

## 硫酸粘杆菌素对獭兔肠道菌群及免疫功能的影响

杨明月<sup>1</sup> 邹芙沁<sup>1</sup> 文斌<sup>2</sup> 孙豪<sup>1</sup> 周毅<sup>1</sup> 倪学勤<sup>1</sup> 曾东<sup>1\*</sup> 汪平<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学 动物医学院,成都 611130;

2. 四川省草原科学研究院,成都 611731)

**摘要** 为探讨硫酸粘杆菌素对獭兔盲肠菌群和免疫器官组织 TLR2、TLR4 mRNA 相对表达量及外周血细胞因子含量的影响,试验分为 2 组,Ⅰ组(对照组)饲喂基础全价饲料;Ⅱ组饲喂含 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素的基础全价饲料。试验期为 28 d。试验应用 PCR-DGGE 及 Real-Time PCR 技术比较分析獭兔盲肠菌群结构的差异,采用 ELISA 检测外周血中细胞因子的含量,Real-Time PCR 检测 TLR2、TLR4 mRNA 相对表达量。结果表明:Ⅱ组盲肠菌群多样性与Ⅰ组相似( $P>0.05$ );Ⅱ组盲肠中梭菌类群 XIVa、肠球菌属、链球菌属数量明显高于Ⅰ组( $P<0.05$ ),梭菌类群Ⅳ明显低于Ⅰ组( $P<0.05$ );Ⅱ组盲肠 TLR2/4 和回肠 TLR4 的相对表达量高于Ⅰ组,盲肠 TLR4 差异显著( $P<0.05$ ),其余差异不显著( $P>0.05$ )。与Ⅰ组相比,Ⅱ组獭兔脾脏指数和脾脏 TLR2/4 表达量增加,肝脏指数和肝脏 TLR4 表达量减少,均无显著差异( $P>0.05$ ),但肝脏 TLR2 显著增加( $P<0.05$ );Ⅱ组外周血细胞因子 IL-4 的浓度显著高于Ⅰ组( $P<0.05$ )。饲料中添加 20 mg/kg 的硫酸粘杆菌素可在一定程度上促进断奶幼兔脾脏发育并提高机体免疫力。

**关键词** 獭兔;硫酸粘杆菌素;脏器指数;盲肠菌群;TLR;外周血细胞因子

中图分类号 S 829.1

文章编号 1007-4333(2016)06-0082-10

文献标志码 A

## Effects of colistin sulfate on intestinal flora and immunity in rex rabbit

YANG Ming-yue<sup>1</sup>, ZOU Fu-qin<sup>1</sup>, WEN Bin<sup>2</sup>, SUN Hao<sup>1</sup>, ZHOU Yi<sup>1</sup>,  
NI Xue-qin<sup>1</sup>, ZENG Dong<sup>1\*</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611731, China)

**Abstract** To investigate the effects of colistin sulfate on cecal microflora and immune organs of TLR2, TLR4 mRNA relative expression and the content of peripheral blood cell factor in Rex Rabbit. Thirty rex rabbits of 35 days old were randomly divided into two groups. Group I (Control group) was fed the basic diet. Group II was fed with the basic diet containing 20 mg/kg colistin sulfate. PCR-DGGE and Real-Time PCR were applied to analyze the differences of cecum microflora, contents of cytokines in peripheral blood were detected by ELISA and real-time PCR was used to detect the expression of TLR2 and TLR4 mRNA relative expression. The diversity of cecal microflora in group II was similar to group I ( $P>0.05$ ). The numbers of *Clostridium cluster XIVa*, *Enterococcus* spp., and *Streptococcus* spp. in the caecum of group II were superior to those of group I ( $P<0.05$ ), and *Clostridium cluster IV* was significantly lower than that in group I ( $P<0.05$ ). The addition of colistin sulfate increased the relative expression of TLR2/4 mRNA in appendix and TLR4 in ileum, but only the TLR4 of the caecum was significantly different ( $P<0.05$ ). Furthermore, Spleen index and relative expression of TLR2/4 mRNA in group II were higher than group I, while a decreasing trend was observed in liver index and relative expression of TLR4 mRNA. However, there was no significantly

收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 四川省“十二五”农作物及畜禽育种攻关项目(2011NZ0099-4);“十二五”国家兔产业技术体系獭兔育种岗位项目(CARS-44-A-4);四川省科技厅 2014 年基本科研业务费

第一作者: 杨明月, 硕士研究生, E-mail: 1031519093@qq.com

通讯作者: 曾东, 教授, 博士生导师, 主要从事动物微生态研究, E-mail: zend@sicau.edu.cn

difference ( $P > 0.05$ ). Liver TLR2 was increased significantly ( $P < 0.05$ ). In Addition, the concentration of IL-4 in peripheral blood was higher than that in group I ( $P < 0.05$ ). The basic diet with 20 mg/kg colistin sulfate could promote the development of the spleen and improve the body immunity in Rex Rabbit.

