

阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物环境对感染致病性大肠杆菌犊牛免疫力的影响

贾知锋¹ 王纯洁^{1*} 敖日格乐² 贺美玲² 张欣³ 徐进¹
吕文亭¹ 付鹤¹ 任书男¹ 田艳萍¹ 刘佳乐¹

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018;
2. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;
3. 内蒙古医科大学 基础医学院, 呼和浩特 010110)

摘要 为探讨阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃共生菌与大肠杆菌性腹泻犊牛免疫力相互作用的影响, 选择 30 头荷斯坦犊牛随机分为正常对照组(NC)、未治疗组(UC)、抗菌药物组(CIP, 0.50 mg/kg)、蒙药阿茹拉-7 味散低(BSP. L, 1.25 g/kg)、中(BSP. M, 2.50 g/kg)、高(BSP. H, 5.0 g/kg)剂量组, 每组 5 头, 给药 7 d 后, 采集血样。利用 16S rRNA 测序技术检测瘤胃微生物组成和 ELISA 检测血清中白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 4(IL-4)、白介素 2(IL-2)和干扰素 γ (IFN- γ)的含量。结果表明:(1)与 NC 组相比, UC 组中 ACE 指数显著降低($P < 0.05$);与 UC 组相比, BSP. M 组中 Chao1 指数、Shannon 指数和 ACE 指数显著升高($P < 0.05$)。(2)与 NC 组相比, UC 组中梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的水平显著升高($P < 0.05$);与 UC 组相比, BSP. L、BSP. M 和 BSP. H 组中梭杆菌门、变形菌门和大肠杆菌的水平显著降低($P < 0.05$), 且 BSP. L 组中柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)的水平显著升高($P < 0.05$)。(3)BSP. M 组犊牛体重和平均日增重显著增加($P < 0.05$), 还可以降低腹泻率。(4)与 UC 组相比, BSP. M 组血清中 IL-4、IL-2 和 IFN- γ 的含量显著升高, 显著降低 IL-6 和 TNF- α 的含量($P < 0.05$)。综上所述, 中剂量阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物环境对感染致病性大肠杆菌犊牛瘤胃菌群数量增加, 丰富度和多样性上升, 增加有益菌群所占比例, 降低条件致病菌所占比例, 增强抗炎、免疫能力, 降低腹泻发生的风险。

关键词 阿茹拉-7 味散; 致病性大肠杆菌; 瘤胃微生物; 16S rRNA 测序

中图分类号 S853.75; S865.1

文章编号 1007-4333(2020)12-0058-09

文献标志码 A

Effect of rumen microbiota environment formed by Baatar-7 powder early intervention on immunity of calves infected with pathogenic *Escherichia coli*

JIA Zhifeng¹, WANG Chunjie^{1*}, Aorigele², HE Meiling², ZHANG Xin³, XU Jin¹, LV Wenting¹,
FU He¹, REN Shunan¹, TIAN Yanping¹, LIU Jiale¹

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
2. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
3. College of Basic Medical, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract The study was conducted to investigate the effect of the rumen microbiota environment formed by Baatar-7 powder early intervention on immunity in calves infected with pathogenic *Escherichia coli* O₁. A total of 30 Holstein

收稿日期: 2020-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760720)

第一作者: 贾知锋, 博士研究生, E-mail: sicau2016_1@163.com

通讯作者: 王纯洁, 教授, 主要从事动物生理调控机制研究, E-mail: chunjiewang200@sohu.com

calves were randomly divided into the normal control group (NC), untreated group (UC), ciprofloxacin group (CIP), Baatar-7 powder low (1.25 g/kg, BSP.L), medium (2.50 g/kg, BSP.M) and high (5.0 g/kg, BSP.H) groups ($n = 5$). At 7 days after administration, blood samples were collected. The rumen contents were detected by 16S rRNA sequencing technology, and the levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 4 (IL-4), interleukin 2 (IL-2) and Interferon γ (IFN- γ) in serum were detected by ELISA. The results showed that: 1) Compared with the NC group, ACE index in the UC group was significantly decreased ($P < 0.05$); Compared with the UC group, the Chao1 index, Shannon index, and ACE index in the BSP.M group were significantly increased ($P < 0.05$). 2) Compared with the NC group, the level of abundance of Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria and *E. coli* in the UC group were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with the UC group, the levels of Fusobacterium, Proteobacteria, and *Escherichia coli* in the BSP.L, BSP.M, and BSP.H groups were significantly reduced ($P < 0.05$), but in the BSP.L group, the level of *Faecalibacterium* was significantly increased ($P < 0.05$). 3) The body weight and average daily gain of calves in BSP.M group were significantly increased ($P < 0.05$), and the diarrhea rate was also decreased. 4) Compared with the UC group, the serum levels of IL-4, IL-2, and IFN- γ in BSP.M group were significantly higher those in UC group, and the levels of IL-6 and TNF- α were significantly lower ($P < 0.05$). In summary, the rumen microbiota environment formed by the early intervention of medium dose of Baatar seven powder increased the number, richness and diversity of ruminal microflora infected with the pathogenic *E. coli*, increased the proportion of beneficial microflora, reduced the proportion of opportunistic pathogens, enhanced anti-inflammatory and immune capabilities, and reduced the risk of diarrhea.

