



博落回提取物替代抗生素对肉鸡生长性能、盲肠微生物及盲肠紧密连接的影响

柴毛毛¹, 郭玉光¹, 李阳源¹, 彭宇^{1,2*}, 王永华²

¹广东溢多利生物科技股份有限公司, 广东 珠海 519060

²华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640

摘要: 【目的】本研究旨在探讨博落回提取物(*Macleaya cordata* extract, MCE)替代促生长抗生素(Antibiotic growth promoters, AGPs)对黄羽肉鸡生长性能、盲肠微生物及紧密连接mRNA表达的影响。

【方法】试验选取体重相近、体型均匀、健康状况良好的1日龄温氏新黄鸡二号公鸡300只, 随机分为5组, 每组6个重复, 每个重复10羽。分别饲喂基础日粮(NC), 抗生素日粮(ANT, 基础日粮添加50 mg/kg那西肽和50 mg/kg金霉素)和试验日粮(基础日粮中添加200、400和800 mg/kg MCE), 试验期60 d。【结果】日粮添加400 mg/kg MCE替代AGPs显著降低了料肉比($P<0.05$), 并显著增加了盲肠长度($P<0.05$)。日粮添加MCE显著提高了肉鸡盲肠食糜中Firmicutes细菌数量和*Clostridium cluster XIVa*数量($P<0.05$); MCE替代AGPs显著降低了盲肠*Escherichia coli*数量($P<0.05$)。400 mg/kg和800 mg/kg MCE替代日粮中AGPs显著增加了肉鸡盲肠食糜中总短链脂肪酸、乙酸和丁酸含量($P<0.05$); 400 mg/kg MCE替代AGPs显著提高了盲肠中支链脂肪酸, 异丁酸和异戊酸的浓度($P<0.05$)。日粮添加MCE显著上调了肉鸡盲肠*Claudin-1*、*JAM2*、*ZO-1*的mRNA表达量($P<0.05$), 并降低了黏蛋白*MUC2*、*MUC5ac*和*MUC13*的表达量($P<0.05$)。【结论】MCE替代AGPs可通过提高盲肠有益菌数量和短链脂肪酸浓度, 促进肠道发育, 提升肠道屏障功能等途径, 改善黄羽肉鸡生长性能, 本研究中其最适添加量为400 mg/kg。

关键词: 博落回提取物, 黄羽肉鸡, 盲肠微生物, 紧密连接

自2006年欧盟全面禁止在饲料中添加促生长类抗生素以来, 世界各国纷纷出台了相应措施。我国农业农村部发布的第194号公告显示, 将于

2020年7月1日起全面停止生产除中药外的促生长药物添加剂。幼龄动物由于抗病机制不完善, 日粮中常添加饲用抗生素来预防感染、促进生长,

基金项目: 珠海市引进创新创业团队项目(ZH01110405170028PWC)

*通信作者。E-mail: pengyu@vtrbio.com

收稿日期: 2019-11-13; 修回日期: 2020-01-16; 网络出版日期: 2020-00-00

然而长期添加抗生素会造成动物免疫力下降、畜产品药物残留超标等不良后果。因此,寻找天然绿色的抗生素替代品,促进动物肠道健康成为动物营养的研究热点。

博落回是我国特有草本植物,其提取物(*Macleaya cordata* extract, MCE)的主要生物活性成分为异喹啉类生物碱,包括血根碱、白屈菜红碱、别隐品碱等^[1],具有抗菌、消炎、抗病毒、增强免疫力等功能。研究显示,MCE在畜禽及水生动物养殖中具有促进动物生长、降低腹泻率、增强机体免疫力等作用^[2-3]。胡贵丽等^[4]将MCE单独或与茶籽多糖混合替代AGPs可显著提高肉鸡日平均采食量。将MCE添加于肉鸡日粮中和饮水中可显著促进肉鸡生长后期增重^[5],显著降低坏死性肠炎的发生率,改善不使用抗生素饲养条件下肉鸡的生长性能^[6]。也有研究表明,MCE具有调节仔猪空肠紧密连接蛋白mRNA表达,增强生长仔猪肠道屏障功能^[7]。综上所述,MCE替代AGPs具有促进动物生长,维持动物肠道健康的功效,但其是否通过调控肠道微生物和肠道紧密连接mRNA表达的途径来发挥作用,目前尚不清楚。因此,本试验通过在日粮中添加MCE替代AGPs,研究其对黄羽肉鸡生长性能、盲肠微生物、短链脂肪酸和盲肠紧密连接mRNA表达的影响,旨在探讨MCE应用于肉鸡生产中替代AGPs的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验中所用博落回提取物由湖南美可达生物资源股份有限公司提供,商品名为美佑壮(血根碱含量1.5%)。那西肽(硫多肽含量4%)和金霉素(10%)均为市售产品。

1.2 试验设计与动物饲养管理

试验选取生长状况良好的1日龄温氏新黄鸡二号公鸡300只,随机分为5组,每组6个重复,每个重复10只。试验分为两个阶段:肉仔鸡阶段(1-21 d)和中大鸡阶段(22-60 d),试验期60 d。分别饲喂不含抗生素的基础日粮(NC)、基础日粮添加50 mg/kg金霉素和50 mg/kg那西肽(ANT),以及基础日粮中分别添加200、400、800 mg/kg的MCE。试验于2019年2-3月在广东溢多利生物科技股份有限公司试验农场进行。所有试验鸡采用4层立体网上饲养,自由采食和饮水。试验期间采取自然通风和光照,其他按照常规饲养和免疫流程进行。