**Keywords** rex rabbit; colistin sulfate; organ index; cecal microflora; TLR; peripheral blood cell factor

随着我国畜牧业的快速发展,獭兔养殖也得到重视,在獭兔养殖生产中,面临各种疾病的困扰。其中,腹泻是养殖过程中危害最大的疾病,其发病率和死亡率都很高,死亡病兔 80% 以上是由腹泻造成的,尤以 2 月龄以内的幼兔较为多发<sup>[1]</sup>。实际养殖中,抗生素仍然是现如今预防腹泻用药考虑之一。抗生素能够杀灭和抑制细菌的生长,在肠道免疫中能够发挥一定的作用。适量的抗生素可以抑制病原体增殖,增强机体的免疫,控制感染<sup>[2]</sup>。硫酸粘杆菌素是由多粘芽孢杆菌产生的碱性多肽抗生素,是国际上治疗革兰氏阴性菌引起的肠道感染的首选药物,也是我国农业部 2012 年新颁布的《饲料药物添加剂使用规范》<sup>①</sup> I 类药物中允许使用的抗生素。硫酸粘杆菌素对革兰氏阴性菌,尤其是大肠杆菌、沙门氏菌等有较强的抗菌作用<sup>[3-4]</sup>,不易产生耐药性,毒性小,无副作用,吸收率较低<sup>[5]</sup>。王宁<sup>[6]</sup> 研究显示,饲料中添加 15 mg/kg 硫酸粘杆菌素,仔猪生长性能最佳,日增重、干物质、能量及粗蛋白的表观消化率显著提高。马改彦等<sup>[7]</sup> 研究显示,肉鸡饲料中添加硫酸粘杆菌素,能显著降低肉鸡料重比,增加平均日增重,对肉鸡有促生长作用。尹富贵等<sup>[8]</sup> 研究表明,硫酸粘杆菌素可以抑制仔猪肠道大肠埃希菌繁殖,提高或维持血液离子浓度,防止断奶仔猪腹泻。硫酸粘杆菌素对仔猪和肉鸡有明显的促生长作用,且能预防和治疗大肠杆菌感染。在獭兔养殖业中,硫酸粘杆菌素亦常作为饲料添加剂来预防疾病。但硫酸粘杆菌素对獭兔肠道菌群及机体免疫方面的影响研究未见报道。本试验给予断奶幼兔饲料中添加畜禽常用量 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素<sup>①</sup>,旨在研究硫酸粘杆菌素对獭兔肠道菌群、肠道及免疫器官组织 TLR mRNA 表达和外周血细胞因子含量的影响,从而为养殖过程中抗生素的合理使用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

硫酸粘杆菌素购买于兴旺动物药业有限公司; 30 只健康 35 日龄断奶獭兔由四川省草原科学研究

院提供。

### 1.2 试验动物的饲养及分组

选用 30 只 35 日龄健康断奶獭兔((800±50) g) 公母各半,随机分为 2 组,每组 5 个重复,每个重复 3 只,分养于獭兔实验笼内。预试期 7 d 后,逐只称重并记录。I 组,饲喂基础全价颗粒饲料; II 组,20 mg/kg 硫酸粘杆菌素添加于原料中,制成含抗生素的基础全价颗粒饲料。基础全价饲料组成及营养水平见表 1。正试期为 28 d,试验期间,自然通风,自由采食和饮水。饲养试验于四川省草原科学研究院獭兔原种场内进行。

### 1.3 样品采集

试验期结束后,每个重复随机取 1 只獭兔称重并屠宰,采血 10 mL 于 15 mL 收集管中,离心取血清,-20 °C 保存备用。摘取脾脏、肝脏,剔除脂肪后称重并记录。采集盲肠内容物混合在一起,放于灭菌后的 5.0 mL EP 管中,每组 3 份重复样品,液氮速冻后,置-80 °C 保存备用。剪取各组回肠、盲肠、脾脏和肝脏组织,液氮速冻后,置-80 °C 保存备用。

### 1.4 检测指标与方法

#### 1.4.1 脏器指数

用所得的器官重与体重比计算脏器指数[脏器指数(g/kg)=器官重(g)/体重(kg)]。

#### 1.4.2 盲肠内容物细菌总 DNA 的提取及 16S rDNA V3 区的扩增

采用 E. Z. N. A. <sup>®</sup> Stool DNA Kit 试剂盒,按照说明书提取粪样细菌基因组总 DNA。参照文献<sup>[9]</sup> 方法,16S rRNA V3 区通用引物的上、下游序列分别为: 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' 和 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'。PCR 反应体系(25 μL): 2×Taq MasterMix 12.5 μL; 上下游引物各 1.0 μL; 模板总 DNA 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。扩增条件: 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;

① 《饲料药物添加剂使用规范》. 中华人民共和国农业部公告,第 168 号,2012

表1 基础饲料组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrition level of basic diet		ω/%	
日粮组成 Diet composition	含量 Content	营养水平 Nutrient levels	含量 Content
玉米二级 Twogard corn	15.00	粗蛋白 Crude Protein	16.57
次粉 Middlings	8.00	粗纤维 Crude Fiber	14.82
麦麸 Wheat bran	16.00	钙 Ca	0.95
统糠 37 Chaff 37	10.00	磷 P	0.38
苜蓿草粉 Alfalfa meal	32.50	赖氨酸 Lysine	0.86
豆粕 Soybean meal	14.00	甲硫氨酸 Methionine	0.38
豆奶宝 Soycomil	1.00	半胱氨酸 L(+)-Cysteine	0.24
磷酸氢钙 Ca(HCO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.00	消化能/(MJ/kg) DE	10.12
石粉 Limestone	0.50		
膨润土 Bentonite	0.80		
盐 NaCl	0.40		
矿添预混料 <sup>①</sup> Mineral premix	0.50		
赖氨酸 Lysine	0.10		
蛋氨酸 Methionine	0.15		
中华复合维生素预混料 <sup>②</sup> Zhonghua vitamin premix	0.05		
总计 Total	100		

