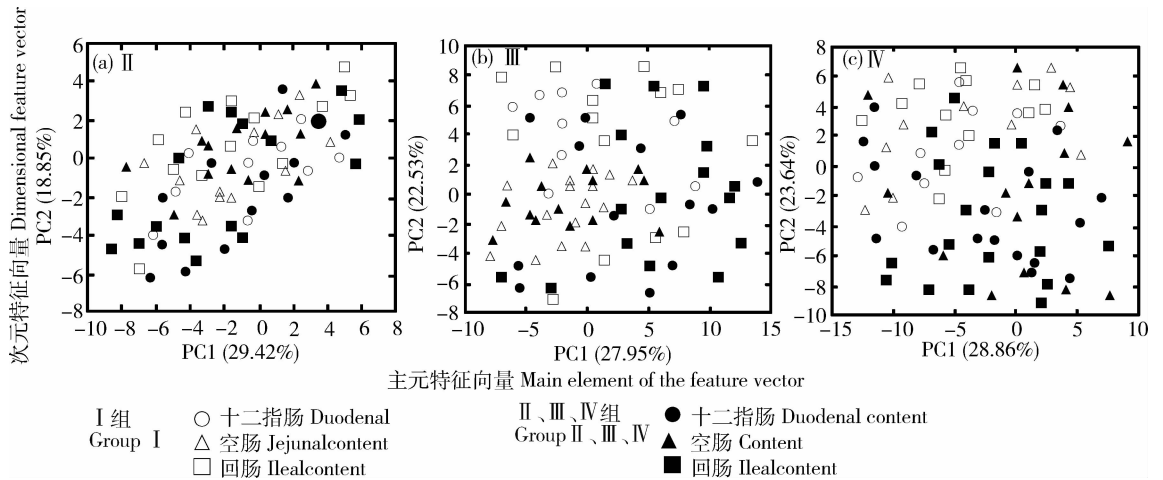


图 4 热应激条件下不同肠段微生物细菌 16S rDNA 基因 V₃ 区 PCR-DGGE 指纹图谱的 PCA 分析

Fig. 4 V₃ region of 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprint of microbial bacterial in different intestinal segments of analysis of the PCA score plots under heat stress

2.4 育成鸡肠道内容物中各细菌菌群的物种多样性分析

图 2 中箭头所指的指纹图谱中分别割胶回收测序结果见表 1。15 个特异条带成功回收、克隆和测序, 测序结果中可见, 与 I 组相比, II、IV 的十二指肠部位可检测到不可培养细菌 (Uncultured *Clostridiales bacterium clone*) (1 条带)、(Uncultured *Bacteroides* sp. Clone) (2 条带)、(Uncultured *Clostridia bacterium clone*) (3 条带) 以及 (*Bacteroides plebeius strain*) (4 条带)、煎盘梭菌 (*Clostridium sartagoforme*), 而 II、III 和 IV 组的回肠部位均可检测到上述菌株, 但空肠部位不明显; I 与 II 组肠道各部位均检测到 (*Streptomyces spiralis*) (11 条带)、*Plebeius* 杆菌属细菌 (*Streptococcus gallolyticus sub sp.*) (12 条带)、(Uncultured bacterium) (13 条带), 而 III 和 IV 组条带不明显; 十二指肠、空肠部位在热应激不同时段可

检测到罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) (9 条带)、螺旋链霉菌 (*S. spiralis*) (11 条带)、(*Bacteroides plebeius strain*) (14 条带)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) (15 条带), 而到回肠部位条带不明显。试验组肠道内容物样本中随着热应激的延续可检测到拟杆菌属 (*Bacteroidetes*) 和不可培养的细菌等, 说明这些菌株在热应激下育成阶段家禽消化道小肠段的优势细菌。而肠道内容物样本中检测到罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) (9 条带)、螺旋链霉菌 (*Streptomyces spiralis*) (11 条带)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) (14 条带), 其条带明显不明显, 说明在热应激下菌群平衡遭到破坏。在 15 个测序结果中, 与 GenBank 数据库中微生物的同源性绝大多数都大于 98%, 有的同源性甚至达到 100%。但条带 5、8、9、11 与数据库中之亲缘关系最近的已鉴定的微生物的同源性仅为 90%、92%、94% 和 91%。因此