基础日粮参照NRC(1994)并结合我国农业行业标准《黄羽肉鸡营养需求》(NY/T33-2004)进行配制,基础日粮组成及营养水平如表1。

1.3 生长性能与样品采集

试验第0和60 d,对试验鸡进行称重、计算平均日增重(Average daily gain, ADG)、平均日采食量(Average daily feed intake, ADFI)、耗料增重比(Feed conversion ratio, FCR)。每组随机选取6只接近平均体重的试验鸡,通过前腔动脉放血处死、解剖、分离盲肠组织并分别称重和测量长度。于超净台采集盲肠食糜并保存于-80 °C冰箱,用于提取盲肠食糜总DNA和短链脂肪酸测定(Short-chain fatty acids, SCFAs)。采集盲肠组织保存于-80 °C冰箱,用于提取RNA。

1.4 检测指标

1.4.1 盲肠食糜总DNA提取及实时荧光定量PCR:采用天根粪便基因组DNA试剂盒(天根生化科技北京有限公司),提取盲肠食糜总DNA。采用特异性引物(表2),对Total bacteria、Firmicutes、

表 1. 基础日粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1. Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)

Ingredients	day 1–21	day 22–60	Nutritional levels ²	day 1–21	day 22–60
Corn	60.10	64.38	Crude protein	21.02	19.03
Soy bean meal (CP 43%)	30.00	27.00	Metabolic energy (kcal/kg)	2900	3000
Corn gluten meal	3.00	3.00	Crude fat	3.60	3.78
Fish meal	1.50		Total Ca	0.90	0.80
DL-Met	0.14	0.14	Total P	0.65	0.60
L-Lys	0.11	0.15	Available P	0.42	0.37
Soy-bean oil	1.00	1.50	Lys	1.10	1.00
Salt	0.25	0.23	Met	0.48	0.45
Mountain	1.30	1.00	Met+Cys	0.83	0.77
Calcium bicarbonate	1.50	1.50			
Choline chloride	0.10	0.10			
Premix ¹	1.00	1.00			
Total	100	100			

¹The premix provided the following per kg of diets: D-pantothenic acid 10.9 mg, nicotinic acid 30 mg, folic acid 0.95 mg, biotin 0.16mg, VA 8 000 IU, VD 2 800 IU, VE 19 mg, VK 33.32 mg, VB₁ 1.7 mg, VB₂ 8.2 mg, VB₆ 2.78 mg, VB₁₂ 0.015 mg, Mn (as manganese sulfate) 82 mg, Zn (as zinc sulfate) 68 mg, Fe (as ferrous sulfate) 81 mg, Cu (as copper sulfate) 9 mg, I (as potassium iodide) 0.50 mg, Se (as sodium selenite) 0.27 mg. ²Crude Protein was a measured value, while the others were calculated values.

表 2. 细菌基因荧光定量 PCR 引物及其序列

Table 2. Primers used for bacterial counts Quantitative Real-time PCR

Target organisms	Sequences (5'→3')	References
Total bacteria	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA ACGTCRTCCMCNCCTTCCTC	[9]
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	[10]
<i>Clostridium</i> cluster IV	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCCTCCGTTTTGTCAA	[11]
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	CGGTACCTGACTAAGAAGC GACGACAACCATGCACCACCTG	[11]
<i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CGTCCCGATTAACAGAGCTT	[12]
Bacterodietes	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	[10]
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA GGTGTTCTCCCGATATCTACA	[13]

Bacterodietes、*Clostridium* cluster IV group、*Clostridium* cluster XIVa group、*Escherichia coli* 和 *Lactobacillus* 进行菌群定量分析。采用 Chowdhury 的方法^[8]，挑取代表细菌单克隆的 16S rRNA 基因

制备质粒，梯度稀释后建立标准曲线。采用 SYBR (TaKaRa Biotechnology, 中国) 试剂盒，使用 (Bio-Rad, CFX96 PCR System, 美国) 系统进行实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR,

RT-qPCR)。

1.4.2 盲肠食糜短链脂肪酸浓度测定:取 0.3 g 肠道食糜于 2 mL 灭菌后的离心管中, 加入 1.2 mL 双蒸水, 混匀后 3000×g 离心 10 min, 取 1 mL 上清液, 按 5:1 的比例加入 25% (W/V) 偏磷酸, -20 °C 保存。使用气相色谱(岛津, 日本)检测分析各样品中短链脂肪酸浓度, 气相色谱配备氢火焰离子检测器和毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm, Agilent Technologies Inc. 美国)。

