



李雪莉,虞德夫,王超,等.植物乳杆菌制剂对断奶仔猪肠道黏膜功能和微生物菌群及短链脂肪酸的影响[J].南京农业大学学报,2018,41(3):504–510.

植物乳杆菌制剂对断奶仔猪肠道黏膜功能和微生物菌群及短链脂肪酸的影响

李雪莉,虞德夫,王超,丁立人,朱伟云,杭苏琴*

(南京农业大学消化道微生物研究室,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在研究植物乳杆菌制剂对苏淮断奶仔猪肠道黏膜营养素转运体、紧密连接蛋白相关基因表达量、微生物菌群数量、短链脂肪酸及乳酸含量的影响。**[方法]**选取胎次和体质量(9.34 kg)相近的28日龄健康苏淮断奶仔猪144头,按饲喂日粮随机分为对照组(基础日粮)、抗生素组(基础日粮+抗生素)、植物乳杆菌制剂组(基础日粮+植物乳杆菌制剂),每组6个重复,每个重复8头仔猪。预饲期3 d,仔猪32日龄开始试验,59日龄试验结束时屠宰采样。采集十二指肠、空肠、回肠组织及黏膜样品分别用于黏膜营养素转运体和紧密连接蛋白相关基因表达量分析;分别收集盲肠和结肠食糜,测定短链脂肪酸和乳酸含量,RT-qPCR分析微生物菌群数量。**[结果]**与对照组相比,植物乳杆菌制剂组可显著上调十二指肠 *PepT1*、空肠 *SGLT-1* 和 *PepT1* 以及回肠 *SGLT-1* 基因的相对表达量($P<0.05$),与抗生素组相比,植物乳杆菌对各基因的相对表达量均无显著影响($P>0.05$);与对照组和抗生素组相比,植物乳杆菌制剂组可显著上调十二指肠 *Occludin*、空肠和回肠 *Occludin* 和 *ZO-1* 基因的相对表达量($P<0.05$),而对十二指肠、空肠、回肠其他基因无明显影响($P>0.05$);与对照组相比,植物乳杆菌制剂组可显著增加盲肠丁酸、结肠丁酸和乳酸的含量($P<0.05$),而对乙酸和丙酸无显著影响($P>0.05$);显著减少大肠杆菌数量($P<0.05$),显著增加结肠乳酸杆菌和梭菌XIVa群的数量($P<0.05$);相较于抗生素组,植物乳杆菌制剂可显著提高盲肠乳酸、结肠乳酸和丁酸含量以及盲肠和结肠中乳酸杆菌的数量($P<0.05$)。**[结论]**仔猪断奶时饲喂植物乳杆菌制剂可调节肠道黏膜营养素转运体及紧密连接蛋白相关基因表达量,提高短链脂肪酸和乳酸含量,促进肠道有益菌如乳酸杆菌、梭菌XIVa群的增殖,减少病原菌如大肠杆菌数量,从而促进肠道健康,缓解断奶应激。

关键词:植物乳杆菌制剂;断奶仔猪;营养素转运体;紧密连接蛋白;短链脂肪酸;微生物菌群

中图分类号:S816.79

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2018)03-0504-07

Effects of *Lactobacillus plantarum* on intestinal mucosa function, microbial community and short chain fatty acids in weaning piglets

LI Xueli, YU Defu, WANG Chao, DING Liren, ZHU Weiyun, HANG Suqin*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] The experiment aims to investigate the effects of *Lactobacillus plantarum* on genes expression of nutrient transporters, tight junction protein in small intestine mucosa, microbial populations, short chain fatty acids and lactic acid of Suhuai weaned piglets. [Methods] A total of 144 Suhuai weaned piglets(9.34 kg) at age of 28 days were randomly divided into 3 groups, including control group(basal diet), antibiotics group(basal diet supplemented with antibiotics) and *L. plantarum* group(basal diet supplemented with *L. plantarum*). Each group had 6 replicates and 8 piglets per replicate. The experiment started on day 32 and ended on day 59 after birth. On day 59, one piglet from each replicate was slaughtered for sampling. On the day of slaughter, the tissue and mucosa samples of duodenum, jejunum and ileum, and digesta samples of cecum and colon were collected, respectively. [Results] Compared with the control group, *L. plantarum* treatment increased mRNA expression of *PepT1* in duodenum($P<0.05$), *SGLT-1*, *PepT1* in jejunum and *SGLT-1* in ileum($P<0.05$). Further, *L. plantarum* increased mRNA relative expression of *Occludin* in duodenum, and *Occludin*, *ZO-1* in jejunum and ileum in comparison with the control and antibiotics group($P<0.05$). Results also showed that *L. plantarum* presented a higher concentration of buyrate in cecum, buyrate and lactic acid in colon than that in the control group($P<0.05$), while no significant effect was observed on the concentration of acetate and propionate. In terms of bacteria population, *L. plantarum* decreased the population of *Escherichia coli* in cecum and colon, increased the population of *Lactobacillus*