这个序列所代表的微生物是煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme*)、溃瘍拟杆菌(*Bacteroides helcogenes*)、

罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)和螺旋链霉菌(*S. spiralis*)的新种。

表1 PCR-DGGE 共性条带和特异性条带的基因片段序列的比对结果

Table 1 Comparison of genomic sequences both in PCR-DGG common bands and special bands

条带 Band	相近菌种 Similar lactic acid bacteria species	碱基数/bp Number of bases	相似率/% Similarity	GenBank 登记号 Registration number
1	Uncultured <i>Clostridiales bacterium clone</i>	168	100	FJ440076.1
2	Uncultured <i>Bacteroides</i> sp. clone	194	98	FJ220958.1
3	Uncultured <i>Clostridia bacterium clone</i>	174	96	FJ440031
4	<i>Bacteroides plebeius</i> strain	694	100	AB423851
5	<i>Clostridium sartagoforme</i>	420	90	FJ384380
6	Uncultured <i>bacterium clone</i>	183	98	EU837961.1
7	<i>Streptococcus</i> spp	200	98	AB448942
8	<i>B. helcogenes</i>	473	92	AB510707
9	<i>Lactobacillus reuteri</i>	199	94	GQ131182
10	<i>Paraprevotella clara</i>	184	100	NR041626
11	<i>Streptomyces spiralis</i>	200	91	NR044142
12	<i>Streptococcus gallolyticus sub sp.</i>	224	96	JX975418
13	Uncultured <i>bacterium</i>	547	98	AY668237
14	<i>B. plebeius</i> strain	188	98	AB200217
15	<i>L. acidophilus</i>	199	97	FJ163976

2.5 热应激对育成鸡肠道组织结构的影响

各处理组的十二指肠、空肠、回肠部位绒毛长度、隐窝深度、V/C 值及绒毛宽度定量检测结果见表 2。由表 2 可以看出,热应激 1 d 后,其肠道黏膜结构形态发生变化。即各肠段部位绒毛长度均明显下降,热应激暴露后开始回肠绒毛长度减少最为显著($P < 0.05$),到 14 d 时其变化量达到 35.56,而空肠部位变化量为 33.07、十二指肠部位变化量为 22.74;各肠段隐窝深度热应激暴露开始减少量无显著差异($P > 0.05$),到 14 d 时回肠部位其变化量达到 31.02,而空肠部位变化量为 29.42、十二指肠部位变化量为 25.79;V/C 均出现下降趋势,其回肠、空肠部位与十二指肠比较均明显下降($P < 0.05$);

各肠段肠壁厚度热应激暴露后开始回肠、空肠部位绒毛长度减少最为显著($P < 0.05$),到 14 d 时回肠部位变化量较为明显,其变化量达到 25.18。

2.6 热应激环境下小肠黏膜上皮内杯状细胞数量的变化

热应激对十二指肠、空肠、回肠的杯状细胞数量的影响结果见表 3。由表 3 可以看出,I 组十二指肠、空肠、回肠黏膜上皮内杯状细胞数量呈逐渐降低趋势,而热应激暴露后各肠段部位上皮内杯状细胞数量与 I 组均显著下降($P < 0.05$),1 d 时其下降幅度 13% 左右,到 14 d 时分别为 28.2%、34.6% 和 35.1%。另外,十二指肠部位与回肠部位间差异显著($P < 0.05$)。

表 2 热应激对育成鸡小肠绒毛长度和厚度的影响

Table 2 Influence of heat stress on the length of villus and thickness gland small intestine in broiler