1.4.3 盲肠组织 RNA 提取、逆转录及实时荧光定量 PCR:取约 0.1 g 空肠或盲肠组织, 采用液氮研磨法对肠道组织进行匀浆, 使用 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)。采用 NanoDrop1000 微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, OD_{260}/OD_{280} 值在 2.0–2.2 之间的样品于 -20 °C 保存用于反转录反应, 反转录采用试剂盒(TaKaRa, RR047A, 日本)合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 以 cDNA 为模板, 引物序列见表 3。反应体系为 20 μL, SYBR® Premix Ex Taq 10 μL, cDNA 模板 2 μL, 上下游引物各 0.3 μL, 7.4 μL 灭菌水。使用 CFX96 PCR System (Bio-Rad, 美国)进行实时荧光定量 PCR, 具体程序如下: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因, 每个样品重复 3 次。

1.5 数据处理与分析

试验数据采用 Excel 2010 进行整理, SPSS 21.0 进行单因素方差(one-way-ANOVA)分析, Graphpad Prism 8.0 制图, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。结果最终以“平均值±标准误”呈现。

表 3. 基因荧光定量 PCR 引物及其序列

Table 3. Primers used for gene expression Quantitative Real-time PCR

Target organisms	Sequences (5'→3')	References
<i>Catenin</i>	CGACAACCTGCTCCCTCTTTGA GCGTTGTGTCCACATCTTCCT	[14]
<i>Claudin-1</i>	TGGCCACGTCATGGTATGG AACGGGTGTGAAAGGGTCATAG	[14]
<i>Occludin</i>	GCTTGATGTGGAAGAGCTTGTTG ACCTCTGCCATCTCTCCACA	[14]
<i>JAM2</i>	AGCCTCAAATGGGATTGGATT CATCAACTTGCAATTCGCTTCA	[14]
<i>JAM3</i>	CCGACGGCTGTTTGTGTTT GGCGGTGCAAAGTTTTGG	[14]
<i>ZO-1</i>	CCGCAGTCGTTACGATCT GGAGAATGTCTGGAATGGTCTGA	[14]
<i>MUC2</i>	GCCTGCCAGGAAATCAAG CGACAAGTTTGCTGGCACAT	[14]
<i>MUC5ac</i>	TGTGGTTGCTATGAGAATGGA TTGCCATGGTTTGTGCAT	[14]
<i>MUC13</i>	GCATTCCTCAAGCAGAGGTG CTCAGGCTGCCGTGATATTT	[14]
<i>GAPDH</i>	GGCACGCCATCACTATC CCTGCATCTGCCCATTT	[15]

2 结果和分析

2.1 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡生长性能的影响

由表 1 可知, 与 ANT 相比, 日粮添加 400 mg/kg 和 800 mg/kg MCE 提高了黄羽肉鸡末重, 但差异不显著($P > 0.05$)。与 NC 相比, 日粮添加 400 mg/kg MCE 显著降低了($P < 0.05$)黄羽肉鸡的 ADFI 和 FCR。

2.2 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠微生物数量的影响

图 1 结果显示, 与 NC 和 ANT 相比, 日粮添加 MCE 显著提高了盲肠食糜中 Firmicutes 细菌数量($P < 0.05$)。与 NC 相比, 日粮添加 MCE 均显著增加了盲肠 *Clostridium cluster XIVa* 细菌数量

($P < 0.05$), 有显著增加 *Lactobacillus* 数量的趋势 ($P = 0.069$)。与 ANT 相比, 日粮中添加 MCE 均显著降低了 ($P < 0.05$) 盲肠 *Escherichia coli* 数量。

2.3 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠食糜短链脂肪酸的影响

由表 5 可知, 与 NC 组相比, 日粮中添加 400 mg/kg 和 800 mg/kg MCE 显著提高了盲肠食糜中总短链脂肪酸、乙酸、丁酸和戊酸浓度 ($P < 0.05$); 而使用 400 mg/kg 和 800 mg/kg MCE 替

代 AGPs 显著增加了 ($P < 0.05$) 黄鸡盲肠食糜中总短链脂肪酸、乙酸和丁酸浓度。此外, 400 mg/kg MCE 替代 AGPs 显著增加了支链脂肪酸浓度, 包括异丁酸和异戊酸 ($P < 0.05$)。

2.4 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠长度和重量的影响

由表 6 可知, 与 NC 和 ANT 相比, 日粮添加 400 mg/kg MCE 显著增加黄羽肉鸡盲肠的长度 ($P < 0.05$), 但对盲肠重量无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 4. 博落回替代抗生素对黄羽肉鸡生长性能的影响

Table 4. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on growth performance of yellow-feathered broilers

Items	NC	ANT	200 mg/kg MCE	400 mg/kg MCE	800 mg/kg MCE
Initial weight/g	34.05±1.01	34.26±0.91	34.21±1.00	34.14±1.05	34.22±0.80
Final weight/g	2196.80±63.55	2202.71±24.15	2180.00±46.36	2226.74±35.11	2240.31±72.55
ADG/g	36.04±0.55	36.14±0.21	35.76±1.09	36.54±0.54	36.77±0.85
ADFI/g	78.54±1.58 ^b	77.63±1.74 ^{ab}	75.29±2.85 ^{ab}	75.04±1.33 ^a	78.14±2.19 ^b
FCR	2.18±0.03 ^c	2.15±0.01 ^{bc}	2.11±0.02 ^{ab}	2.05±0.02 ^a	2.13±0.03 ^{bc}

Values in the same row with different letters superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