注:①矿添预混料为每千克饲料含:镁 0.29 mg/kg;铁 186.62 mg/kg;铜 10.07 mg/kg;锰 40.34 mg/kg;锌 37.33 mg/kg;硒 0.18 mg/kg;②中华复合维生素预混料为每千克饲料含:VA 28 000 IU/kg;VD<sub>3</sub> 7 500 IU/kg;VE 32.5 IU/kg;VK<sub>3</sub> 0.005 g/kg;VB<sub>1</sub> 0.002 5 g/kg;VB<sub>2</sub> 0.02 g/kg;VB<sub>6</sub> 0.01 g/kg;VB<sub>12</sub> 0.025 mg/kg;叶酸 0.002 5 g/kg;生物素 0.075 g/kg;烟酸 0.075 g/kg。

Note:①Contents of mineral premix in the diet: Mg 0.29 mg/kg; Fe 186.62 mg/kg; Cu 10.07 mg/kg; Mn 40.34 mg/kg; Zn 37.33 mg/kg; Se 0.18 mg/kg;②Contents of Zhonghua vitamin premix in the diet: VA 28 000 IU/kg; VD<sub>3</sub> 7 500 IU/kg; VE 32.5 IU/kg; VK<sub>3</sub> 0.005 g/kg; VB<sub>1</sub> 0.002 5 g/kg; VB<sub>2</sub> 0.02 g/kg; VB<sub>6</sub> 0.01 g/kg; VB<sub>12</sub> 0.025 mg/kg; Folic acid 0.002 5 g/kg; Biotin 0.075 g/kg; Nicotinic acid 0.075 g/kg.

最后 72 °C 延伸 10 min。用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段大小。

#### 1.4.3 PCR-DGGE 分析

参照文献[10]进行 PCR-DGGE 分析。采用 35%~65%的变性凝胶电泳梯度,电泳缓冲液为 1×TAE 溶液,60 °C 电泳 16 h,变性方向和电泳方向一致。电泳结束后经硝酸银染色,凝胶显色定影后,用凝胶成像系统扫描图像。

#### 1.4.4 Real-Time PCR 技术分析盲肠内容物特定菌群

参照文献[11-16],对獭兔盲肠内容物中总细

菌、梭菌类群 IV、梭菌类群 XIVa、普雷沃式菌、肠杆菌科、肠球菌属和链球菌属的 16S rDNA 基因特异性引物(表 2)进行扩增。PCR 反应体系(25 μL):SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 12.5 μL;上下游引物各 1.0 μL;模板 2.0 μL;ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。利用各自代表性菌株的 16S rRNA 基因作为模板制作标准曲线,样品 DNA 检测采用 3 个重复,取平均值。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s, T<sub>m</sub> 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

表 2 各细菌特异性引物序列

Table 2 Primers used in group-specific quantitative assay

细菌种属 Bacterial species	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Production size	退火温度/℃ Tm	参考文献 Reference
总细菌 Total bacteria	F:CGGCAACGAGCGCAACCC R:CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	200	60	[11]
梭菌类群 IV <i>Clostridium cluster IV</i>	F:GCACAAGCAGTGGAGT R:CTTCTCCGTTTTGTCAA	230	60	[12]
梭菌类群 XIVa <i>Clostridium cluster XIVa</i>	F:AAATGACGGTACCTGACTAA R:CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	440	60	[13]
普雷沃式菌属 <i>Bacteroides-Prevotella- Porphyromonas</i>	F:GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT R:CGGAYGTAAGGGCCGTGC	140	68	[14]
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae family</i>	F:CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC R:CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	230	52	[15]
肠球菌属 <i>Enterococcus spp.</i>	F:CCCTTATTGTTAGTTGCCAT R:ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	144	52	[14]
链球菌属 <i>Streptococcus spp.</i>	F:CCAGAAAGGGACGGCUAAC R:GTTAGCCGTCCCTTTCTGG	485	60	[16]

1.4.5 血清免疫指标

采用 ELISA 试剂盒(上海美轩生物科技公司)检测外周血中细胞因子的含量,包括:IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。

1.4.6 Real-Time PCR 检测 TLR2、TLR4 mRNA 相对表达量

使用天根 RNA 试剂盒提取总 RNA。对总 RNA 质量进行检测后,用 Takara 试剂盒进行反转

录,合成 cDNA。RT-PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 15 s, Tm 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环;72 ℃ 延伸 1 min;95 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 55 ~ 95 ℃ 的梯度增温(每 5 s 增加 0.5 ℃),以获取熔解曲线,所有样品做 3 个平行。引物序列见表 3。

相对表达量计算方法:相对表达量倍数 =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [17]。

表 3 TLR2/4 PCR 引物序列

Table 3 TLR2/4 PCR primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Tm	参考文献 Reference
TLR2	F:TGCCTCCTTGTTACCTATGC R:AGATGAAGTTGTTCCCTCCG	55	[18]
TLR4	F:GTGGGCTTAGAACAACACTGGAAC R:TATGGAAGGCAACTCGGATG	55	[18]
$\beta$ -action	F:CCATGTACGTTGCTATCCAGGC R:ATCTCTTGCTCGAAGTCCAGGG	57	[18]