项目 Item	处理 Treat	十二指肠 Duodenum	变量 Vrbl	空肠 Jejunum	变量 Vrbl	回肠 Ileum	变量 Vrbl
绒毛高度/ μm Villus height	I	1 281.1 \pm 102.4 a		920.1 \pm 32.5 a		742.7 \pm 28.2 a	
	II	1 221.4 \pm 154.1 a	4.66 A	870.1 \pm 57.2 a	5.43 B	689.9 \pm 74.2 ab	7.11 C
	III	1 086.2 \pm 136.8 b	15.21 A	735.3 \pm 59.3 b	20.08 AB	576.4 \pm 83.7 bc	22.39 B
	IV	925.7 \pm 158.2 c	27.74 A	615.8 \pm 74.2 c	33.07 AB	478.6 \pm 52.3 c	35.56 B
隐窝深度/ μm Crypt depth	I	224.1 \pm 17.1 a		121.0 \pm 14.5 a		202.1 \pm 47.1 a	
	II	217.7 \pm 27.3 a	5.09	114.5 \pm 5.3 ab	5.37	190.6 \pm 12.6 ab	5.69
	III	190.8 \pm 46.2 b	14.86 A	98.6 \pm 9.5 bc	18.51 AB	162.0 \pm 63.1 bc	19.84 B
	IV	166.3 \pm 68.5 c	25.79 A	85.4 \pm 4.1 c	29.42 AB	139.4 \pm 35.8 c	31.02 B
绒毛高度/ 隐窝深度 V/C	I	5.72 \pm 0.11 a		7.60 \pm 0.14 a		3.67 \pm 0.47 a	
	II	5.74 \pm 0.65 a	-0.45 A	7.59 \pm 0.59 a	0.07 AB	3.62 \pm 0.11 a	1.50 B
	III	5.69 \pm 0.45 ab	0.42 A	7.45 \pm 0.47 ab	1.93 B	3.59 \pm 0.29 ab	3.18 C
	IV	5.57 \pm 0.83 b	2.63 A	7.20 \pm 0.72 b	5.17 B	3.43 \pm 0.38 b	6.58 C
肠壁厚度/ μm Intestinal wall thickness	I	212.7 \pm 15.4 a		217.5 \pm 62.2 a		320.1 \pm 27.2 a	
	II	207.5 \pm 38.7 ab	2.44 A	203.9 \pm 38.2 a	6.25 B	298.4 \pm 12.4 a	6.78 B
	III	197.3 \pm 41.3 b	7.24 A	182.1 \pm 98.3 b	16.28 B	256.4 \pm 10.7 ab	19.90 B
	IV	178.3 \pm 79.0 c	16.17 A	178.4 \pm 54.8 c	17.98 A	239.5 \pm 28.7 b	25.18 B

注：同行数据标有相同小字母者表示差异不显著($P>0.05$)；标有相邻小字母者表示差异显著($P<0.05$)；同列数据无或有相同大字母者表示差异不显著($P>0.05$)；标有相邻大字母者表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Means with same small letter superscripts in the same row differ in significantly ($P>0.05$); while means with different small letter in succession differ significantly ($P<0.05$); In the same column, Values with different capital letter super scripts mean significant difference ($P<0.05$); values without letter or with same letter mean no difference($P>0.05$). the same below.

表 3 热应激环境下小肠黏膜上皮内杯状细胞数量的变化

Table 3 Influence of heat stress on the number of goblet cells in intraepithelial

项目 Item	处理 Treat	十二指肠 Duodenum	空肠 Jejunum	回肠 Ileum
上皮内杯状细胞数量/ (100 ⁻¹ 上皮细胞) Number of goblet cells in intraepithelial	I	19.87 \pm 0.34 aA	17.68 \pm 1.32 aAB	14.57 \pm 0.40 aB
	II	17.54 \pm 1.37 bA	15.64 \pm 1.87 abAB	12.63 \pm 1.11 aB
	III	15.93 \pm 1.73 bcA	14.05 \pm 1.43 bcAB	11.28 \pm 0.48 bcB
	IV	14.27 \pm 1.45 cA	11.56 \pm 0.82 cAB	9.46 \pm 1.58 cB

3 讨论

3.1 热应激对育成鸡肠道菌群多样性的影响

动物处于健康状况下，肠道微生态环境相对稳定，而肠道内正常菌群可参与食糜的消化吸收，吸收

某些营养为肠黏膜细胞提供活力，但是由于动物种类、日龄、饲养环境和温度等因素^[7,9-10]，肠道菌群结构平衡遭到失调，会引起一系列负面后果。家禽小肠微生物菌群大概是在 2 周内建立起来的，40 d 内其微生物主要是粪链球菌和大肠杆菌类，随后乳酸