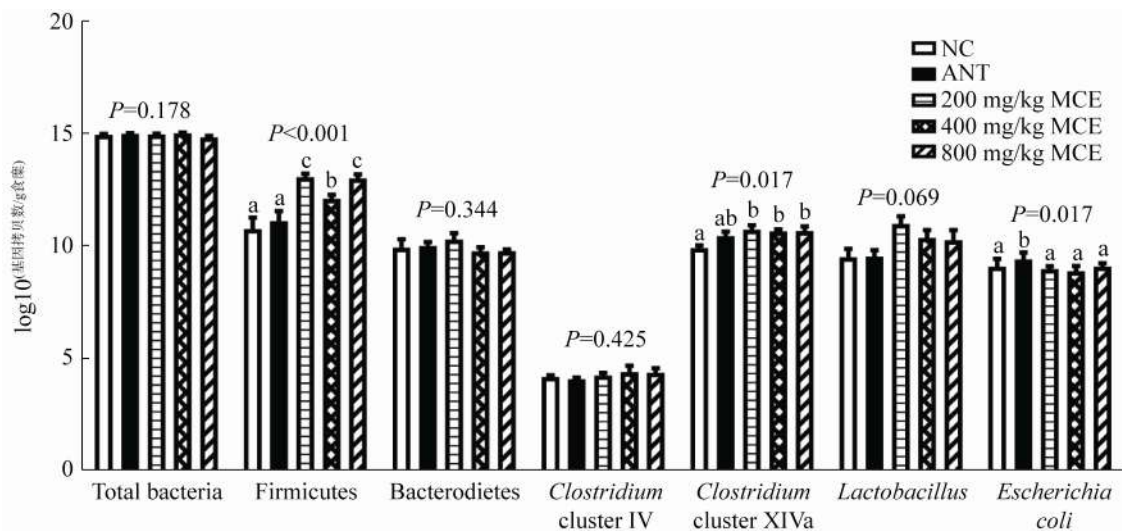


图 1. 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠微生物的影响

Figure 1. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on cecal microbes counts of yellow-feathered broilers.

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

表 5. 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠短链脂肪酸的影响

Table 5. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on cecal SCFAs of yellow-feathered broilers

Items	NC	ANT	200 mg/kg MCE	400 mg/kg MCE	800 mg/kg MCE
Total SCFA/mmol	116.58±6.55 ^a	120.84±17.28 ^a	139.74±15.91 ^{ab}	174.68±11.79 ^{bc}	188.40±9.79 ^c
Acetic acid/mmol	86.50±5.51 ^a	86.80±11.92 ^a	97.05±10.86 ^{ab}	121.89±8.68 ^{bc}	129.91±8.19 ^c
Propionic acid/mmol	8.19±1.58	9.08±1.40	9.88±0.94	11.27±1.27	12.52±0.80
Butyric acid/mmol	15.69±1.50 ^a	18.15±3.95 ^a	23.04±3.90 ^{ab}	28.73±3.37 ^{bc}	37.26±2.66 ^c
Valeric acid/mmol	2.41±0.31 ^a	3.46±0.44 ^{ab}	4.53±0.56 ^{bc}	5.57±0.62 ^c	4.66±0.30 ^{bc}
BCFA/mmol	3.79±0.94 ^a	3.35±0.25 ^a	5.23±0.60 ^{ab}	7.22±1.02 ^b	4.04±0.77 ^a
Isobutyric acid/mmol	1.66±0.40 ^{ab}	1.31±0.12 ^a	1.93±0.18 ^{ab}	2.59±0.41 ^b	1.56±0.33 ^{ab}
Isovaleric acid/mmol	2.13±0.57 ^a	2.04±0.16 ^a	3.30±0.44 ^{ab}	4.63±0.63 ^b	2.48±0.45 ^a

表 6. 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠长度和重量的影响

Table 6. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on caecum length and weight of yellow-feathered broilers

Items	NC	ANT	200 mg/kg MCE	400 mg/kg MCE	800 mg/kg MCE
Cecum length/cm	14.92±0.55 ^a	14.60±0.53 ^a	16.25±0.48 ^{ab}	18.25±1.20 ^b	16.33±0.40 ^{ab}
Cecum weight/g	9.89±0.75	9.50±1.60	12.77±0.92	11.84±3.08	9.81±0.64

2.5 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠组织紧密连接 mRNA 表达的影响

由图 2 可知, 与 NC 相比, 不同添加量 MCE 均显著上调了 ($P<0.05$) 盲肠紧密连接蛋白 *Claudin-1*、*JAM2* 和 *ZO-1* 的 mRNA 表达量 ($P<0.05$); 添加 800 mg/kg 的 MCE 显著上调了 ($P<0.05$) *JAM3* 的 mRNA 表达量。800 mg/kg 的 MCE 替代 AGPs 显著提高了 ($P<0.05$) 盲肠组织 *JAM2* 和 *ZO-1* 的 mRNA 表达量。

2.6 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠组织黏蛋白 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 与 NC 组相比, 不同添加量的 MCE 均显著降低了 ($P<0.05$) 盲肠黏蛋白 *MUC2*、*MUC5ac* 和 *MUC13* 的 mRNA 表达量。