## 1.5 数据统计与分析

PCR-DGGE 指纹图谱运用 Quantity One 软件分析,采用 UPGMA 法进行聚类分析并计算生物多样性指数。所有试验数据均用 Excel 进行初步处理,采用 SPSS 19.0 软件对数据进行 One-way-ANOVA 分析,试验结果以  $P < 0.05$  表示为差异显著。

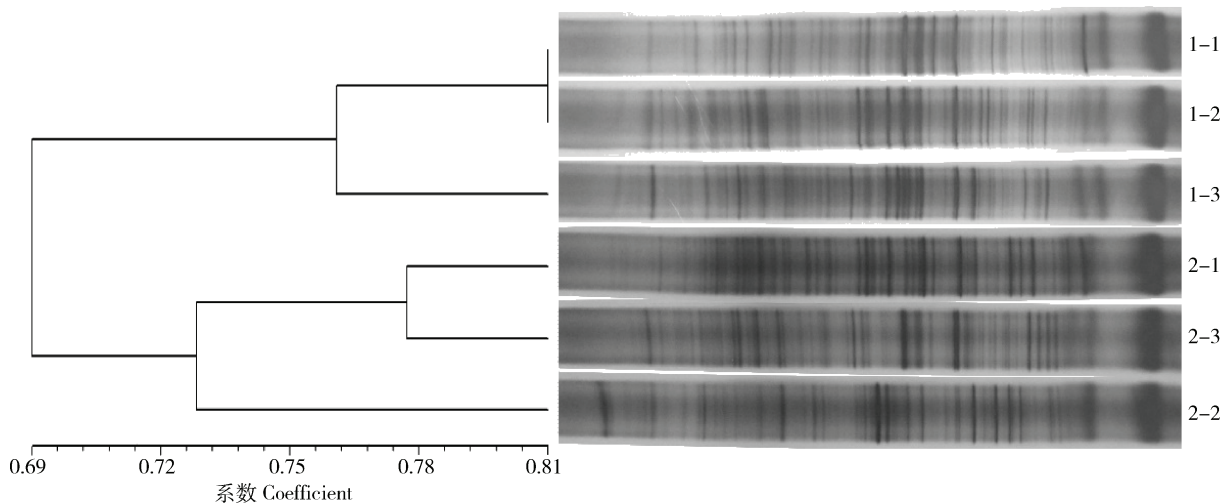


图 1 獭兔盲肠内容物聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of the rex rabbits caecum contents

和 II 组均产生了丰富的电泳条带,条带数目以及亮度存在差异,细菌的条带数目平均值分别为 46 和 44,差异不显著 ( $P > 0.05$ )。表明硫酸粘杆菌素对獭兔盲肠细菌总数无显著影响。

DGGE 图谱条带的多样性指数、均匀度、丰富度能反映样品群落种数、分布均匀度及细菌个体数。

## 2 结果与分析

### 2.1 獭兔盲肠内容物 16S rDNA V3 区域 PCR-DGGE 电泳图谱分析

盲肠内容物 PCR-DGGE 指纹图谱中电泳条带颜色深浅反映菌群优势状况,条带位置的复杂性和数量代表细菌菌群的多样性。从图 1 可以看出, I 组

由表 4 可知, II 组与 I 组獭兔盲肠内容物微生物区系多样性指数(H)、均匀度(EH)以及丰富度(S)均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。聚类分析结果显示(图 1),所有样品的相似性均高于 69%。两组间样品聚类形成 2 个独立簇。表明硫酸粘杆菌素对獭兔盲肠菌群相似性有一定影响。

表 4 獭兔盲肠微生物 PCR-DGGE 电泳图谱多样性分析

Table 4 PCR-DGGE profile analysis diversity of the rex rabbits caecum contents

组别 Sample No	多样性指数(H) Shannon diversity index	均匀度(EH) Richness	丰富度(S) Evenness
I 组 Group I	3.82±0.03	0.920±0.007	45.67±1.33
II 组 Group II	3.77±0.06	0.910±0.012	43.67±2.40

### 2.2 獭兔盲肠内容物微生物 Real-Time PCR 定量检测结果

盲肠主要微生物的 Real-Time PCR 定量结果见表 5。与 I 组相比, II 组盲肠总菌、梭菌类群

XIVa、普雷沃氏菌、肠杆菌科和链球菌属增加,肠球菌和梭菌类群 IV 数量减少,且梭菌类群 IV、梭菌类群 XIVa、肠杆菌科和链球菌属数量差异显著 ( $P < 0.05$ ),其余差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 5 盲肠内容物 Real-time PCR 定量检测结果

Table 5 Quantitative detection (Real-time PCR) in Appendix contents  $\log^{\text{copies}}/\text{g}$