收稿日期:2017-06-21

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201403047);江苏省农业科技自主创新项目[CX(15)1006]

作者简介:李雪莉,硕士研究生。*通信作者:杭苏琴,教授,主要从事动物生殖道微生态与繁殖、动物营养、肠道微生态与动物健康等研究,

E-mail:suqinhang69@njau.edu.cn。

and *Clostridium cluster XIVa* in colon ($P < 0.05$). In contrast with the antibiotics group, *L. plantarum* elevated lactic acid concentration in cecum, butyrate and lactic acid concentration in colon, *Lactobacillus* population in cecum and colon ($P < 0.05$). [Conclusions] Our findings suggest that the administration of *L. plantarum* could maintain the intestine healthy and relieve weaning stress of piglets by regulating gene expression of nutrient transporters and tight junction protein in small intestine mucosa, increasing the short chain fatty acids and lactic acid concentration, promoting the proliferation of *Lactobacillus* and *C. cluster XIVa* and decreasing *E. coli* population in intestine.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; weaned piglets; nutrient transporter; tight junction protein; short chain fatty acids (SCFA); microbial community

近年来,抗生素滥用造成细菌耐药性、药物残留等问题日益严峻,寻找抗生素替代品已成为养殖业广泛共识。植物乳杆菌作为益生菌的主要代表菌株,受到广泛关注^[1]。研究表明,植物乳杆菌可提高仔猪日增重和饲料转化率,抑制大肠杆菌等条件性致病菌的生长,降低腹泻率;可增加仔猪肠道紧密连接蛋白的表达量,改善肠道屏障功能;能够促进断奶仔猪肠道有益菌增殖,调节菌群结构,维持机体健康^[2]。然而,有报道指出,植物乳杆菌菌种不同其特性也不尽相同,相同菌种的不同菌株其作用也不完全相同^[3]。

小肠黏膜细胞可参与营养物质的消化吸收、屏障保护及应激反应,是重要的功能细胞^[4]。钠葡萄糖转运体1(sodium cotransporters-1, SGLT-1)是单胃动物小肠黏膜上参与葡萄糖转运的主要载体,在肠道黏膜细胞刷状缘上单糖与SGLT-1结合后,再通过SGLT-1转运进入细胞,在膜细胞Na⁺-K⁺-ATP酶的作用下完成葡萄糖的运输^[5]。寡肽转运载体1(oligopeptide transporter 1, PepT1)是一种表达于小肠上皮细胞刷状缘膜上,对H⁺依赖、低亲和力、高容量寡肽转运体,PepT1基因多表达于消化道中,对寡肽的吸收起关键作用^[6]。然而,植物乳杆菌对上述营养素转运体影响的研究还鲜见报道。

本项目组前期研究了植物乳杆菌制剂对断奶仔猪生长性能的影响,发现植物乳杆菌可显著增加断奶仔猪平均日增重和日采食量,显著降低料重比和腹泻率^[7],然而,植物乳杆菌对断奶仔猪肠道功能及健康的影响及提高生产性能的机制尚不清楚。因此,我们在前期生产性能分析的基础上,从仔猪肠道黏膜屏障功能基因与营养素转运体相关基因表达量、短链脂肪酸和乳酸浓度及菌群数量等方面,进一步探讨植物乳杆菌制剂对断奶仔猪阶段肠道健康的影响,分析其提高生产性能的原因,以揭示植物乳杆菌制剂替代抗生素缓解断奶应激可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物和材料

试验于2015年10—11月在江苏省淮安市淮阴种猪场进行。试验用自制的植物乳杆菌制剂添加量为200 mg·kg⁻¹,有效活菌数 1×10^9 CFU·g⁻¹。试验所用抗生素为硫酸黏杆菌素和恩拉霉素,纯度均为10%(质量分数),添加量均为200 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计与日粮组成

选取体质量为(9.34 ± 0.33)kg的28日龄苏淮断奶仔猪144头,随机分为3组:基础日粮组,即对照组;抗生素组,即基础日粮中添加200 mg·kg⁻¹硫酸黏杆菌素和200 mg·kg⁻¹恩拉霉素;植物乳杆菌制剂组,即基础日粮添加200 mg·kg⁻¹植物乳杆菌制剂。每组6个重复,每个重复8头仔猪。试验于仔猪32日龄开始,59日龄结束,共28 d。每组每个重复挑选1头共18头仔猪屠宰,采集器官、组织、食糜等样品。仔猪断奶后的日粮组成及营养水平见表1。试验期间仔猪自由饮水、采食。按照猪场常规免疫、消毒程序饲养管理。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 肠道黏膜功能相关基因的测定 参照Chomczynski等^[8]的方法提取小肠组织总RNA,反转录体系和反应程序严格按照试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作,所得cDNA模板保存于-20℃备用。