Keywords Baatar-7 powder; pathogenic *Escherichia coli*; rumen microbiota; 16S rRNA sequencing

在现代养牛业中,多种病原菌可导致犊牛腹泻病的发生,其中致病性大肠杆菌(*Pathogenic Escherichia coli*)占比重较大^[1]。大肠杆菌性动物腹泻主要是由肠道炎症引起,常导致犊牛生长发育停歇、免疫力低下、发病率和死亡率较高^[2]。研究者发现腹泻多发生于幼龄动物均与瘤胃菌群紊乱有关^[3]。瘤胃菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、放线菌门和变形菌门等优势菌群形成生物学屏障,起到保护作用^[4]。早期瘤胃菌群的形成是在各方面因素(如环境、母乳和益生菌等)的影响下,才使得犊牛瘤胃提前建立起适应外界环境的稳定状态^[5]。目前临床治疗致病性大肠杆菌病首选抗生素,长期使用抗生素显著影响胃肠道菌群多样性,降低药物疗效,出现耐药性和药物残留等问题^[6]。因此,研究者开始寻求天然绿色新产品,望其减少抗生素使用。

植物性药物在进入胃肠道后,促进胃肠道内有益菌的定植,从而形成一道天然屏障来抵御外来病原菌的入侵^[7]。草药复方具有调节菌群结构和缓解肠道炎症的作用,有望替代抗生素治疗大肠杆菌性动物腹泻^[8]。作为蒙医药学重要部分的蒙药,以其纯天然来源和保肝、保肾、抗菌、消炎、滋补、低残留、低毒副作用和耐药性小的作用特点,在当今依然发挥着不可替代的作用^[9]。阿茹拉-7味散(又称为古方巴特尔-7)属于经典验方,被《中华人民共和国卫

生部药品标准(蒙药分册)》收录,根据其药效学研究发现,该方具有清瘟解毒、镇痛、止痢和提高免疫力等功效^[10],因在治疗人类腹泻^[9]、消化性溃疡^[10]和银霄病^[11]等方面有很好的疗效,被广泛应用。然而,阿茹拉-7味散能否提前建立瘤胃菌群环境来抵御致病性*E. coli*的入侵,并且与抗炎、免疫形成互动尚未有相关研究。因此,本研究选择30头1日龄健康荷斯坦犊牛为试验动物,建立阿茹拉-7味散早期干预形成瘤胃微生物环境的动物模型,在牛奶中添加不同剂量的阿茹拉-7味散,通过16S rRNA测序技术对犊牛瘤胃微生物多样性以及菌落结构组成和丰度进行分析;通过RT-PCR法检测瘤胃中大肠杆菌的含量;通过ELISA法检查血清中IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-2和IFN- γ 的含量,探讨阿茹拉-7味散在早期建立犊牛瘤胃共生益生微生物组和免疫力形成互动的作用机制,为阿茹拉-7味散生产实践应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

选择30头体重相近(30 ± 2 kg)的1日龄健康荷斯坦犊牛,购自山西河滩奶牛育种有限公司。

1.1.2 试验材料

牛源致病菌 *Escherichia coli* O₁ 保存于内蒙古

农业大学牛生产学实验室^[12];盐酸环丙沙星购自成都新亨药业有限公司;阿茹拉-7 味散由诃子、茜草、甘松、翻白草、瞿麦、乳香和草乌叶组成,购自内蒙古呼和浩特市天力药业有限公司;KAPA HiFi HotStart ReadyMIX,购自美国 KAPA 生物公司;琼脂糖,购自天津基准化学试剂公司;DNA Template Prep Kit 1.0,购自美国太平洋生物学公司;Agilent DNA 12000 Reagents,购自美国安捷伦科技有限公司;DNA Sequencing Bundle 4.0,购自太平洋生物科学公司;ELISA 试剂盒购自内蒙古呼和浩特市宝信生物公司。