细菌种属 Bacterial species	I 组 (n=15) Group I	II 组 (n=15) Group II
总细菌 Total bacteria	11.39±0.053	11.46±0.041
梭菌类群 IV <i>Clostridium cluster IV</i>	10.93±0.053	10.74±0.079*
梭菌类群 XIVa <i>Clostridium cluster XIVa</i>	10.60±0.049	10.87±0.136**
普雷沃氏菌属 <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas</i>	10.10±0.131	10.36±0.026
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae family</i>	10.09±0.132	9.93±0.059
肠球菌属 <i>Enterococcus spp.</i>	7.91±0.063	8.13±0.031*
链球菌属 <i>Streptococcus spp.</i>	7.82±0.046	8.03±0.030*

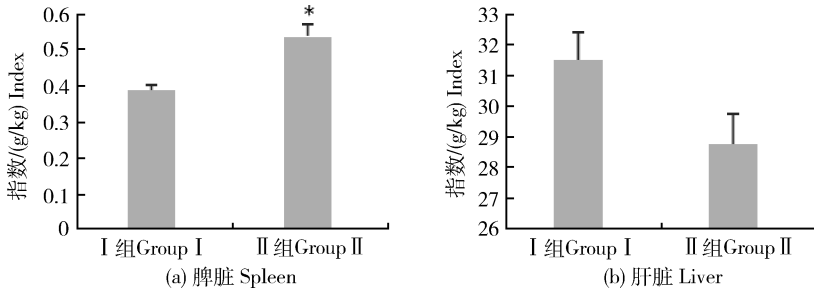
注：\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )；\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )；下表同。

Note: \* indicates the significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* indicate the extremely significant difference ( $P < 0.01$ ); The same as below.

### 2.3 对幼兔脾脏、肝脏指数的影响

所有采集的试验獭兔肝脏、脾脏外观均未见异常。由图 2(a)可知，II 组脾脏指数显著高于 I 组，

差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 2(b)可看出，II 组肝脏指数低于 I 组，差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下图同。

\* indicates the significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图 2 獭兔脏器指数

Fig. 2 Viscera index of rex rabbit

### 2.4 对幼兔外周血细胞因子含量的影响

由表 6 可知，与 I 组相比，II 组外周血细胞因子 IL-1、IL-2、IL-4 的浓度升高，IL-6、IL-10、IL-12、INF- $\gamma$ 、TNF-a 浓度降低，除 IL-4 差异显著 ( $P < 0.05$ ) 外，其余细胞因子含量均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 素对獭兔肠道和免疫器官组织中 TLR2/4 mRNA 相对表达量的影响

由图 3 可知，I 组回肠、盲肠、脾脏和肝脏组织 TLR2 mRNA 表达水平一致。II 组 TLR2 mRNA 相对表达量回肠组织低于 I 组，盲肠、脾脏、肝脏组织高于 I 组，除肝脏组织有显著差异 ( $P < 0.05$ ) 外，其他组织均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。由图 4 可知，I 组回肠、盲肠、脾脏和肝脏组织 TLR4 mRNA

表 6 饲料中添加硫酸粘杆菌素对幼兔外周血细胞因子含量的影响

Table 6 Effect of dietary sulfate on peripheral blood cell factor in young rabbits

指标 Index	I 组 Group I	II 组 Group II
IL-1/(pg/mL)	52.815±7.662	66.060±5.577
IL-2/(ng/mL)	10.162±0.055	11.612±1.288
IL-4/(pg/mL)	11.502±2.910	18.659±1.577*
IL-6/(pg/mL)	78.333±13.126	67.404±8.962
IL-10/(pg/mL)	52.815±4.376	44.627±9.079
IL-12/(pg/mL)	44.041±3.782	43.272±1.861
INF- $\gamma$ /(pg/mL)	64.838±5.633	56.988±4.381
TNF-a/(pg/mL)	45.966±5.491	35.729±3.624