以 β -actin作为内参基因,对相关基因进行实时荧光定量PCR(qPCR)分析(ABI公司7300实时荧光定量PCR仪),反应体系和反应程序按照SYBR Premix Ex Taq试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作。引物序列如表2所示。每个样本重复测定3次,取C_T的平均值,根据公式 $2^{-\Delta C_T}$ 计算相关基因的相对表达量。

表1 基础日粮组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet

原料组成 Ingredients	含量/% Content	营养水平 ² Nutrition levels	含量/% Content
玉米 Corn	65	干物质 Dry matter	87.90
麸皮 Wheat bran	8	粗蛋白 Crude protein	17.90
豆粕 Soybean meal	20	钙 Ca	0.63
鱼粉 Fish meal	2	磷 P	0.50
预混料 ¹ Premix	5	可利用磷 Available phosphorus	0.25
		盐 Salt	0.38
		粗纤维 Crude fiber	2.46
		蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.65
		苏氨酸 Thr	0.68

1) 每千克预混料中含: 维生素 A 120 kIU, 维生素 D₃ 10 kIU, 维生素 E 400 IU, 维生素 K₃ 40 mg, 维生素 B₁ 50 mg, 维生素 B₂ 50 mg, 维生素 B₆ 30 mg, 烟酸 500 mg, 叶酸 15 mg, 泛酸 250 mg, 水分 100 g, 氯化钠 80~130 g, 氯化胆碱 5 000 mg, 铁 1 500 mg, 铜 900 mg, 锰 300 mg, 锌 1 600 mg, 碘 3.5 mg, 硒 2.5 mg, 钙 100~180 g, 总磷 20 g, 赖氨酸 5.6 g; 2) 营养水平为计算值, 消化能为 12.54 MJ·kg⁻¹。
 1) Per kilogram of premix contains: vitamin A 120 kIU, vitamin D₃ 10 kIU, vitamin E 400 IU, vitamin K₃ 40 mg, vitamin B₁ 50 mg, vitamin B₂ 50 mg, vitamin B₆ 30 mg, nicotinic acid 500 mg, folic acid 15 mg, pantothenic acid 250 mg, water 100 g, NaCl 80~130 mg, choline chloride 5 000 mg, Fe 1 500 mg, Cu 900 mg, Mn 300 mg, Zn 1 600 mg, I 3.5 mg, Se 2.5 mg, Ca 100~180 g, total P 20 g, lysine 5.6 g; 2) Nutrient levels were calculated values, digestible energy was 12.54 MJ·kg⁻¹.

表2 RT-qPCR 测定肠道黏膜功能相关基因的引物序列

Table 2 Primer pairs of related microbiota genes used in the RT-qPCR

基因名称 Genes name	登录号 Accession No.	引物对序列(5'→3') Primer pairs sequences	退火温度/℃ Annealing temperature	片段长度/bp Amplicon size
Claudin-1	NM_001244539.1	GCCCTACTTGCTGCTCCTG/TTTCTGGTGTCCCACACG	60	141
Occludin	NM_001163647.2	CACTGGCTTGGTGGCATATG/AGAATCCCTTGCTGCTCGT	60	101
ZO-1	XM_005659811.1	AGCCATCCACTCCTGCCTAT/GGGACCTGCTCATAACTTCG	60	133
SLC1-1	M34044.1	TCATCATCGCTCGTCGCTCTC/CTTCTGGGCTTCTGAATGTC	60	144
PepT1	U13173	TCCACCGCCATCTACCATAC/GGACAAACACAATCAGGGCT	60	499
AQP10	NM_001128454	TGTCTGCTTCTGTGCTCTG/GGATGCCATTGCTCAAGGATAGATAA	60	156
AQP3	HQ 888860.1	AAGCTGTCCAAGTAAAGCACAA/GCCCTACTTCCTGTTTCACCAC	60	251
β-actin	XM_003357928	ATGCTTCTAGACGGACTGG/CTTTCAGGAGGCTGGCATGA	60	109

1.3.2 肠道短链脂肪酸浓度测定 样品预处理: 称取食糜 0.5 g 于离心管中, 加入 1.5 mL 双蒸水, 混匀, 取 1 mL 上清液于离心管中。加入 0.2 mL 偏巴酸混合溶液(0.646 4 g 巴豆酸溶于 250 g·L⁻¹ 偏磷酸), -20 ℃ 保存过夜。待样品解冻后离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min), 取 0.5 μL 上清液, 用进样针瞬时注入气相色谱仪(GC-2014, 日本岛津), 参照文献[9-10]的方法测定。

