动物营养学报 2019,31(9):4242-4250
Chinese Journal of Animal Nutrition

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2019.09.038

补喂复合益生菌制剂对幼犬生长性能、肠道动力及肠道屏障功能的影响

陆　江[1]　朱道仙[2*]　卢鹏飞[3]　张东豪[2]　刘　静[1]　傅宏庆[1]

(1.江苏农牧科技职业学院宠物科技学院,泰州 225300;2.江苏农牧科技职业学院动物医学院,泰州 225300;
3.江苏雅博动物健康科技有限责任公司,泰州 225300)

摘　要: 本试验旨在研究补喂复合益生菌制剂对幼犬生长性能、肠道动力及肠道屏障功能的影响。选取40只6周龄左右的贵宾犬,随机分为5组,每组2个重复,每个重复4只犬。其中,试验A组幼犬饲喂基础饲粮+0.2 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,试验B组幼犬饲喂基础饲粮+0.6 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,试验C组幼犬饲喂基础饲粮+1.0 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,阴性对照组幼犬饲喂基础饲粮,对比对照组幼犬饲喂基础饲粮+1.0 g/(kg BW·d)宠儿香康源益生菌,进行为期30 d的饲养试验。试验结束后取样,用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清胃肠激素含量和肠道屏障功能指标,免疫比浊法检测血清炎性细胞因子含量,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测空肠黏膜中相关基因mRNA的相对表达量。结果显示:1)随着复合益生菌制剂补喂剂量的增加,终末体重和平均日增重增加,腹泻率和便秘率降低,其中试验C组平均日增重显著高于其他各组($P<0.05$),腹泻率和便秘率显著低于阴性对照组($P<0.05$)。2)随着复合益生菌制剂补喂剂量的增加,血清中胃动素(MTL)、白细胞介素-10(IL-10)含量呈升高趋势,血管活性肠肽(VIP)、*D*-乳酸、内毒素(LPS)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量与二胺氧化酶(DAO)活性呈降低趋势,其中试验C组与阴性对照比较差异显著($P<0.05$),与对比对照组相比差异不显著($P>0.05$)。3)随着复合益生菌制剂补喂剂量的增加,回肠黏膜闭合蛋白(occludin)、闭锁小带蛋白-1(*ZO*-1)mRNA的相对表达量呈上调趋势,肌球蛋白轻链激酶(*MLCK*)mRNA的相对表达量呈下调趋势,其中试验C组与阴性对照组差异显著($P<0.05$),与对比对照组差异不显著($P>0.05$),且*ZO*-1 mRNA的相对表达量显著高于试验A组和试验B组($P<0.05$)。以上结果表明,补喂复合益生菌制剂可增强幼犬胃肠动力和肠道屏障功能,缓解炎症应激,改善生长性能,以每天补喂1.0 g/kg BW效果最佳。

关键词: 复合益生菌制剂;幼犬;生长性能;肠道动力;肠道屏障功能

中图分类号:S892.2　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006-267X(2019)09-4242-09

宠物幼犬消化道发育并未完全,消化功能薄弱,胃肠蠕动能力较差,胃肠屏障功能不完善,容易激发炎症反应,导致疾病的发生[1]。不少学者针对幼犬健康从营养学、病原学及免疫学等角度进行研究,取得不少成果,而关于微生态制剂在宠物食品及疾病防治方面的运用报道较少[2]。研究表明,动物双歧杆菌具有维持肠道菌群平衡、增强免疫系统及控制内毒素产生等多种促进健康和预防疾病的益生及保健作用[3]。地衣芽孢杆菌进入动物肠胃后可分泌大量的消化酶,刺激肠道蠕动,

收稿日期:2019-03-18

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划项目(201812806015Y);江苏农牧科技职业学院横向课题配套项目(NSFPT201845,NSFPT201842)