杆菌成为优势菌^[11]。本试验选择生长期 10 周龄的鸡群,其肠道菌落有相对稳定的微生物菌群。肠道微生物菌群组成受到饲料原料,饲粮脂肪、蛋白质和碳水化合物营养水平,饲粮物理结构(颗粒大小和加工技术),外源饲用酶类以及饲用抗生素(抗生素和抗球虫药)使用的影响^[12]。本研究 14 d 试验期内为避免饲料因素影响肠道菌群结构,饲喂饲料原料组成相同,并饲喂经过灭菌的饲料,通过饲料微生物与肠道菌群基因组总 DNA16S rDNA V₃ 区扩增片段变性梯度凝胶电泳比较分析,不同肠段、不同日龄鸡群小肠微生物菌群,并未受到空腹前饲喂灭菌饲粮因素的影响。

雷蕾等^[1]也表明盲肠内微生物条带数最多,微生物最丰富,回肠次之,十二指肠最少,且随着日龄的增加微生物种类也越来越多,到 21 d 达到稳定状态。Ahir 等^[13]报道,在温热而潮湿的环境中,肉鸡部分肠道微生物区系,随着热应激处理时间的推移,微生物菌群由简单变为复杂。有前人报道^[14-15],热应激对肠道黏膜组织结构和微生物菌群均有产生较大的负面影响。本试验选择育成期 10 周龄的健康鸡群,其肠道拥有相对稳定的微生物菌群,且试验期内为避免饲料因素影响肠道菌群结构,饲喂原料组成相同并经过灭菌的饲料。本试验结果表明热应激条件下回肠中菌群的多样性较为丰富,而对十二指肠的菌群影响较小。随着热应激的持续对回肠的菌群影响较大,共性菌群以外的菌群较为丰富,与前人报道的一致。菌群相似度是测量群落间或样方间相似程度的指标,其相似度的高低间接地说明共性菌群以外的菌群情况^[16]。本试验肠道内容物细菌菌群相似度分析表明,回肠部位细菌间相似性最小,而十二指肠部位相似性最高,并且热应激 1 d 比 7、14 d 时各肠段间相似性较小。说明热应激 7、14 d 时空肠、回肠部位共性菌群以外的菌群较为丰富。PCA 分析结果也说明随着热应激的持续优势细菌菌群组成具有明显差异。

肠道微生物屏障是一个由肠道共生菌与宿主的微空间结构形成的微生态系统。当这个微生态系统的稳定性遭到破坏时,就会导致肠道中潜在性病原体(包括条件致病菌)的定植和入侵。肠道常驻菌群通过竞争肠黏膜上的黏附、分泌抗菌物质、增加黏液分泌来抑制致病菌的定植和生长^[17];代雪立等^[18]分析认为,热应激时,畜禽消化道黏膜的器质性病变,致病菌侵袭机会加大。同时高温、高湿条件有利

于病原微生物的繁殖,使鸡肠道菌群平衡遭到破坏,因此高温季节鸡群肠道疾病明显增加。热应激还可使肉鸡肠道内乳酸杆菌和双歧杆菌数量减少,大肠杆菌和梭菌数量增加^[19]。本试验结果表明,十二指肠、空肠部位在热应激不同时段可检测到罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)、螺旋链霉菌(*S. spiralis*)、(*B. plebeius strain*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*),而回肠部位条带不明显,并且随着热应激的延续可检测到拟杆菌属(*Bacteroidetes*)和不可培养的细菌等,说明这些菌株在热应激下育成阶段家禽消化道小肠段的优势细菌。其中,罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)、螺旋链霉菌(*S. spiralis*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*),其条带不明显,说明在热应激下菌群平衡遭到破坏,可影响优势菌与致病菌的平衡,促进有害微生物对肠道的刺激作用。由此可见,热应激环境对肠道菌群的结构变化,易成为其他疾病的并发症或继发病的主要根源。而不可培养菌属是否属于优势菌需要进一步验证。