表达水平一致。Ⅱ组回肠、盲肠及脾脏组织 TLR4 mRNA 相对表达量均高于Ⅰ组,肝脏组织低于Ⅰ组,仅盲肠组织差异显著( $P < 0.05$ )。

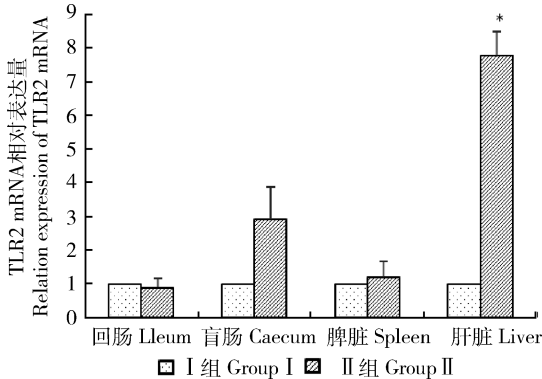


图3 TLR2 mRNA 相对表达量

Fig. 3 Relative expression of TLR2 mRNA

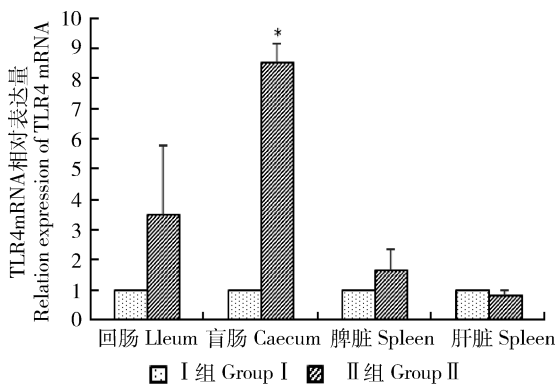


图4 TLR4 mRNA 相对表达量

Fig. 4 Relative expression of TLR4 mRNA

### 3 讨论

#### 3.1 对獭兔盲肠菌群及肠道免疫功能的影响

兔盲肠内微生物种类复杂,数量繁多,微生物对食物残渣进行消化,同时盲肠为微生物的活动提供适宜的条件<sup>[19]</sup>,共同维持肠道内环境的平衡。盲肠内主要微生物通过分泌消化酶或者自身代谢活动代谢尿素、氨、肽类及分解纤维素,产生挥发性脂肪酸、氨基酸、维生素等<sup>[20]</sup>;在提高免疫<sup>[21]</sup>、调整肠道微生态<sup>[22]</sup>等方面具有十分重要的作用。本试验采用 PCR-DGGE 分析硫酸粘杆菌素对獭兔盲肠菌群的影响,图谱聚类结果是Ⅱ组与Ⅰ组能单独成簇,2组样品聚在一起的相似性高于 69%,表明 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素对獭兔盲肠菌群结构有一定影响,但这种结构的变化并没有在盲肠菌群多样性指数等方

面体现出显著差异。RT-PCR 技术定量检测盲肠菌群中常见菌群,硫酸粘杆菌素能减少盲肠内梭菌属 IV、肠杆菌属的数量,能明显增加梭菌属 XIVa、肠球菌属、链球菌属的数量。李梦云等<sup>[23]</sup>研究显示,硫酸粘杆菌素对大肠杆菌和沙门氏菌体外抑菌效果显著。硫酸粘杆菌素对革兰氏阴性菌(肠杆菌科)有较强的抗菌效果,能减少獭兔盲肠内革兰氏阴性菌的数量。蔡辉益等<sup>[24]</sup>研究表明:硫酸粘杆菌素抑制肉鸡盲肠中大肠杆菌(阴性菌)的生长,从而引起肠道菌群变化,使双歧杆菌(阳性菌)等得以增值。革兰氏阴性菌数量减少,革兰氏阳性菌(梭菌属 XIVa、肠球菌属、链球菌属)就处于优势,进而数量增多。这种此消彼长的动态变化,并没有在盲肠总菌数体现显著差异,表明硫酸粘杆菌素能维持肠道菌群平衡,且能抑制某些肠道革兰氏阴性病原菌。Beutler 等<sup>[25]</sup>研究表明,Toll 样受体负责识别细菌和信号传导,为先天免疫提供了特异性免疫。TLR2 和 TLR4 在抗细菌感染中起着核心作用。在本试验中,Ⅱ组回肠 TLR4 mRNA 相对表达量及盲肠 TLR2/4 mRNA 相对表达量高于Ⅰ组,且盲肠 TLR4 变化显著。TLR4 识别革兰氏阴性菌的 LPS,TLR2 识别革兰氏阳性菌的肽聚糖和脂磷壁酸及革兰氏阴性菌的脂蛋白<sup>[26]</sup>。硫酸粘杆菌素主要作用于革兰氏阴性菌,细菌裂解暴露出更多的配体,激发肠道 Toll 样受体增多,将信号进一步传递,进而增强獭兔肠道免疫。越来越多的研究显示,抗生素的使用存在一定的剂量-时间-效应关系,过度使用抗生素将导致肠道菌群失调,造成腹泻。本试验中结合 PCR-DGGE、RT-PCR 技术及肠道组织 TLR2/4 表达量分析,表明 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素并没有引起盲肠菌群失调,且能提高肠道免疫,对于獭兔养殖是适宜的。

#### 3.2 对獭兔脾脏、肝脏生长发育及功能的影响

脾脏、肝脏作为动物机体重要的免疫器官,免疫器官指数在一定程度上反映了其生长发育状况。免疫器官质量增加是由于其自身细胞生长发育和分裂增殖所致,是免疫增强的表现,免疫器官重量的降低为免疫抑制所致<sup>[27]</sup>。Toll 样受体介导宿主防御反应,Kajikawa 等<sup>[28]</sup>研究兔大肠杆菌肺炎病中发现:机体为了抵御病原菌,远距离免疫器官脾脏、肝脏等组织 TLR2、TLR4 表达量增加。脾脏、肝脏组织中 TLRs 的表达能反应其免疫功能。本试验中添加 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素能明显提高獭兔脾脏指数,

脾脏组织 TLR2/4 mRNA 相对表达量均高于 I 组, 硫酸粘杆菌素明显提高獭兔脾脏指数可能是脾脏组织 TLR2/4 表达量增加, 免疫功能提高, 进而促进生长发育。有报道显示<sup>[29]</sup>, 肝脏门静脉血液长期暴露于肠道微生物及其产物中, 通过调控 TLRs 信号来调节天然免疫应答, 肝脏并未发生明显炎症。试验组獭兔肝脏组织 TLR2/4 表达量变化可能因为: 硫酸粘杆菌素抑制革兰氏阴性菌生长, 促进革兰氏阳性菌生长。阴性菌的减少, 导致 TLR4 表达量降低。阳性菌的增多, 导致 TLR2 表达量增加。