1.3.3 肠道微生物菌群数量分析 于仔猪 59 日龄, 每组每个重复随机选择 1 头仔猪屠宰, 分离肠道, 采集盲肠、结肠食糜, 于-20 ℃ 保存。采用珠磨 CTAB 法^[11] 提取细菌总 DNA, NanoDrop 2000 (Thermo, USA) 检测提取 DNA 的纯度和浓度, 将纯度和浓度合适的 DNA 样品保存于-20 ℃, 用于微生物菌群 qPCR 分析, 利用各自代表性菌株的基因作为模板制作标准曲线, 测定样品 DNA, 3 个重复, 计算平均值, 具体方法参照文献[12]。引物序列如表 3 所示。qPCR 反应体系和反应程序按照试剂盒(TaKaRa)说明书操作。

表3 qPCR 测定菌群相关基因的引物序列^[12]

Table 3 Primer pairs of related microbiota genes used in the qPCR

菌群 Microbiota	引物对序列(5'→3') Primer pairs sequences	退火温度/℃ Annealing temperature	片段长度/bp Amplicon size
总菌 Total bacteria	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA/ACGTCRTCCMCNCCTCCTC	60	123
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	AGCACTAGGAAATCTTCCA/ATTCCACCGCTACACATG	60	345
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	CATGCCCGGTATGAAGAA/CGGGTAACGTCAATGAGCAA	60	96
梭菌IV群 <i>Clostridium cluster IV</i>	GCACAAGCAGTGGACT/CTTCCTCCGTTTGTCAA	60	239
梭菌XIVa群 <i>C. cluster XIVa</i>	CGGTACCTGACTAACAGAAC/AGTTTYATTCTTGCGAACG	60	440

1.4 统计分析

试验数据经 Excel 2007 处理后, 采用 SPSS 20.0 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)模型进行分析, Tukey S-B 测验比较差异显著性。

2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜转运通道相关基因相对表达量的影响

从表4可见:与对照组相比,植物乳杆菌制剂组可显著上调十二指肠 *PepT1*、空肠 *SGLT-1* 和 *PepT1* 以及回肠 *SGLT-1* 的相对表达量($P<0.05$);与抗生素组相比,植物乳杆菌制剂对各基因的相对表达量均无显著影响($P>0.05$)。

表4 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜转运通道相关基因相对表达量的影响

Table 4 Effects of *Lactobacillus plantarum* on relative expression of transport channels genes in small intestine mucosa of piglets

项目 Items	基因 Genes	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	植物乳杆菌组 <i>L. plantarum</i> group
十二指肠	<i>AQP3</i>	1.00±0.00	1.01±0.00	1.00±0.00
Duodenum	<i>AQP10</i>	1.00±0.00	1.02±0.01	1.01±0.00
	<i>SGLT-1</i>	1.00±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00
	<i>PepT1</i>	1.00±0.00 ^b	1.42±0.01 ^a	1.44±0.01 ^a
空肠	<i>AQP3</i>	1.00±0.01	1.02±0.00	1.01±0.00
Jejunum	<i>AQP10</i>	1.00±0.00	1.00±0.00	1.02±0.00
	<i>SGLT-1</i>	1.00±0.01 ^b	1.29±0.00 ^a	1.19±0.00 ^a
	<i>PepT1</i>	1.00±0.01 ^b	1.47±0.01 ^a	1.51±0.01 ^a
回肠	<i>AQP3</i>	1.00±0.00	1.00±0.00	1.01±0.00
Ileum	<i>AQP10</i>	1.00±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00
	<i>SGLT-1</i>	1.00±0.00 ^b	1.19±0.00 ^a	1.30±0.00 ^a
	<i>PepT1</i>	1.00±0.00	1.03±0.00	1.05±0.00

注:同行数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different letters in the same row mean significant difference between the treatments ($P<0.05$). The same as follows.