1.1.3 试验仪器

酶标仪(Synergy HT,上海迭戈生物科技有限公司);PCR 仪(Biosafar 公司,德国)。

1.2 试验方法

1.2.1 阿茹拉-7 味散的制备

将诃子、茜草、甘松、翻白草、瞿麦、乳香和草乌叶粉碎,过 200 目筛,再按照 3:2:2:2:1:2:2 的比例配伍用药^[9]。

1.2.2 试验动物模型的建立及给药方案

荷斯坦犊牛实验方案均已获得内蒙古农业大学

牲畜护理委员会的批准,并按照内蒙古农业大学兽医学院动物伦理委员会的指导方针进行。1 周龄犊牛每日 4 L 牛奶,分别将试验药品混于牛奶中,并于 6:30 和 18:30 分别进行人工饲喂。犊牛饲养管理参见文献^[13]。

选择 30 头体重相近 1 日龄的健康荷斯坦犊牛,随机分成 6 组,每组 5 头牛见表 1。将各试验药物混于牛奶中给药,先给药 4 d,2 次/d,于第 5 d 早上口服 *E. coli* O₁ (2.50×10^{11} CFU/mL, 100 mL/头) 1 h 后再继续给药,未治疗组(Untreated control, UC)、环丙沙星组(Ciprofloxacin, CIP)、阿茹拉低剂量组(Low dose of Baatar seven powder, BSP. L)、阿茹拉中剂量组(Medium dose of Baatar seven powder, BSP. M)和阿茹拉高剂量组(High dose of Baatar seven powder, BSP. H)组犊牛经口服接种致病性 *E. coli* O₁ 建立腹泻模型,对照组(Normal control, NC)犊牛口服无菌生理盐水,其它给药组再继续给药至第 7 d,2 次/d。于第 7 d 末次给药 1 h 后将犊牛在标准化屠宰场放血致死,同时,用采血管颈静脉采集血液,分离血清,用棉签采集瘤胃内容物装入冻存管放于液氮保存用于后续试验。

表 1 试验动物模型的建立及给药方案

Table 1 Establishment of experimental animal model and administration plan

组别 Group	犊牛数量/头 No. of calves	给药方案 Administration program
NC 组	5	口服生理盐水至第 7 d
UC 组	5	口服生理盐水 4 d 后,于第 5 d 口服给菌,再继续灌服生理盐水至第 7 d
CIP 组	5	口服环丙沙星 0.5 mg/kg,于第 5 d 口服给菌,再继续灌服 CIP 至第 7 d
BSP. L 组	5	口服有效成分 1.25 g/kg,于第 5 d 口服给菌,再继续灌服 BSP. L 至第 7 d
BSP. M 组	5	口服有效成分 2.50 g/kg,于第 5 d 口服给菌,再继续灌服 BSP. M 至第 7 d
BSP. H 组	5	口服有效成分 5.0 g/kg,于第 5 d 口服给菌,再继续灌服 BSP. H 至第 7 d

注:NC=正常对照组、UC=未治疗组、CIP=环丙沙星组和阿茹拉-7 味散低(BSP. L)、中(BSP. M)、高(BSP. H)剂量组。下同。

Note: NC=Natural control group; UC=Untreated control group; CIP=Ciprofloxacin group; BSP. L=Low dose of Baatar seven powder; BSP. M=Medium dose of Baatar seven powder; BSP. H=High dose of Baatar seven powder. The same below.

1.2.3 犊牛血清细胞因子的检测

第 7 d 末次给药 1 h 后,通过颈静脉采集犊牛血液,静止 1 h 后,离心(在 4 °C 下 3 000 g 离心 15 min)分离血清,并保存于 -20 °C 冰箱。使用 ELISA 试剂盒测量 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-2 和

IFN- γ 的含量^[14]。

1.2.4 细菌 DNA 的提取和 16S rRNA 基因序列扩增
给药 7 d 后,将犊牛放血致死,采用 QIAamp Fast DNA Stool Mini-Kit 试剂盒(根据说明书操作)对犊牛瘤胃内容物提取细菌 DNA,经 1.0%琼脂糖

凝胶电泳和紫外分光光度计检验细菌 DNA 纯度 ($OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$) 和质量浓度 ($100\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 将合格的 DNA 置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。利用 PCR 对每份样品的 DNA 进行 16S rRNA 基因 V3+V4 区扩增, 使用 Thermofisher 的 IonS5™ XL 进行上机测序 (测序模式为 SE600)。正向通用引物为 341F ($5'$ -CCTAYGGGRBGCASCAG- $3'$), 反向通用引物为 805R ($5'$ -GGACTACNNGGGTATCTAAT- $3'$)。这对引物被用于扩增细菌 16S rRNA 基因 V3+V4 区序列, PCR 扩增反应 $50\ \mu\text{L}$ 体系参考^[15]: 包括 $10\ \text{ng}/\mu\text{L}$ ($5\ \mu\text{L}$) 模板 DNA、 $5\ \mu\text{L}$ Taq 聚合酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$; TaKaRa, Japan) 以及上下游引物各 $1\ \mu\text{L}$ ($10\ \mu\text{mol}/\text{L}$)。使用 GeneJET 胶回收试剂盒 (Thermo Scientific 公司) 回收 PCR 纯化产物。最后将纯化产物送往北京诺禾致源科技股份有限公司上机测序。利用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 分析 Alpha 多样性^[16]。