3 讨论

3.1 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡生长性能的影响

肉鸡日粮中 AGPs 的停用会导致其发病率上升, 生长性能下降, 因此饲用抗生素的禁用将对肉鸡产业产生巨大影响。博落回提取物是一种具有抗炎杀菌, 抗肿瘤功效的生物活性提取物, 可用于替代 AGPs 促进动物生长和维护肠道健康, 但其促进动物生长的作用受提取方法和添加剂量等因素的影响有所差异。胡贵丽等研究发现, 日粮添加 20 mg/kg MCE (含 60%血根碱和 20%白屈菜红碱) 显著提高了黄羽肉鸡试验全阶段的 ADFI^[4]。黄海等研究也显示, 添加 40 mg/kg (含 35%血根碱) 的 MCE 于麻鸡肉鸡日粮中, 显著增加

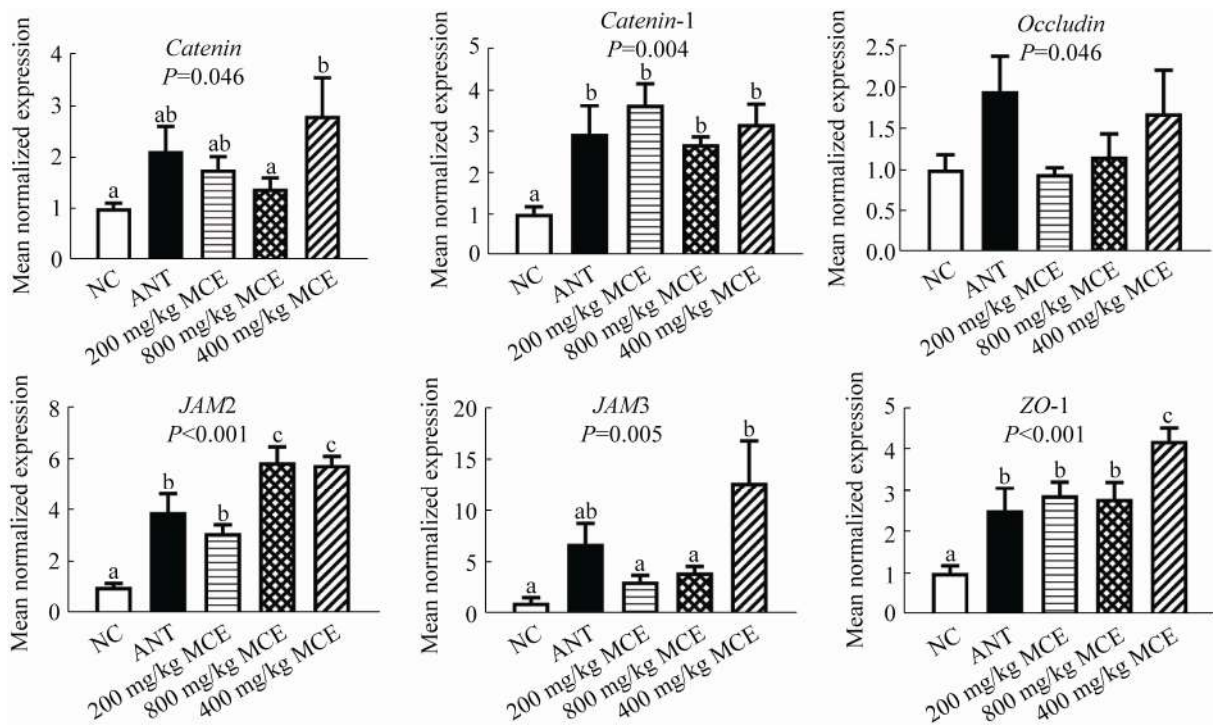


图 2. 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠组织紧密连接 mRNA 表达的影响

Figure 2. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on caecum tight junction mRNA expression of yellow-feathered broilers.

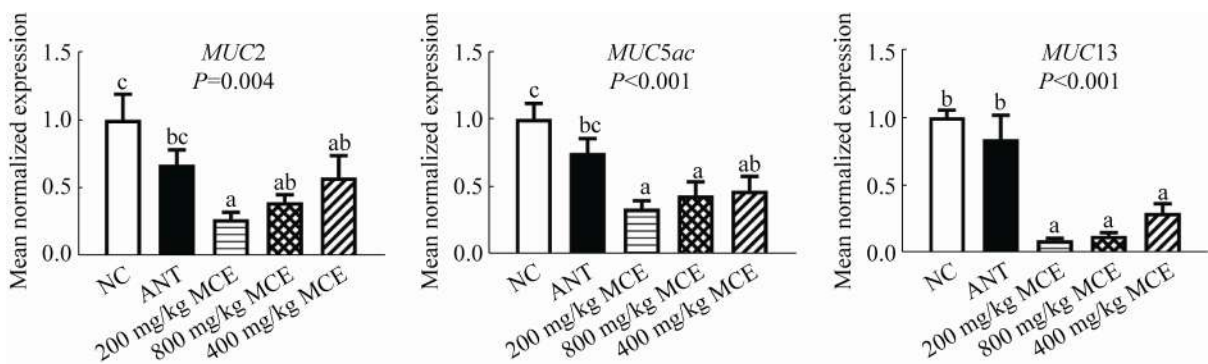


图 3. 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠组织黏蛋白 mRNA 表达的影响

Figure 3. Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on caecum mucoprotein mRNA expression of yellow-feathered broilers.