2.2 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜紧密连接蛋白相关基因相对表达量的影响

从表5可见:与对照组和抗生素组相比,植物乳杆菌制剂组可显著上调十二指肠的 *Occludin* 基因以及空肠和回肠的 *Occludin* 和 *ZO-1* 基因的表达量($P<0.05$),对十二指肠、空肠、回肠其他基因表达量无显著影响($P>0.05$)。

表5 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜紧密连接蛋白相关基因相对表达量的影响

Table 5 Effects of *L. plantarum* on relative gene expression of tight junction protein in small intestine mucosa of piglets

项目 Items	基因 Genes	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	植物乳杆菌组 <i>L. plantarum</i> group
十二指肠	<i>Claudin-1</i>	1.00±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00
Duodenum	<i>Occludin</i>	1.00±0.00 ^b	1.01±0.00 ^b	1.21±0.00 ^a
	<i>ZO-1</i>	1.00±0.00	1.08±0.00	1.07±0.12
空肠	<i>Claudin-1</i>	1.00±0.00	1.01±0.00	1.02±0.00
Jejunum	<i>Occludin</i>	1.00±0.00 ^b	1.01±0.00 ^b	1.21±0.00 ^a
	<i>ZO-1</i>	1.00±0.00 ^b	1.00±0.01 ^b	1.20±0.01 ^a
回肠	<i>Claudin-1</i>	1.00±0.00	1.00±0.00	1.01±0.00
Ileum	<i>Occludin</i>	1.00±0.00 ^b	1.01±0.00 ^b	1.21±0.00 ^a
	<i>ZO-1</i>	1.00±0.00 ^b	1.00±0.01 ^b	1.20±0.00 ^a

2.3 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪盲肠、结肠短链脂肪酸及乳酸含量的影响

从表6可见:在盲肠食糜中,相较于对照组,植物乳杆菌制剂组能够显著增加丁酸的含量($P<0.05$),但对乙酸、丙酸的含量影响不显著($P>0.05$);在结肠食糜中,相较于对照组,植物乳杆菌制剂能够显著增加丁酸和乳酸的含量,但对乙酸和丙酸影响不显著;相较于抗生素组,植物乳杆菌制剂能够显著增加盲肠乳酸和结肠乳酸、丁酸的含量。

2.4 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪盲肠和结肠微生物菌群数量的影响

从表7可见:在盲肠中,与对照组相比,植物乳杆菌制剂可显著降低大肠杆菌属的数量($P<0.05$),而对总菌、乳酸杆菌属、梭菌IV群和梭菌XIVa群的数量无显著影响($P>0.05$);与抗生素组相比,植物乳杆菌制剂可显著增加乳酸杆菌属的数量($P<0.05$),对总菌及其他菌群无显著影响($P>0.05$)。在结肠中,与对

照组相比,植物乳杆菌制剂可显著增加乳酸杆菌属和梭菌XIVa群的数量,显著降低大肠杆菌属的数量($P<0.05$),对总菌及其他菌群无显著影响。与抗生素组相比,植物乳杆菌制剂可显著增加乳酸杆菌属和梭菌XIVa群的数量($P<0.05$),但对总菌和其他菌群无显著影响。

表6 植物乳杆菌制剂对仔猪盲肠、结肠短链脂肪酸及乳酸含量的影响

Table 6 Effects of *L. plantarum* on the concentration of short chain fatty acids(SCFA) VFA and lactic acid in cecum and colon of piglets

项目 Item	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	植物乳杆菌组 <i>L. plantarum</i> group
盲肠 Cecum			
乙酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Acetate content	82.55 \pm 7.81	70.87 \pm 5.56	97.13 \pm 7.21
丙酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Propionate content	21.15 \pm 3.81	36.09 \pm 4.10	29.59 \pm 5.46
丁酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Butyrate content	12.58 \pm 0.89 ^b	13.46 \pm 3.60 ^{ab}	22.60 \pm 0.63 ^a
总短链脂肪酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Total SCFA content	146.22 \pm 10.73	120.39 \pm 5.91	166.61 \pm 9.85
乳酸含量/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) Lactic acid content	1.25 \pm 0.12 ^a	0.90 \pm 0.07 ^b	1.70 \pm 0.11 ^a
结肠 Colon			
乙酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Acetate content	113.69 \pm 12.50	86.88 \pm 9.80	119.98 \pm 5.57
丙酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Propionate content	31.25 \pm 4.38	28.63 \pm 1.67	34.68 \pm 0.05
丁酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Butyrate content	14.10 \pm 1.82 ^b	11.92 \pm 0.88 ^b	18.35 \pm 0.10 ^a
总短链脂肪酸含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) Total SCFA content	160.42 \pm 4.81	152.77 \pm 13.31	167.71 \pm 7.48
乳酸含量/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) Lactic acid content	1.69 \pm 0.14 ^b	0.90 \pm 0.05 ^c	2.02 \pm 0.22 ^a

表7 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪盲肠和结肠微生物菌群的影响

Table 7 Effects of *L. plantarum* on microbial populations in the cecum and colon of piglets