大肠杆菌检测: 将腹泻犊牛瘤胃内容物合格的 DNA 用荧光定量 PCR 法检测大肠杆菌 O1:K88 (引物设计: F: $5'$ -AAGGGAAATGTGGTGAAA- $3'$; R: $5'$ -CGGTTTCTTCTTGTAAATCG- $3'$) 的含量。反应体系为 $25\ \mu\text{L}$: $12.5\ \mu\text{L}$ 的 PCR Master Mix, 上下游引物各 $1.0\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $3.0\ \mu\text{L}$, $7.5\ \mu\text{L}$ ddH₂O, PCR 程序设置: 预变性 ($92\ ^\circ\text{C}$,

$45\ \text{s}$), 变性 ($92\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$), 退火 ($60\ ^\circ\text{C}$, $45\ \text{s}$), 延伸 ($72\ ^\circ\text{C}$, $1\ \text{min}$), 共 40 个循环, 终端延伸 ($72\ ^\circ\text{C}$, $45\ \text{s}$), 终止 ($4\ ^\circ\text{C}$)^[8]。

1.3 数据统计

数据用平均数±标准误表示。采用 SPSS 22.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 犊牛瘤胃内容物细菌菌落 Alpha 多样性分析

香农指数 (Shannon index)、辛普森指数 (Simpson index)、Chao1 指数和 ACE 丰富度指数是用于评估物种的多样性和丰富度见表 2。给药 7 d 后, 与 NC 组相比, UC 组中 Shannon 指数 ($P=0.114$)、(Simpson 指数 ($P=0.768$) 和 Chao1 指数 ($P=0.053$) 无显著差异, 但 ACE 指数在 UC 组中显著降低 ($P=0.013$); 与 UC 组相比, BSP. M 组中 Chao1 指数 ($P=0.001$)、Shannon 指数 ($P=0.023$) 和 ACE 指数 ($P=0.0001$) 显著升高; BSP. L 组中 Shannon 指数、Simpson 指数和 ACE 指数较 UC 组显著降低 (均为 $P=0.0001$), BSP. H 组中多样性指数无显著性差异 ($P>0.05$); 说明 BSP. M 组的犊牛瘤胃微生物菌群多样性和丰富度较高。结果表明, BSP. M 组样品表现出较高水平的细菌生物多样性。

表 2 不同剂量的阿茹拉-7 味散对犊牛瘤胃微生物 Alpha 多样性的影响

Table 2 Effects of different doses of Baatar-7 powder on calf rumen microbial Alpha diversity

指数 Index	NC 组 NC group	UC 组 UC group	CIP 组 CIP group	BSP. L 组 BSP. L group	BSP. M 组 BSP. M group	BSP. H 组 BSP. H group
Shannon	5.22 ab	4.73 b	5.59 a	2.34 c	5.45 a	4.82 b
Simpson	0.91 ab	0.92 ab	0.95 a	0.53 c	0.93 ab	0.89 b
Chao1	548.54 ab	396.79 bc	556.70 a	320.93 c	694.24 a	496.35 ab
ACE	554.77 ab	400.58 c	561.16 ab	327.88 d	662.48 a	504.05 bc

注: 相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: The values with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.2 阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物对感染致病性大肠杆菌犊牛细菌门、属水平菌群丰度的影响

给药 7 d 后, 为寻找 6 组之间优势物种的差异, 通过 Version 3.8.31 比对发现, 6 组样本在门和属水平上平均丰度 (存在显著差异) 排名前 10 的物种

见表 3。在门水平, 与 NC 组相比, UC 组中梭杆菌门、变形菌门、放线菌门和梭杆菌属的丰度均极显著升高 ($P<0.05$); 在属水平, UC 组中拟杆菌属 ($P=0.975$)、柔嫩梭菌属 ($P=0.926$) 和毛螺菌球菌属 ($P=0.234$) 的丰度较 NC 组均无显著变化。

与 UC 组相比, BSP. L、BSP. M 和 BSP. H 组中

梭杆菌门和变形菌门的丰度极显著降低 ($P < 0.05$), 并且 BSP. L 和 BSP. H 组中放线菌门的丰度极显著降低 ($P = 0.0001$); BSP. L 组中柔嫩梭菌属

显著升高 ($P = 0.045$), BSP. L ($P = 0.001$) 和 BSP. M 组 ($P = 0.001$) 中毛螺菌球菌属的丰度显著升高 ($P < 0.05$)。