作者简介:陆　江(1982—),男,江苏新沂人,讲师,硕士,主要从事动物临床营养及代谢病研究。E-mail: vetlj@163.com

* 同等贡献作者

增强动物消化吸收营养物质的能力[4]。乳酸链球菌可分泌乳酸链球菌素,在肠道定植后可形成一道天然屏障来抵御外来病原菌的入侵[5]。屎肠球菌是一种产乳酸菌,在动物体内可调节肠道菌群结构、肠道形态与黏液层以及肠上皮细胞免疫功能[6]。上述单一益生菌在动物上均有应用,但多种益生菌联合应用的研究较少。因此,本试验拟将动物双歧杆菌、地衣芽孢杆菌、乳酸链球菌和屎肠球菌,根据各自功效特点按一定比例制成复合益生菌制剂,通过分析不同补喂剂量的复合益生菌制剂对幼犬生长性能、肠道动力及肠道屏障功能的影响,评估该复合益生菌制剂对幼犬生长发育及促进健康方面的功效,为其在宠物幼犬保健方面的应用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验用复合益生菌制剂购于江苏雅博动物健康科技有限责任公司,含动物双歧杆菌(ATCC 25527,活菌数≥1.2×10^9 CFU/g)、地衣芽孢杆菌(ATCC 14580,活菌数≥0.4×10^9 CFU/g)、乳酸链球菌(BNCC 175978,活菌数≥0.2×10^9 CFU/g)和屎肠球菌(BNCC 194759,活菌数≥0.2×10^9 CFU/g),总菌数≥2.0×10^9 CFU/g。对比益生菌为宠儿香康源益生菌(总菌数≥1.5×10^8 CFU/g),含嗜酸乳杆菌(活菌数≥5×10^7CFU/g)、粪肠球菌(活菌数≥5×10^7CFU/g)和长双歧杆菌(活菌数≥5×10^7CFU/g),购于北京百林康源生物技术有限公司。

1.2　试验动物与分组

将 40 条 6 周龄左右的贵宾犬(泰迪型,由江苏省宠物繁育中心提供)随机分为 5 组,每组 2 个重复,每个重复 4 只犬。其中,试验 A 组幼犬饲喂基础饲粮+0.2 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,试验 B 组幼犬饲喂基础饲粮+0.6 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,试验 C 组幼犬饲喂基础饲粮+1.0 g/(kg BW·d)复合益生菌制剂,阴性对照组幼犬饲喂基础饲粮,对比对照组幼犬饲喂基础饲粮+1.0 g/(kg BW·d)宠儿香康源益生菌。所有益生菌制剂均溶于 20 mL 温开水后灌服。试验开始前先饲喂基础饲粮 7 d,预饲结束后进行为期 30 d的饲养试验,试验期间犬只单笼饲养,自由采食、饮水,环境温度为室温,每天对饲养环境及用具进行消毒。基础饲粮参考 NRC(2016)犬营养标准配制,其组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	13.0
小麦 Wheat	6.0
米粉 Rice noodle	11.0
豆粕 Soybean meal	22.0
鸡肉粉 Chicken powder	16.0
鸭脂 Duck fat	20.0
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	5.0
贝壳粉 Shell powder	3.5
犬用风味剂 Flavor for dogs	2.0
食盐 NaCl	0.5
预混剂 Premix[1)]	1.0
合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels[2)]	
代谢能 ME/(MJ/kg)	15.36
粗蛋白质 CP	26.41
赖氨酸 Lys	1.12
粗脂肪 CF	16.36
钙 Ca	1.53
总磷 TP	0.87

[1)] 预混剂为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet: Fe 55 mg, Mn 88 mg, Cu 5.5 mg, Zn 88 mg, I 1.7 mg, Se 0.3 mg, VA 8 800 IU, VD_3 3 300 IU, VE 55.4 IU, VK 2.2 mg, VB_1 1.7 mg, VB_2 5.5 mg, 泛酸 pantothenic acid 6.6 mg, 烟酸 nicotinic acid 28 mg, 吡哆醇 pyridoxine 3.3 mg, 生物素 biotin 0.1 mg, 叶酸 folic acid 0.6 mg, 钴胺素 cobalamin 0.05 mg。

[2)] 代谢能为计算值,其余为实测值。ME was a calculated value, while the others were measured values.