项目 Item	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotic group	$\lg[c/(\text{copies}\cdot\text{g}^{-1})]$ 植物乳杆菌组 <i>L. plantarum</i> group
盲肠 Cecum			
总菌 Total bacteria	9.92 \pm 0.02	9.81 \pm 0.04	9.90 \pm 0.05
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	6.82 \pm 0.02 ^a	6.59 \pm 0.02 ^b	6.91 \pm 0.03 ^a
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	7.16 \pm 0.01 ^a	7.11 \pm 0.00 ^b	7.09 \pm 0.01 ^b
梭菌IV群 <i>C. cluster</i> IV	8.22 \pm 0.01	8.21 \pm 0.02	8.24 \pm 0.02
梭菌XIVa群 <i>C. cluster</i> XIVa	8.17 \pm 0.02	8.20 \pm 0.02	8.23 \pm 0.02
结肠 Colon			
总菌 Total bacteria	9.86 \pm 0.01	9.84 \pm 0.04	9.90 \pm 0.01
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	7.65 \pm 0.05 ^b	7.48 \pm 0.03 ^b	7.98 \pm 0.06 ^a
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	7.17 \pm 0.02 ^a	7.11 \pm 0.01 ^b	7.12 \pm 0.00 ^b
梭菌IV群 <i>C. cluster</i> IV	8.23 \pm 0.02	8.23 \pm 0.01	8.25 \pm 0.00
梭菌XIVa群 <i>C. cluster</i> XIVa	8.18 \pm 0.01 ^b	8.17 \pm 0.01 ^b	8.23 \pm 0.01 ^a

3 讨论

3.1 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜转运通道相关基因表达量的影响

有研究表明,在生长育肥猪日粮中添加乳酸菌可提高小肠中 *SGLT-1* 基因的相对表达量^[13],显著上调猪十二指肠和空肠 *PepT1* 基因的相对表达量^[14]。本研究结果显示,断奶仔猪日粮中添加植物乳杆菌制剂可显著上调空肠和回肠 *SGLT-1* 基因的相对表达量及十二指肠、空肠 *PepT1* 基因的相对表达量,对水通道转运载体 *APQ3* 和 *APQ10* 基因相对表达量无显著影响。这说明植物乳杆菌制剂在一定程度上上调小肠营养素转运体相关基因的表达,而小肠营养素转运体相关基因表达量的上升与营养素吸收量的增加紧密相关^[15]。植物乳杆菌能够显著提高绒毛高度,促进杯状细胞的增殖和黏蛋白分泌,加速受损伤的小肠上皮细胞修复^[16]。结合本项目组李雪莉等^[7]之前的研究,植物乳杆菌制剂能够显著提高绒毛高度与隐窝深度的比值,增加小肠对营养素的吸收面积,又通过提高上皮细胞营养素转运体相关基因的表达,进一步促进小肠对营养素的吸收,进而显著提高仔猪平均日增重、平均日采食量,显著降低料重比和腹泻率。

3.2 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪小肠黏膜紧密连接蛋白基因表达量的影响

紧密连接蛋白(tight junction, TJ)主要由 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 几部分组成,是肠道上皮细胞选择性通透的结构基础^[17]。据报道,植物乳杆菌 MB452 可上调紧密连接相关基因 *Occludin* 和细胞骨架基因的表达量^[18]。本研究结果显示,断奶仔猪日粮中添加植物乳杆菌制剂,可显著上调十二指肠、空肠、回肠 *Occludin* 基因及空肠和回肠 *ZO-1* 基因的表达量。有研究表明,上皮细胞紧密连接蛋白的基因表达与肠

道细菌的代谢产物有关^[19]。因此,植物乳杆菌制剂可能通过益生菌在体内产生代谢产物或改变肠道微生态环境,上调肠上皮紧密连接蛋白表达,降低肠道通透性,减少腹泻发生。此外,抗生素组紧密连接蛋白相关基因表达显著低于植物乳杆菌制剂组,这可能与抗生素改变肠道通透性有关^[20]。

3.3 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪盲肠、结肠短链脂肪酸和乳酸含量的影响

益生菌可通过多种途径抑制肠道病原菌^[21],其中乳酸菌能够产生大量乳酸和短链脂肪酸等^[22],降低pH值,维护肠道健康。本研究结果显示,断奶仔猪日粮中添加植物乳杆菌制剂可显著增加结肠中乳酸的含量以及盲肠和结肠中丁酸的含量。其原因可能是植物乳杆菌促进了肠道中乳酸菌的增殖^[23],导致结肠中乳酸含量显著增加,且为丁酸产生菌提供了底物来源^[24],从而促进丁酸含量的增加。此外,丁酸是结肠上皮细胞的主要能量来源,能够调节上皮细胞和免疫细胞的生长和凋亡,并能抑制结肠炎症及癌变的发生,可促进多种物质分泌,从而增强结肠上皮细胞防御能力,改善肠道黏膜形态结构,促进肠道健康^[16]。