了麻花鸡的 ADG, 并显著降低其 FCR^[5]。本研究中, 400 mg/kg 的 MCE 替代 AGPs 显著降低了黄羽肉鸡 FCR。由此可知, MCE 替代 AGPs 能维持黄羽肉鸡的生产性能, 且 MCE 添加量不宜过高或过低, 本试验结果建议添加量为 400 mg/kg (血

根碱含量 1.5%)。

3.2 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠微生物和短链脂肪酸的影响

肠道微生物对动物生长和健康具有重要作用, 长期低剂量 AGPs 在促进动物生长的同时也

会抑制肠道有益菌生长, 增加大肠杆菌等有害菌的数量^[6]。与 AGPs 的广谱抗菌特性不同, MCE 的主要成分血根碱可通过诱导细菌细胞壁溶解, 干扰菌体蛋白合成, 抑制细菌繁殖^[7]。本研究中, MCE 替代 AGPs 显著降低了盲肠食糜中 *Escherichia coli* 数量, 这与早期研究的结果一致。另一方面, 采用 MCE 替代 AGPs 增加了盲肠食糜中的 *Lactobacillus* 数量, 此结果与博落回提取物显著增加黄羽肉鸡空肠食糜中大肠杆菌数量的结果相似^[16]。乳酸杆菌是肉鸡肠道内的主要有益菌, 对维持肠道低 pH 值, 竞争性抑制病原菌增殖等具有重要作用^[17]。由此可知采用 MCE 替代 AGPs 可通过促进肉鸡肠道内 *Lactobacillus* 生长, 抑制肠道有害菌增殖维护其肠道健康。*Clostridium cluster XIVa* 是动物肠道中最主要的产丁酸菌, 日粮中长期添加抗生素会抑制肠道 *Clostridium cluster XIVa* 增殖, 减少肠道内丁酸生成^[18]。本研究中, 基础日粮添加 400 mg/kg 和 800 mg/kg MCE 显著增加了盲肠 *Clostridium cluster XIVa* 的数量, 并增加了盲肠食糜中的总短链脂肪酸、乙酸和丁酸浓度。盲肠是禽类消化道生成 SCFAs 的主要场所, 其中乙酸和丁酸占其总量的 70% 以上。乙酸作为脂肪生成和糖异生的基质, 参与上皮细胞能量代谢^[19], 而丁酸则为肠上皮细胞提供能量, 参与肠细胞的分化和增殖^[20]。肠道中 SCFAs 浓度的增加将促进肠道上皮细胞代谢, 调节肠细胞更新, 增强肠道粘膜屏障功能^[21]。本研究在肉鸡日粮中添加 400 mg/kg MCE 增加盲肠长度的结果也表明梭菌 XIVa 和丁酸浓度的增加促进了肉鸡盲肠的生长和发育。因此, 肉鸡日粮中添加 MCE 替代 AGPs 可通过促进肠道中有益菌增殖, 增加食糜中 SCFAs, 促进肉鸡肠道生长和发育等方式维护动物健康, 提高生产性能。

3.3 博落回提取物替代抗生素对黄羽肉鸡盲肠组织紧密连接和黏蛋白 mRNA 表达的影响

完整的肠道结构对于维持肠道健康具有重要作用, 紧密连接蛋白是肠道屏障的重要组成部分, 主要介导肠道内物质交换、能量代谢过程。研究表明, 肠道组织中 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 表达量降低会导致肠道通透性增加, 肠屏障功能失效^[22-23], 因此肠道炎症通常伴随紧密连接蛋白的减少和损伤。博落回提取物具有温和的抗炎和免疫调节特性, 能提升动物肠道免疫机能, 维持肠道屏障功能^[24]。Liu 等在仔猪日粮中添加 MCE 可显著上调其空肠组织 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 的表达量^[25]。本研究也显示, MCE 可显著上调盲肠 *Catenin*、*Claudin-1*、*ZO-1* 的表达量, 增强黄羽肉鸡肠道屏障功能。*JAM2* 属于粘附分子家族, 可调节蛋白的形成和胞间分布^[26]。研究指出, *JAM2* 通过特殊的蛋白间互作结构域(PDZ 结构域)与 *ZO-1* 等 TJ 蛋白结合, 增加 TJ 蛋白的数量, 促进肠道屏障生成^[27]。本研究发现, MCE 在上调 *JAM2* mRNA 表达的同时也促进了 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 等紧密连接蛋白的 mRNA 表达, 这暗示着 MCE 可能通过上调 *JAM2* 的表达来促进紧密连接蛋白生成, 进而增强肠道屏障功能。

杯状细胞分泌的黏蛋白是一种覆盖在肠上皮细胞表面的大分子糖蛋白, 能防止外源致病菌入侵, 保护肠上皮细胞。在鸡肠道组织中的黏蛋白中 *MUC2* 和 *MUC5ac* 属于分泌型黏蛋白, *MUC13* 为跨膜黏蛋白。*MUC2* 是肠道黏液屏障的重要组成部分, 可作为判断肠道黏液屏障完整性的标记基因^[28]。Forder 等利用艾美耳球虫和产气荚膜梭菌双重感染显著降低了肉鸡空肠 *MUC2* mRNA