### 3.3 对外周血细胞因子的影响

宿主对抗体内各种致病菌时, 白介素、干扰素、肿瘤坏死因子等炎症细胞因子起重要免疫应答作用<sup>[30]</sup>。IL-2、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  等由 Th1 细胞产生, 调节细胞免疫; IL-4、IL-10 等由 Th2 细胞产生, 调节体液免疫<sup>[31]</sup>。当 Th1 细胞占优势时, 将促进细胞免疫反应有利于清除细胞内的病原体; 当 Th2 细胞占优势时, 将促进体液免疫反应, 并抑制细胞免疫<sup>[32]</sup>。Th1 和 Th2 之间的动态平衡, 能维持机体正常免疫功能。本试验研究显示: 獭兔外周血细胞因子 IL-1、IL-2、IL-4 含量高于 I 组, 而 IL-6、IL-10、IL-12、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  的含量低于 I 组。除 IL-4 外, 其他外周细胞因子均无显著变化, 说明硫酸粘杆菌素对獭兔外周血细胞因子含量有一定的影响, 但没有破坏其平衡而造成病态。这可能是因为硫酸粘杆菌素促进肠道革兰氏阳性菌增长, 肠道粘膜接触多是阳性菌, 它们通过特异性和非特异性免疫途径刺激肠道免疫, 使炎症细胞因子维持一定的水平<sup>[30]</sup>, 进而维持动物机体健康。试验结果 IL-6、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  的含量均有降低, IL-4 的含量显著增加。IL-6、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  作为促炎性细胞因子<sup>[33-35]</sup>, 在彼此之间的相互作用下, 能促进炎性疾病的发生。抗炎因子 IL-4 通过刺激 T 细胞自身分泌, 刺激 B 细胞增殖, 促进巨噬细胞提呈抗原和杀伤肿瘤细胞等来抑制炎症的发生。综上所述硫酸粘杆菌素能有效抵制獭兔机体炎症的发生。

## 4 结论

饲料中添加 20 mg/kg 硫酸粘杆菌素能促进獭兔脾脏生长发育, 提高肝脏、脾脏免疫力; 不影响盲肠菌群多样性, 但能引起部分菌群数量的改变, 能增加回肠、盲肠免疫力; 对獭兔机体抗炎有一定的促进作用。

## 参 考 文 献

- [1] 朱永和. 肉兔腹泻病发生的原因及防治措施[J]. 畜禽业, 2012(8):0084-0086  
Zhu Y H. Causes of diarrhea and control measures in rabbit [J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2012(8):0084-0086 (in Chinese)
- [2] 李慧, 谢正福. 抗生素对机体免疫功能的影响[J]. 医学综述, 2009, 15(14):2179-2182  
Li H, Xie Z F. Effects of antibiotics on immune function of organism[J]. *Medical Review*, 2009, 15(14):2179-2182 (in Chinese)
- [3] 马红伟, 吴涛, 肖飞, 高海鹏, 邱银生. 阿莫西林和硫酸粘杆菌素对猪鸡大肠杆菌和沙门氏菌的体外联合抗菌作用[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(5):30-32  
Ma H W, Wu T, Xiao F, Gao H P, Qiu Y S. *In vitro* antibacterial activity of amoxicillin combination with colistin sulfate against *Escherichia coli* and *Salmonella* from pig and chicken[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2009, 43(5):30-32 (in Chinese)
- [4] 江善祥, 陈绍峰. 硫酸粘杆菌素对大肠杆菌的抗生素后效应[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6):604-606  
Jiang X X, Chen S F. The *In-vitro* Post-antibiotic effect of colistin sulfate on *E coli* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, 23(6):604-606 (in Chinese)
- [5] 刘淑华, 王德义, 牛书玉. 硫酸粘杆菌素的药理特性与临床应用[J]. 兽药市场指南, 2014(1):45-45  
Liu S H, Wang D Y, Niu S Y. Pharmacological properties and clinical application of *Bacillus sulfate* [J]. *Veterinary Drug Market Guide*, 2014(1):45-45 (in Chinese)
- [6] 王宁. 盐霉素与硫酸粘杆菌素在断奶仔猪日粮中的应用效果[D]. 北京: 中国农业大学, 2005  
Wang N. Study on effects of salinomycin and colistin incorporated in diets of weanling pigs [D]. Beijing: China Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [7] 马改彦, 石慧芹, 马秋刚, 邹君彪, 赵丽红. 不同抗生素组合在白羽肉鸡中应用效果研究[J]. 国外畜牧学:猪与禽, 2015, 35(5):91-94  
Ma G Y, Shi H Q, Ma Q G, Zou J B, Zhao L H. The study of different antibiotic combinations in white featherbroilers [J]. *Foreign Animal Husbandry: Pigs and Poultry*, 2015, 35(5):91-94 (in Chinese)
- [8] 尹富贵, 孔祥峰, 何庆华, 刘合君, 印遇龙, 黄瑞林. 硫酸粘杆菌素防治早期断奶仔猪腹泻的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007(10):611-611  
Yin F G, Kong X F, He Q H, Liu H J, Yin Y L, Huang R L. Study on the prevention and treatment of early weaned piglets diarrhea with the colistin sulfate [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2007(10):611-611 (in Chinese)
- [9] Walter J, Hertel C, Tannock G W, Lis C M, Munro K, Hammes