而抗生素组中短链脂肪酸和乳酸浓度普遍低于植物乳杆菌制剂组,尤其是盲肠和结肠中的乳酸浓度以及结肠中丁酸浓度显著低于植物乳杆菌组,其原因可能是抗生素抑制了肠道内产短链脂肪酸菌和乳酸菌的增殖,从而使短链脂肪酸和乳酸的含量下降^[25]。

3.4 植物乳杆菌制剂对断奶仔猪盲肠、结肠微生物菌群数量的影响

仔猪断奶后,肠道菌群发生显著变化,某些致病菌如大肠杆菌比例上升,乳酸菌等有益菌比例下降^[26]。当在断奶仔猪日粮中添加一定量的乳酸杆菌时,盲肠和结肠中乳酸杆菌数量显著升高,而大肠杆菌和沙门氏杆菌数量显著降低^[27]。同样地,我们在断奶仔猪日粮中添加植物乳杆菌制剂可显著增加结肠中乳酸杆菌和梭菌XIVa群数量,降低盲肠和结肠中大肠杆菌数量。其作用机制一方面可能是益生菌菌株通过竞争营养物质与肠道黏附位点及产生抗菌物质等方式从而抑制病原菌的定殖和生长,维持肠道健康^[21];另一方面可能是促进了动物肠道内丁酸产生菌梭菌XIVa群增殖,从而提高丁酸等短链脂肪酸含量,因梭菌XIVa群具有黏附黏蛋白的活性,可减少肠道内致病菌对黏蛋白的利用^[28]。

总之,断奶仔猪饲喂植物乳杆菌制剂,可上调小肠转运通道相关基因(*SGLT-1*和*PepT1*)及紧密连接蛋白相关基因(*Occludin*和*ZO-1*)的相对表达量,提高盲肠与结肠丁酸和乳酸的含量,促进乳酸杆菌和梭菌XIVa群的增殖,降低大肠杆菌的数量,改善肠道健康。

参考文献 References:

- [1] 王水泉,包艳,董喜梅,等.植物乳杆菌的生理功能及应用[J].中国农业科技导报,2010,12(4):49-55.
Wang S Q, Bao Y, Dong X M, et al. Physiological function and application of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(4): 49-55 (in Chinese with English abstract).
- [2] Yang K M, Jiang Z Y, Zheng C T, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. Journal of Animal Science, 2014, 92: 1496-1503.
- [3] Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, et al. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153: 216-222.
- [4] 邹仕庚,冯定远,陈峰,等.丁酸钠对体外培养猪肠黏膜上皮细胞寡肽转运载体及钠氢交换载体mRNA表达的影响[J].中国兽医学报,2010,30(12):1698-1702.
Zou S G, Feng D Y, Chen F, et al. Effects of sodium butyrate on expression of *PepT1*, *NHE2* and *NHE3* mRNA abundances in primary cultured IEC *in vitro* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(12): 1698-1702 (in Chinese with English abstract).
- [5] Dyer J, Daly K, Salmon K S, et al. Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(5): 1191-1194.
- [6] Lu H, Klaassen C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of *PepT1* and *PepT2* mRNA in rodents [J]. Peptides, 2006, 27(4): 850-857.
- [7] 李雪莉,王超,虞德夫,等.微生态制剂对断奶仔猪生长性能、器官重及其胃肠道发育的影响[J].草业学报,2017,26(8):192-199.
Li X L, Wang C, Yu D F, et al. Effects of probiotics on growth performance, organ relative weight and intestine development of weaned piglets [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(8): 192-199 (in Chinese with English abstract).
- [8] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on [J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 581-585.
- [9] 秦为琳.应用气相色谱测定瘤胃挥发性脂肪酸方法的研究改进[J].南京农业大学学报,1982(4):110-116. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.1982.04.010.
Qin W L. Determination of rumen volatile fatty acids by means of gas chromatography [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1982(4): 110-116 (in Chinese with English abstract).
- [10] 杭苏琴,毛胜勇,于卓腾,等.体外法评定甘露寡糖和甜菜汁对肠道微生物发酵的影响[J].南京农业大学学报,2007,30(1):79-83.
DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2007.01.016.