水平表达量^[29], 而 Van Klinken 等利用产气荚膜梭菌感染肉鸡则导致回肠组织 *MUC2* mRNA 水平表达显著升高^[30]。本研究中, 基础日粮添加抗生素和 MCE 均显著降低了黄羽肉鸡盲肠 *MUC2* mRNA 表达量的结果暗示, 肉鸡饲喂无抗日粮时可能引起肠道感染, 导致 *MUC2* mRNA 表达量上升, 但此结果还需进一步研究验证。先前的研究显示, *MUC5ac* 和 *MUC13* 在健康完整的肠道中表达量较低, 但当肠道黏液屏障受损或发生炎症时, 肠组织中 *MUC5ac* 和 *MUC13* mRNA 水平表达量显著升高^[31-32]。本研究中添加 MCE 下调盲肠组织 *MUC5ac* 和 *MUC13* mRNA 表达量的结果表明 MCE 可减少肠道损伤或炎症。由此可知, 日粮中添加 MCE 可通过上调盲肠组织紧密连接蛋白的 mRNA 表达, 减少肠受损黏蛋白 mRNA 表达, 增强肉鸡肠道屏障功能, 改善肉鸡生长性能。

4 结论

黄羽肉鸡日粮中添加 MCE 替代抗生素显著改善了肉鸡 FCR, 增加了盲肠长度, 促进有益菌增殖, 抑制有害菌生长, 增加短链脂肪酸生成, 上调紧密连接蛋白 mRNA 表达, 改善肠道屏障功能。本试验条件下 MCE 的最适添加量为 400 mg/kg。

参考文献

- [1] Hou B, Zeng JG. Biological activities of sanguinarine and application of *Macleaya cordata* extract in animal production. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(2): 413-420. (in Chinese)
侯博, 曾建国. 血根碱的生物学活性及博落回提取物在动物生产中的应用. *动物营养学报*, 2018, 30(2): 413-420.
- [2] Karimi M, Foroudi M, Abedini MR. Effect of sangrovit on performance and morphology of small intestine and immune response of broilers. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2014, 11(2): 855-861.
- [3] Kosina P, Gregorova J, Gruz J, Vacek J, Kolar M, Vogel M, Roos W, Naumann K, Simanek V, Ulrichova J. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 1006-1012.
- [4] Hu GL, Liu J, Liu YQ, Song ZH, Fan ZY, Zhang SR, He X. Effects of *Macleaya cordata* alkaloids and tea seed polysaccharide on growth performance, serum biochemical indexes and lipid peroxidation of yellow-feathered broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(11): 4626-4634. (in Chinese)
胡贵丽, 刘靖, 刘勇强, 宋泽和, 范志勇, 张石蕊, 贺喜. 博落回生物碱和茶籽多糖对黄羽肉鸡生长性能、血清生化指标及脂质过氧化的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(11): 4626-4634.
- [5] Huang H. Effects of *Macleaya cordata* extracts on production performance, muscle quality and immune performance in mahua broiler chicken. Master Dissertation of Hunan Agricultural University, 2017. (in Chinese)
黄海. 博落回提取物对麻花肉鸡生产性能、肌肉品质及免疫性能的影响. 湖南农业大学硕士学位论文, 2017.
- [6] Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li HL, Gao Z, Mahana D, Rodriguez JGZ, Rogers AB, Robine N, Loke P, Blaser MJ. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*, 2014, 158(4): 705-721.
- [7] Beuria TK, Santra MK, Panda D. Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, 2005, 44(50): 16584-16593.
- [8] Chowdhury K. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(10): 2792.
- [9] Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4605-4614.
- [10] Guo XL, Xia XJ, Tang RY, Wang KN. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of meishan and landrace pigs. *Anaerobe*, 2008, 14(4): 224-228.
- [11] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7220-7228.