表 3 不同剂量的阿茹拉-7 味散对犊牛瘤胃微生物丰度的影响

Table 3 Effects of different doses of Baatar-7 powder on the rumen microbial structure of calves

分类 Taxonomy	NC 组 NC group	UC 组 UC group	CIP 组 CIP group	BSP. L 组 BSP. L group	BSP. M 组 BSP. M group	BSP. H 组 BSP. H group	%
门水平 Phylum							
厚壁菌门	27.13±4.03 d	21.93±6.36 de	43.25±7.36 c	90.99±1.66 a	74.65±3.03 b	19.81±4.88 de	
拟杆菌门	34.59±7.93 b	44.47±12.45 ab	39.68±9.57 b	5.99±1.11 c	12.77±1.48 c	52.60±8.29 a	
变形菌门	29.43±10.34 b	9.77±4.76 a	4.21±1.95 b	2.47±0.83 b	4.47±2.30 b	17.70±5.34 b	
梭杆菌门	2.67±2.13 b	16.10±3.19 a	3.88±0.06 b	0.05±0.01 b	0.42±0.21 b	1.87±0.40 b	
放线菌门	1.25±0.56 cd	7.26±2.52 a	2.11±0.36 c	0.15±0.03 d	5.67±1.28 a	0.79±0.05 cd	
属水平 Genus							
拟杆菌属	24.22±13.05 a	24.40±8.03 a	7.33±2.81 b	5.57±1.06 b	0.60±0.01 b	33.78±12.49 a	
柔嫩梭菌属	0.48±0.06 c	0.11±0.05 c	7.11±0.14 a	3.15±0.52 b	0.32±0.19 c	0.06±0.00 c	
毛螺菌球菌属	2.26±1.05 b	0.54±0.07 b	0.19±0.06 c	7.09±0.73 a	18.98±4.72 a	0.39±0.17 c	
梭杆菌属	2.65±0.21 b	16.04±3.20 a	3.79±0.06 b	0.04±0.01 b	0.35±0.00 b	1.79±0.39 b	

注:厚壁菌门 Firmicutes; 拟杆菌门 Bacteroidetes; 变形菌门 Proteobacteria; 梭杆菌门 Fusobacteria; 放线菌门 Actinobacteria; 拟杆菌属 *Bacteroides*; 柔嫩梭菌属 *Faecalibacterium*; 毛螺菌球菌属 *Lachnospirillum*; 梭杆菌属 *Fusobacterium*。

2.3 阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物对感染致病性大肠杆菌犊牛瘤胃中大肠杆菌含量的影响

通过 RT-PCR 定量分析犊牛瘤胃中大肠杆菌的含量见表 4。给药 7 d 后,与 NC 组相比,UC 组中大肠杆菌的含量显著升高 ($P = 0.0001$);与 UC

组相比,BSP. L ($P = 0.004$)、BSP. M ($P = 0.002$) 和 BSP. H 组 ($P = 0.001$) 中大肠杆菌的含量显著下降 ($P < 0.05$);与 CIP 组相比,BSP. M ($P = 0.070$) 和 BSP. H 组 ($P = 0.101$) 中大肠杆菌的含量无显著差异,说明 BSP. M 和 BSP. H 组可降低大肠杆菌的水平,并与 CIP 相当。

表 4 不同剂量的阿茹拉-7 味散对犊牛瘤胃中大肠杆菌含量的影响

Table 4 Effects of different doses of Baatar-7 powder on the content of

<i>E. coli</i> in the rumen of calves						lgCFU/g
NC 组 NC group	UC 组 UC group	CIP 组 CIP group	BSP. L 组 BSP. L group	BSP. M 组 BSP. M group	BSP. H 组 BSP. H group	
5.24±0.06 d	9.67±1.30a	5.42±0.32cd	7.16±1.06b	6.82±0.11bc	6.67±0.21bcd	

2.4 阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物对感染致病性大肠杆菌犊牛腹泻率、体重以及平均日增重的影响