- W P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2578-2585
- [10] 倪学勤, 曾东, 周小秋. 采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 955-961  
Ni X Q, Zeng D, Zhou X Q. The Bacterial community and diversity in the layer gastrointestinal tract; From crop to cecum analyzed by PCR-DGGE[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(7): 955-961 (in Chinese)
- [11] Denman S E, McSweeney C S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(3): 572-582
- [12] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7220-7228
- [13] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5445-5451
- [14] Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6): 1166-1177
- [15] Hooper L V, Wong M H, Thelin A, Hansson L, Falk P G, Gordon J I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. *Science*, 2001, 291(5505): 881-884
- [16] Franks A H, Harmsen H J M, Raangs G C, Jansen G J, Schut F, Welling G W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with Group-specific 16sRNA-tageted oligonucleotid probes [J]. *Applied and Enviromental Microbiology*, 1998, 64(9): 3336-3345
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [18] Kajikawa O, Frevert C W, Lin S M, Goodman R B, Mongovin S M, Wong V, Ballman K, Daubeuf B, Elson G, Martin T R. Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia [J]. *Gene*, 2005, 344: 193-202
- [19] 苑清国. 兔盲肠的生理及其消化特点 [J]. 养殖技术顾问, 2010(2): 186  
Yuan Q G. Physiological and digestive characteristics of appendix in rabbit [J]. *Breeding Technical Consultant*, 2010(2): 186 (in Chinese)
- [20] Emaldi O, Crociani F, Matteuzzi D, Proto V. A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft and hard faeces of rabbit [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1979, 46(1): 169-172
- [21] Macfarlane S, Hopkins M J, Macfarlane G T. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine [J]. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, 12(2): 64-72
- [22] 冀朵朵. 戊糖乳杆菌的粘附能力及对肠道菌群的调节 [D]. 北京: 北京林业大学, 2009  
Yi D D. The adhesion ability of *Lactobacillus pentosus* and regulation of intestinal flora [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009 (in Chinese)
- [23] 李梦云, 胡迎丽, 乔宏兴, 夏梦芳, 郭建来. 硫酸粘杆菌素体外抑菌效果的研究 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2014(2): 8-10  
Li M Y, Hu Y L, Qiao H X, Xia M F, Guo J L. Study on Colistin sulfate antibacterial effect in vitro [J]. *Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering*, 2014(2): 8-10
- [24] 蔡辉益, 王俐, 刘国华, 于会民. 金霉素、粘杆菌素对肉鸡肠道微生物的影响及其与肉鸡核黄素营养的关系研究 [J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(1): 46-49  
Cai H Y, Wang L, Liu G H, Yu H M. Study on the effects of chlortetracycline, colistin on intestinal microflora of Broilers and its relationship with Riboflavin Nutrition in Broilers [J]. *Animal Science and Veterinary Medicine*, 2001, 18(1): 46-49 (in Chinese)
- [25] Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: The Toll-like receptors and their transducers [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74: 479-485
- [26] Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning C J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 17406-17409
- [27] 刘婷婷, 滑静, 王晓霞, 刘莉如, 海鹏. 丁酸梭菌对蛋用仔公鸡生长性能、免疫指标及空肠组织相关细胞因子基因 mRNA 表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1302-1310  
Liu T T, Hua J, Wang X X, Liu L R, Hai P. *Clostridium butyricum* affects growth performance, immune indices and mRNA expression of related cytokine genes in jejunum of egg-laying male chicks [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(7): 1302-1310 (in Chinese)
- [28] Kajikawa O, Frevert C W, Lin S M, Goodman R B, Mongovin S M, Wong V, Ballman K, Daubeuf B, Elson G, Martin T R. Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia [J]. *Gene*, 2005, 344: 193-202
- [29] 马洪第, 廉哲雄. 肠道微环境与肝脏疾病 [J]. 中国免疫学杂志,

- 2015(8):1009-1013
- Ma H D, Lian Z X. Intestinal microenvironment and liver diseases[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2015(8): 1009-1013 (in Chinese)
- [30] 倪江, 杨维仁, 高权新, 张崇玉, 刘法孝, 孙小沛. 不同抗生素对岭南黄肉鸡生产性能和肠道免疫影响的研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 819-825
- Ni J, Yang W R, Gao Q X, Zhang F X, Liu F X, Sun X P. Influences of antibiotics on the growth performance and intestinal immunity of lingnan yellow broilers [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(4): 819-825 (in Chinese)
- [31] Kamizono S, Ohya H, Higuchi S, Okazaki N, Narita M. Three familial cases of drug-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *European Journal of Pediatrics*, 2010, 169(6): 721-726
- [32] Principi N, Esposito S, Blasi F, Arosio C, Fioravanti L, Fagetti L, Droghetti R, Tarsia P, Allegra L, Principi N. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 32(9): 1281-1289
- [33] Feldmann M, Maini R N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis; what have we learned[J]. *Annual Review of Immunology*, 2011, 19: 163-196
- [34] Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages [J]. *Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression*, 2010, 20(2): 87-103
- [35] 代丽, 单安山, 孙进华.  $\gamma$ -干扰素的研究进展及畜牧中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 0051-0057
- Dai L, San A S, Sun J H. Research progress of interferon gamma and its application in animal husbandry [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary*, 2009, 36(4): 0051-0057 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