- [12] Khafipour E, Li SC, Plaizier JC, Krause DO. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(22): 7115–7124.
- [13] Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(12): 4423–4427.
- [14] Chen JX, Tellez G, Richards JD, Escobar J. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 2015, 2: 14.
- [15] De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 122(3/4): 312–317.
- [16] Huang P, Zhang Y, Xiao KP, Jiang F, Wang HC, Tang DZ, Liu D, Liu B, Liu YS, He X, Liu H, Liu XB, Qing ZX, Liu CH, Huang JL, Ren YW, Yun L, Yin LJ, Lin Q, Zeng C, Su XG, Yuan JY, Lin L, Hu NX, Cao HL, Huang SW, Guo YM, Fan W, Zeng JG. The chicken gut *metagenome* and the modulatory effects of plant-derived benzylisoquinoline alkaloids. *Microbiome*, 2018, 6(1): 211.
- [17] Pan D, Yu ZT. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 2014, 5(1): 108–119.
- [18] Meimandipour A, Shuhaimi M, Soleimani AF, Azhar K, Hair-Bejo M, Kabeir BM, Javanmard A, Anas OM, Yazid AM. Selected microbial groups and short-chain fatty acids profile in a simulated chicken cecum supplemented with two strains of *Lactobacillus*. *Poultry Science*, 2010, 89(3): 470–476.
- [19] van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, van Knapen F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2536–2540.
- [20] Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(10): 577–589.
- [21] [21] Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1031–1064.
- [22] Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein Occludin and the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(45): 29745–29753.
- [23] Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News in Physiological Sciences*, 2001, 16: 126–130.
- [24] Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GBN, Agarwal S, Aggarwal BB. Sanguinarine (Pseudocheilerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(48): 30129–30134.
- [25] Liu G, Guan GP, Fang J, Martínez Y, Chen S, Bin P, Duraipandiyar V, Gong T, Tossou MCB, Al-Dhabi NA, Yin YL. *Macleaya cordata* extract decreased diarrhea score and enhanced intestinal barrier function in growing piglets. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 1069585.
- [26] Zhao HS, Yu HF, Martin TA, Zhang YX, Chen G, Jiang WG. Effect of junctional adhesion molecule-2 expression on cell growth, invasion and migration in human colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(3): 929–936.
- [27] Soendergaard C, Young JA, Kopchick JJ. Growth hormone resistance—special focus on inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 1019.
- [28] Johansson MEV, Phillipson MP, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(39): 15064–15069.
- [29] Forder REA, Nattrass GS, Geier MS, Hughes RJ, Hynd PI. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 2012, 91(6): 1335–1341.
- [30] Van Klinken BJ, Dekker J, Buller HA, Einerhand AW. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1995, 269(5): G613–G627.
- [31] Rajan D, O’Keefe EL, Travers C, McCracken C, Geoghegan S, Caballero MT, Acosta PL, Polack F, Anderson LJ. MUC5AC levels associated with respiratory syncytial virus disease severity. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 67(9): 1441–1444.
- [32] Filippou PS, Ren AH, Korbakis D, Dimitrakopoulos L, Soosaipillai A, Barak V, Frenkel S, Pe’er J, Lotem M, Merims S, Molina R, Blasutig I, Bogdanos DP, Diamandis EP. Exploring the potential of mucin 13 (MUC13) as a biomarker for carcinomas and other diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2018, 56(11): 1945–1953.

Effects of *Macleaya cordata* extracts instead of antibiotics on growth performance, caecum microbes and tight junction gene expression of yellow-feathered broilers

Maomao Chai¹, Yuguang Guo¹, Yangyuan Li¹, Yu Peng^{1,2*}, Yonghua Wang²

¹ Guangdong VTR BIO-Tech Co., Ltd, Zhuhai 519060, Guangdong Province, China

² South China University of Technology School of Food Science and Engineering, Guangzhou 510640, Guangdong province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to evaluate the effects of *Macleaya cordata* extracts (MCE) instead of antibiotics on growth performance, caecum microbes, short chain fatty acids (SCFAs) and tight junction mRNA expression in yellow-feathered broilers. [Methods] A total of 300 one-day-old Wenshi new yellow broilers No. 2 with similar body weight were randomly allotted to 5 groups, with 6 replicates and 10 broilers per replicate. Broilers in control group were fed a basal diet (NC) and broilers in antibiotic group (ANT), fed a basal diet with 50 mg/kg Nosiheptide and 50 mg/kg chlortetracycline, while those in the treatment groups were fed a basal diet supplemented with 200, 400 and 800 mg/kg MCE. The experiment was lasted for 60 days. [Results] The addition of 400 mg/kg MCE to replace antibiotic growth promoter in yellow-feathered broilers diet significantly reduced ($P<0.05$) the feed conversion ratio, and significantly increased ($P<0.05$) the length of the cecum. Dietary supplementation with MCE significantly increased ($P<0.05$) the cecal Firmicutes and *Clostridium cluster XIVa* counts and significantly decreased ($P<0.05$) the *Escherichia coli* counts. Supplemented with 400 and 800 mg/kg MCE to replace AGPs significantly increased ($P<0.05$) the cecal total short-chain fatty acids, acetic acid and butyric acid, and 400 mg/kg MCE significantly increased the branched-chain fatty acids, including isobutyrate and isovalerate ($P<0.05$). Supplementation with MCE in no AGPs diet significantly increased the expression of *Claudin-1*, *JAM2* and *ZO-1* ($P<0.05$). And MCE instead of AGPs significantly increased the expression of *JAM2* ($P<0.05$). However, the addition of MCE to the diet significantly reduced the gene expression of *MUC2*, *MUC5ac* and *MUC13* ($P<0.05$). [Conclusion] The MCE replace dietary AGPs of yellow-feathered broilers improves the growth performance promotes caecum growth, and help to establish a stable and healthy intestinal barrier which through increasing the number of beneficial bacteria, SCFAs concentration and regulate the expression of tight junction proteins expression. The optimal addition amount of MCE under this experiment is 400 mg/kg.

Keywords: *Macleaya cordata* extracts, yellow-feathered broilers, caecum microbes, tight junction

(本文责编: 李磊)

Supported by the Project of Zhuhai Innovation and Entrepreneurship Team

*Corresponding author. Email: ngyu@vtrbio.com

Received: 13 November 2019; Revised: 16 January 2020; Published online: 2020