3.2 热应激对育成鸡肠道组织结构以及肠黏膜上皮内杯状细胞数量的影响

小肠是动物消化、吸收的主要场所,肠道黏膜结构与功能的正常是动物机体充分消化吸收营养物质的基本保证。小肠绒毛是小肠的主要黏膜结构,其长度、隐窝深度及 V/C 是衡量动物消化吸收功能的重要指标。Mitchell 等^[20]研究发现,高温应激使小母鸡空肠绒毛高度、绒毛表面积和绒毛体积(高度×表面积)均显著降低。而当环境温度超过 28 ℃ 时,导致鸡十二指肠、空肠和回肠绒毛顶端轻微破裂、肠绒毛局部区域的水肿、断裂和成片绒毛严重缺失^[15],肠黏膜上的肠绒毛在热应激过程中损伤^[1]。本试验结果表明,热应激 1 d 后,回肠绒毛长度减少最为显著,到 14 d 时其变化量达到 35.56,其次为空肠部位变化量为 33.07、十二指肠部位变化量为 22.74;各肠段隐窝深度热应激暴露开始减少量无显著差异($P > 0.05$);V/C 均出现下降趋势,其回肠、空肠部位与十二指肠比较均明显下降($P < 0.05$);各肠段肠壁厚度热应激暴露后开始回肠、空肠部位绒毛长度减少最为显著($P < 0.05$),到 14 d 时回肠部位变化量较为明显,其变化量达到 25.18。说明随着热应激的延续对回肠部位的影响较为严重。与前人报道的一致。

小肠的正常结构是营养物质消化与吸收的基础,而肠道黏膜上皮细胞主要由吸收细胞、杯状细胞

和内分泌细胞组成。肠道微生物通过释放某些生物活性物质或间接激活肠道免疫系统,影响杯状细胞生长和肠道黏膜完整性,进而对整个机体的营养、免疫起着重要作用。动物处于健康状态时,肠道微生物种类和数量相对平衡,一旦此平衡失调会导致机体体液、细胞以及非特异性免疫功能下降^[21-23],主要表现为黏膜上皮细胞脱落、黏膜固有层水肿、肠绒毛断裂等器质性病变^[1]。本试验中,回肠部位绒毛长度减少最为显著,而十二指肠、空肠、回肠黏膜上皮内杯状细胞数量呈逐渐降低趋势,随着热应激的延续十二指肠部位黏膜上皮内杯状细胞数量减少最为明显,其次为空肠、回肠部位,这与十二指肠部位绒毛长度显著大于回肠部位有关^[2]。说明热应激严重影响育成阶段肠道形态结构,这些结构的变化不利于营养物质的吸收,导致肠道功能紊乱,对机体的生长有一定不良作用,至于本研究中热应激导致空肠和回肠部位某些菌种以及黏膜组织结构的变化,是否直接与免疫机能相关的小肠部位上皮内杯状细胞数量变化有关的问题,以及其相关调控机理还需有待于进一步研究。

4 结 论

热应激 7、14 d 时空肠、回肠部位共性菌群以外的菌群较为丰富,而对十二指肠的菌群影响较小;而热应激条件下育成阶段家禽小肠菌群中罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)、螺旋链霉菌(*S. spiralis*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)平衡遭到破坏,可影响优势菌与致病菌的平衡;且回肠部位绒毛长度减少最为显著,而十二指肠、空肠、回肠黏膜上皮内杯状细胞数量呈逐渐降低趋势,随着热应激的延续十二指肠黏膜上皮内杯状细胞数量减少最为明显,其次为空肠、回肠部位。结果显示,热应激对育成阶段家禽各肠段细菌菌群的组成的影响很大,并且黏膜组织结构发生了明显变化,导致可消化道菌群平衡遭到破坏,这是消化吸收功能严重受阻的主因之一。

参 考 文 献

[1] 雷蕾,张日俊. 鸡肠道正常菌群的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(3): 298-303
Lie L, Zhang R J. The research progress of chicken intestinal normal flora[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2008, 20(3): 298-303 (in Chinese)

[2] 宁章勇,刘思当,赵德明,谭勋,于书敏. 热应激对肉仔鸡呼吸、

消化和内分泌器官的形态和超微结构的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(6): 558-561
Ning Z Y, Liu S D, Zhao D M, Tan X, Yu S M. The influence of heat stress on morphological and ultrastructure change of respiratory, digestive and endocrine tissues in *Broilers* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003, 34(6): 558-561 (in Chinese)

[3] Quinteiro-Filho W M, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro M L, Sakai M, Sa L R M, Ferreira A J P, Palermo-Neto J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2010, 89(9): 1905-1914

[4] Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria [J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2010, 26(6): 564-571