- Hang S Q, Mao S Y, Yu Z T, et al. Effect of mannan-oligosaccharide and sugarbeet pulp on intestinal microbial fermentation *in vitro* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(1): 79–83 (in Chinese with English abstract).
- [11] 沈梦城. 高铜高锌日粮对断奶仔猪肠道形态、组织铜锌沉积规律及肠道微生物区系的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- Shen M C. Effects of pharmacological levels of dietary coppers and zinc on small intestinal morphology, histochemical precipitation and intestinal microbiota in weaned piglets [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [12] Zhang C, Miao Y, Yang Y, et al. Effect of early antibiotic administration on cecal bacterial communities and their metabolic profiles in pigs fed diets with different protein levels [J]. Anaerobe, 2016, 42: 188–196.
- [13] 黄志毅,左建军,邹仕庚,等. 乳酸菌对猪肠道葡萄糖转运载体 mRNA 表达的影响[C]//刘建新. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十次学术研讨会论文集. 北京:中国农业科技出版社, 2008:20.
- Huang Z Y, Zuo J J, Zou S G, et al. Effects of Lactobacillus on expression of glucose transporters mRNA in the intestine of pigs [C]// Liu J X. Proceedings of Animal Branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine and the 10th Animal Nutrition Symposium. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 20 (in Chinese with English abstract).
- [14] 邹仕庚,左建军,职爱民,等. 乳酸菌对猪肠道寡肽转运载体和钠氢交换载体 mRNA 表达的影响[C]//刘建新. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十次学术研讨会论文集. 北京:中国农业科技出版社, 2008:24.
- Zou S G, Zuo J J, Zhi A M, et al. Effects of Lactobacillus on expression of *PepT1*, *NHE2* and *NHE3* abundance in the intestine of pigs [C]// Liu J X. Proceedings of Animal Branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine and the 10th Animal Nutrition Symposium. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 24 (in Chinese with English abstract).
- [15] Vigors S, Sweeney T, O'Shea C J, et al. Improvements in growth performance, bone mineral status and nutrient digestibility in pigs following the dietary inclusion of phytase are accompanied by modifications in intestinal nutrient transporter gene expression [J]. British Journal of Nutrition, 2014, 112(5): 688–697.
- [16] 谢俊华. 植物乳杆菌 NCU116 对肠道健康的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- Xie J H. The effects of *Lactobacillus plantarum* NCU116 on intestinal health [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [17] Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, 2(1): a002907.
- [18] Anderson R C, Cookson A L, Mcnabb W C, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation [J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 316–326.
- [19] 宦海琳,白建勇,周维仁,等. 抗菌肽对仔猪血清生化指标、肠黏膜形态结构及空肠上皮紧密连接蛋白基因相对表达量的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(12): 3797–3804.
- Huan H L, Bai J Y, Zhou W R, et al. Effects of antimicrobial peptides on serum biochemical indices, intestinal mucosa morphology and the relative expression level of tight junction protein gene of jejunum of piglets [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(12): 3797–3804 (in Chinese with English abstract).
- [20] 曹丽萍,李万坤,陈燕军,等. 抗生素饲料添加剂在动物生产中的规范应用[J]. 家畜生态学报, 2009, 30(1): 105–110.
- Cao L P, Li W K, Chen Y J, et al. The standardised use of the antibiotic feed additive in animal husbandry production [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2009, 30(1): 105–110 (in Chinese with English abstract).
- [21] Cho J H, Zhao P Y, Kim I H. Probiotics as a dietary additive for pigs: a review [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10(16): 2127–2134.
- [22] Rossi M, Corradini C, Amaretti A, et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by *Bifidobacteria*: a comparative study of pure and fecal cultures [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 6150–6158.
- [23] 赵秀英,县怡涵,李晨博,等. 灌喂植物乳杆菌和干酪乳杆菌增加仔猪肠道菌群多样性及短链脂肪酸生成[J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1291–1300.
- Zhao X Y, Xian Y H, Li C B, et al. Feeding *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* increased microbial diversity and short chain fatty acids production in the gut-intestinal tract of weaning piglets [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(8): 1291–1300 (in Chinese with English abstract).
- [24] Louis P, Flint H J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine [J]. Fems Microbiology Letters, 2009, 294(1): 1–8.
- [25] 陈洪. 日粮中添加恩拉霉素对断奶仔猪生产性能、肠道微生物区系及代谢产物的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2009.
- Chen H. Effects of enramycin on performance, intestinal flora and metabolic products of early-weaned piglets [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009 (in Chinese with English abstract).
- [26] Mathew A G, Robbins C M, Chattin S E. Influence of galactosyl lactose on energy and protein digestibility, enteric microflora and performance of weanling pigs [J]. Journal of Animal Science, 1997, 75(4): 1009–1016.
- [27] 窦茂鑫,吴涛. 不同类型益生素对断奶仔猪肠道微生物区系、pH 和挥发性盐基氮的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 84–87.
- Dou M X, Wu T. Effect of different types of probiotics on intestinal microflora, pH and volatile base nitrogen of weaned piglets [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 40(2): 84–87 (in Chinese with English abstract).
- [28] van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, et al. Butyrate-producing *Clostridium cluster XIV* a species specifically colonize mucins in an *in vitro* gut model [J]. The Isme Journal, 2013, 7(5): 949–961.