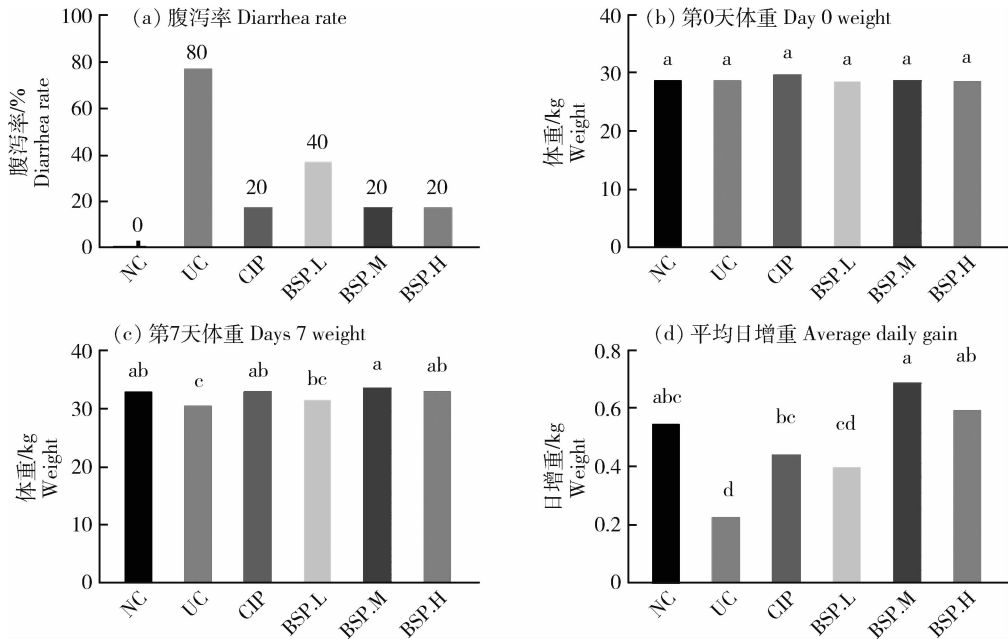
阿茹拉-7 味散对腹泻犊牛腹泻率的影响见图 1(a)。给药 7 d 后,NC 组无腹泻;UC 组犊牛腹

泻率达 80%;各用药组使犊牛腹泻率急剧下降;BSP. M 和 BSP. H 组犊牛腹泻率与 CIP 相同,下降到 20%,说明 BSP 可降低犊牛感染致病性 *E. coli* 引起腹泻发生的风险。

阿茹拉-7 味散早期干预形成的瘤胃微生物对

大肠杆菌性犊牛体重增加的影响见图1(b),给药第0 d,各试验组之间新生犊牛体重差异不显著($P>0.05$);给药7 d后,与NC组相比,UC组犊牛体重($P=0.021$,图1(c))和日增重($P=0.002$,图1(d))

显著降低($P<0.05$);与UC组相比,BSP.M和BSP.H组犊牛体重和日增重显著升高(均为 $P=0.001$, $P<0.05$),说明饲喂BSP.M和BSP.H可维持腹泻犊牛体重,有利于日增重增加。



在相同的直方图中,具有相同小字母上标的值均无显著性差异($P>0.05$),而具有不同小写字母上标的值均具有显著性差异($P<0.05$)。

The values with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while values with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

图1 不同组别的犊牛腹泻率、体重以及平均日增重

Fig. 1 The effect of different groups on diarrhea rate, weight gain and average daily gain of diarrhea calves

2.5 阿茹拉-7味散对感染致病性 *E. coli* O₁ 犊牛血清中免疫细胞因子的影响

阿茹拉-7味散对犊牛血清中抗炎、免疫细胞因子的影响见表5,给药7 d后,与NC组相比,UC组血清中IL-4($P=0.007$)、IL-2($P=0.0001$)和IFN- γ ($P=0.021$)的含量显著下降,但TNF- α ($P=0.010$)的含量显著升高;与UC组相比,BSP.M组血清中IL-4的含量显著升高($P=0.006$),并与NC($P=0.982$)和CIP组($P=0.421$)持平;BSP.L、BSP.M和BSP.H组血清中IL-2和IFN- γ 的含量显著升高(均 $P<0.05$);BSP.M和BSP.H组中IL-6和TNF- α 的含量显著降低(均 $P<0.05$),说明BSP可防止炎症的发生,调节抗炎、免疫因子的表达,增强机体免疫力。

3 讨论

已有研究表明致病性大肠杆菌是引起犊牛腹泻

最主要的致病菌^[2]。植物性药物通过调节肠道微生物可减轻葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎^[17],因此,植物性药物具有抑菌、杀菌、消炎、提高免疫力和改善胃肠道菌群等多种功能^[4]。基于植物性药物是多靶点、多水平的作用药物,通过饲料中添加不同剂量的藤黄提取物(藤黄素)对腹泻仔猪研究发现,藤黄素中、高剂量组中Shannon指数、Simpson指数和Chao1指数显著高于对照组,并且中剂量组在调节肠道菌群多样性方面效果优于高剂量组^[16]。因此,筛选出最佳剂量的植物性药物对临床用药具有指导意义。本研究中,与UC组和阿茹拉-7味散高剂量药物相比,BSP.M组多样性指数(Shannon指数和ACE指数)显著升高,说明阿茹拉-7味散中剂量药物瘤胃微生物丰富度和多样性高于UC组和中剂量药物,本研究与Wang等^[16]试验结果一致。