[5] Rashid H O S, Huwaida E E M, Ibrahim Y A. Effect of dietary protein level and strain on growth performance of heat stressed broiler chicks [J]. *International Journal of Poultry Science*, 2012, 11(10): 649-653

[6] Matsuka A, Sakai M, Kanazawa S. Application of T-RFLP analysis for Bacterial community structure of colonies grown on agar plates [J]. *Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2003, 48: 107-112

[7] Kretzschmar-McCluskey V, Curtis P A, Anderson K E, Kerth L K, Berry W D. Influence of hen age and molting treatments on shell egg exterior, interior, and contents microflora and *Salmonella* prevalence during a second production cycle [J]. *Poultry Science*, 2008, 87: 2146-2151

[8] Sakai J S, Kleckner N, Yang X, Guhathakurta A. Tn10 transpososome assembly involves a folded intermediate that must be unfolded for target capture and strand transfer [J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(4): 776-785

[9] Zhu X Y, Zhong T Y, Pandya Y, Joerger R D. 16s rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 124-137

[10] Valeria A T, Kathy O K, Maylene Loo, Robert J H. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3): 783-791

[11] Zhu X Y, Zhong T Y, Pandya Y, Joerger R D. 16s rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 124-137

[12] Habib Ur R, Wilfried V, Wageha A A, Prof J Z. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2007, 61(5): 319-335

[13] Ahir V B, Singh K M, Tripathi A K, Mathakiya R A, Jakhesara

- S J, Koringa P G, Rank D N, Jhala M K, Joshi C G. Study of bacterial diversity in poultry gut using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2012, 2(3): 227-232
- [14] Burkholder K M, Thompson K L, Einstein M E, Applegate T J, Patterson J A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers [J]. *Poultry Science*, 2008, 87(9): 1734-1741
- [15] Quinteiro-Filho W M, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro M L, Sakai M, Sá L R, Ferreira A J, Palermo-Neto J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2010, 89(9): 1905-1914
- [16] 李永洙, Yong-quan Cui. 利用 PCR-DGGE 方法分析不同鸡群的盲肠微生物菌群结构变化 [J]. *生态学报*, 2011, 11(21): 6571-6580
- Li Y Z, Cui Y Q. Structural change analysis of cecal bacterial flora in different poultry breeds using PCR-DGGE [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 11(21): 6571-6580 (in Chinese)
- [17] 芮于明, 刘丹, 张炳坤. 家禽肠道屏障功能及其营养调控 [J]. *动物营养学报* 2014, 26(10): 3091-3100
- Guo Y M, Liu D, Zhang B K. Intestinal barrier of poultry: Function and modulation [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(10): 3091-3100 (in Chinese)
- [18] 代雪立, 肖敏华, 宋晓琳, 张敦伟, 周泉, 石达友, 郭世宁. 热应激对家禽肠道结构与功能影响的研究进展 [J]. *中国家禽*, 2010, 32(11): 41-43
- Dai X L, Xiao M H, Song X L, Zhang D W, Zhou Q, Shi D Y, Guo S N. A Review of the effect of heat stress on structure and function of poultry intestines [J]. *China Poultry* 2010, 32(11): 41-43 (in Chinese)
- [19] Quinteiro-Filho W M, Gomes A V, Pinheiro M L, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Astolfi-Ferreira C S, Ferreira A J, Palermo-Neto J. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis* [J]. *Avian Pathology*, 2012, 41(5): 421-427
- [20] Mitchell M A, Carlisle A J. The effect of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1992, 101A: 137-142
- [21] 冯焱, 杨小军, 胡雄兵, 刘焯, 尹瑞卿, 覃定奎, 姚军虎. 免疫应激对肉鸡肠道微生物区系的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(7): 807-814
- Feng Y, Yang X J, Hu X B, Liu Y, Yin R Q, Qin D K, Yao J H. Effects of different immune status on the variation of intestinal microflora community in broiler chickens (*Gallus gallus*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(7): 807-814 (in Chinese)
- [22] Kogut M H, Klasing K C. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview [J]. *Journal Applied Poultry Research*, 2009, 18: 103-110
- [23] Gong J, Si W, Forster R J, Huang R, Yu H, Yin Y, Yang C, Han Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2007, 59(1): 147-157

责任编辑: 苏燕