出生3日龄的犊牛瘤胃中优势菌门主要为拟杆菌门,有利于降解非纤维物质,而成年反刍动物瘤胃

表5 不同剂量的阿茹拉-7 味散对犊牛血清免疫细胞因子的影响

Table 5 Effects of Baatar-7 powder on immune cytokines in calves pg/mL

指标 Items	NC 组 NC group	UC 组 UC group	CIP 组 CIP group
IL-4	67.06±5.61 a	50.31±8.14 b	62.68±10.06 a
IL-2	131.74±6.21 a	90.59±13.21 b	124.60±15.37 a
IFN- γ	1 401.67±107.96 bc	1 229.44±28.87 d	1 541.94±85.15 ab
IL-6	165.66±4.02 abc	177.81±9.96 a	151.64±20.65 c
TNF- α	167.66±21.01 b	210.13±29.10 a	172.97±6.68 b

指标 Items	BSP. L 组 BSP. L group	BSP. M 组 BSP. M group	BSP. H 组 BSP. H group
IL-4	56.62±7.83 ab	67.18±2.54 a	55.75±9.57 ab
IL-2	126.39±11.99 a	132.94±8.31 a	130.38±17.69 a
IFN- γ	1 378.06±119.79 c	1 554.44±93.62 a	1 461.39±113.16 abc
IL-6	174.07±7.79 ab	149.89±11.92 c	156.20±11.43 bc
TNF- α	183.03±14.03 ab	168.86±27.09 b	171.77±19.52 b

中优势菌门主要为厚壁菌门,可降解纤维物质;随着犊牛的成长,犊牛瘤胃中拟杆菌门数量逐渐减少,厚壁菌门数量逐渐增加^[18]。本研究中,与 UC 和 CIP 组相比,BSP. L 和 BSP. M 组犊牛瘤胃内厚壁菌门细菌显著升高,拟杆菌门显著降低,这说明饲喂阿茹拉-7 味散改变犊牛瘤胃微生物结构可能有利于提前建立适应日粮的转化。多数梭杆菌门内的细菌是条件致病菌,而变形菌门包含大肠杆菌,多数为致病菌,易造成动物机体损伤,炎症加重^[19]。本研究中,不同剂量的 BSP 可显著降低犊牛瘤胃内梭杆菌门、变形菌门和大肠杆菌数量,并与抗生素组相当,这说明饲喂阿茹拉-7 味散具有抑制致病菌生长的作用,有望减少抗生素的使用。

在内热证中厚壁菌门丰度降低,拟杆菌门的丰度升高,一些清热证复方使拟杆菌门的丰度显著降低^[20]。灵芝菌丝体水提物可通过降低变形菌门的丰度保护肠道损伤,逆转菌群结构紊乱,减少 TNF- α 和 IL-6 的产生,炎症减轻^[21],因此可将变形菌门和大肠杆菌作为疾病微生物信号指标。梭杆菌门包含多种致病菌(如产气荚膜梭菌),产气荚膜梭菌对动物具有很大的毒性,可破坏肠黏膜结构^[22]。本研究中,与 UC 组相比,BSP 可显著增加犊牛血清中 IL-2 和 IFN- γ 的含量以及增加瘤胃微生物厚壁菌门的丰度;BSP. M 和 BSP. H 组显著降低 IL-6、

TNF- α 的含量和显著降低梭杆菌门和变形菌门的丰度,这说明饲喂 BSP 可通过增加厚壁菌门的细菌,抑制梭杆菌门和变形菌门细菌的生长有利于预防炎症的发生。

舒迎霜等^[19]发现黄芪总皂苷使结肠炎模型动物肠道中柔嫩梭菌属和毛螺菌球菌属增加,降低梭杆菌属和大肠杆菌的含量,降低肠道炎症,从而起到保护肠道的作用。Yan 等^[23]研究发现,黄芪多糖通过降低梭杆菌属的丰度,从而增加了抗炎(如 IL-2、IFN- γ 和 IL-4 等)水平。在本研究中,UC 随着 BSP. L 和 BSP. M 组犊牛瘤胃内毛螺菌球菌属和柔嫩梭菌属数量的升高,梭杆菌属和大肠杆菌数量的降低,TNF- α 和 IL-6 的产生减少,从这些结果推测阿茹拉-7 味散可提前建立有益菌来避免致病菌直接与肠壁接触,增强了 IL-2、IFN- γ 和 IL-4 的表达,减少炎症发生,提高了免疫力,促进了体重增加,最终达到降低腹泻的目的。

近年来,饲料安全问题备受关注,纯天然、无公害、无抗生素残留和功能全面的草药成为国内外研究的热点。在畜禽养殖业中,抗生素大量、广泛使用,迅速形成多种抗生素耐药的大量菌株,降低药物疗效。该方是一种以纯天然植物为原料,具有很强的保肝、保肾、抗菌、消炎、滋补、低残留、低毒副作用、耐药性小、调节胃肠道菌群和提高免疫力的作用

特点。本研究表明,阿茹拉-7味散早期干预建立的瘤胃微生物环境在一定程度上可使感染致病性 *E. coli* O₁ 犊牛瘤胃内菌群数量增多,多样性升高,且阿茹拉-7味散可使瘤胃内菌群结构发生变化,益生菌所占比例增加,条件致病菌水平下降,提高其抗炎、免疫机能,增强动物机体免疫功能,从而降低腹泻发生率。本研究为进一步开发利用植物性药物来改善感染大肠杆菌犊牛腹泻,提高机体抗炎、免疫和胃肠道菌群的功能提供了基础,并为植物性药物的生物学效应及其作为功能性饲料添加剂的潜力提供了理论基础和实验数据。

参考文献 References

- [1] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 周婷. 内蒙古呼和浩特地区牛源致病性大肠杆菌的血清型、毒力基因检测及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(10): 761-764
Yang S Q, Ao R G L, Wang C J, Zhou T. Prevalence of serotypes virulence susceptibility of bovine pathogenic genes and antimicrobial *Escherichia coli* isolates in Inner Mongolia [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(10): 761-764 (in Chinese)
- [2] 刘勃兴, 赵安奇, 柳翠翠, 刘畅, 李浩, 高桂生, 吴同全, 史秋梅, 张志强. 河北省犊牛腹泻大肠杆菌致病性及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(2): 133-138
Liu B X, Zhao A Q, Liu C C, Liu C, Li H, Gao G S, Wu T L, Shi Q M, Zhang Z Q. Pathogenicity and drug resistance of diarrhea *Escherichia coli* in calves in Hebei province [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(2): 133-138 (in Chinese)
- [3] Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? [J]. *United European Gastroenterology Journal*, 2015, 3(3): 255-260
- [4] Rey M, Enjalbert F, Combes S, Cauquil L, Bouchez O, Monteils V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(2): 245-257
- [5] 田可, 柳君辉, 董国忠. 早期瘤胃微生物区系发育及其调控[J]. 动物营养学报, 2018, 30(12): 4828-4834
Tian K, Liu J H, Dong G Z. Development and manipulation of rumen microbiota during early-life [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 30(12): 4828-4834 (in Chinese)
- [6] Jia Z F, Chen A R G L, Bao F X, He M L, Gao S M, Xu J, Zhang X, Niu P C, Wang C J. Effect of nisin on microbiome-brain-gut axis neurochemicals by *Escherichia coli*-induced diarrhea in mice [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119: 65-71
- [7] Xu J, Chen H B, Li S L. Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2017, 37(5): 1140-1185
- [8] 贾知锋, 王纯洁, 敖日格乐, 高瑞娟, 巴森胡. 乳酸链球菌素对大肠杆菌所致腹泻小鼠的脑-肠轴中单胺类神经递质的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(9): 1931-1939
Jia Z F, Wang C J, Ao R G L, Gao R J, Ba S H. Effect of nisin on monoamine neurotransmitters of mice with diarrhea induced by *Escherichia coli* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(9): 1931-1939 (in Chinese)
- [9] 姚媛媛. 致犊牛腹泻病肠道大肠杆菌的分离鉴定及蒙药复方对其抗菌效果研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2014
Yao Y Y. A study on the isolation and identification of *E. coli* from calf diarrhea and antimicrobial effect of Mongolian medicine on them [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [10] 李淑艳, 玉花. 蒙成药巴特日-7 抗炎作用的实验研究[J]. 内蒙古民族大学学报, 2016(2): 56-59
Li S Y, Yu H. Experimental study on the anti-inflammatory effect of Mongolian medicine Bateria-7 [J]. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities*, 2016(2): 56-59 (in Chinese)
- [11] 李玉秋. 巴特日七味丸联合阿维 A 胶囊治疗寻常性斑块型银屑病疗效观察[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2013, 12(3): 171-172
Li Y Q. Observation of the therapeutic effect of Bateria-7 pills combined with Awei A capsules on plaque psoriasis vulgaris [J]. *Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated*, 2013, (3): 171-172 (in Chinese)
- [12] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 满达, 斯木吉德, 刘文才. 抗致病性大肠杆菌蒙药及其组方筛选[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(3): 146-152
Yang S Q, Ao R G L, Wang C J, Man D, Si M J D, Liu W C. Selection of the compound Mongolian medicine on *Escherichia coli* inhibition by bacteriostasis experiment *in vitro* [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(3): 146-152 (in Chinese)
- [13] 高岩. 饲喂酸化乳对犊牛生长性能、血液免疫指标及粪便微生物多样性的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2018
Gao Y. Effects of feeding acidified milk on growth performance,