1.3　样品采集

1.3.1　血清制备

试验结束后,各组幼犬空腹经前臂头静脉采血 5 mL 装入试管中,在 37 ℃水浴锅中静置,待分层后吸取上清液于离心管中,按 1 500 r/min 离心 5 min,取上清液置于 4 ℃冰箱中保存待测。

1.3.2　肠黏膜制备

采血完成后,每个重复选择 2 只幼犬屠宰,打开腹腔,取回肠中段约 5 cm,刮取肠黏膜,用锡箔纸包裹后,置液氮中保存备用。

1.4 指标测定

1.4.1 生长性能测定

在试验前1天和试验结束后1天早晨,对各组幼犬分别空腹称重,计算平均日增重。试验期间每天定时观察记录各重复幼犬的腹泻和便秘只次,计算腹泻(便秘)率。

平均日增重=(终末总体重-初始总体重)/(试验天数×试验只数);

腹泻(便秘)率(%)=100×累计腹泻(便秘)只次/(试验只数×试验天数)。

1.4.2 血清胃肠激素含量的测定

采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清中胃动素(MTL)、胃泌素(GAS)、P物质(SP)和血管活性肠肽(VIP)的含量,试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,操作均按照试剂盒附带说明书执行。

1.4.3 血清肠道屏障功能指标的测定

采用ELISA法检测血清中二胺氧化酶(DAO)活性及*D*-乳酸和内毒素(LPS)的含量,DAO活性检测试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司,*D*-乳酸和LPS含量ELISA试剂盒购于上海彩佑实业有限公司,操作均按照试剂盒附带说明书执行。

1.4.4 血清炎性细胞因子含量的测定

采用免疫比浊法测定血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-10(IL-10)的含量,试剂盒购于南京建成生物工程研究所,操作均按照试剂盒附带说明书执行。

1.4.5 空肠黏膜相关基因mRNA表达的相对定量

取空肠黏膜,用Trizol Reagent提取肠道组织中的总RNA,反转录后采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参基因,检测幼犬空肠黏膜中闭合蛋白(occludin)、闭锁小带蛋白-1(*ZO*-1)及肌球蛋白轻链激酶(*MLCK*)基因mRNA的相对表达量,引物由有上海生工生物技术有限公司设计和合成,详见表2。目的基因mRNA的相对表达量用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

表2 引物信息

Table 2 Primer information

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5′—3′)	片段长度 Fragment length/bp
闭合蛋白 Occludin	F:CAGCAGCACTGGTTACTTGC R:CCGTCGTGTTGTCTCTTTCTCG	110
闭锁小带蛋白-1 *ZO*-1	F:CGGCGAAGCTTATTCAGTGT R:TCTTCTCCGTTTGGAGGTCT	111
肌球蛋白轻链激酶 *MLCK*	F:CCTGAGGACAACATGGAGCA R:TTCTCGGTCTCTTCCCAGAG	113
β-肌动蛋白 β-actin	F:ATGCTTCTTGGCGCACGTGT R:CCTTCCTACCGAGTGGTCT	146

1.5 数据统计与分析

试验数据用SPSS 19.0软件的单因素分析分析程序进行组间差异统计学检验,腹泻率用卡方检验,结果用平均值±标准差表示,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 补喂复合益生菌制剂对幼犬生长性能的影响

由表3可知,各组初始体重无显著差异($P>0.05$)。与阴性对照组相比,试验C组的终末体重、平均日增重显著升高($P<0.05$),腹泻率、便秘率显著降低($P<0.05$);试验B组仅平均日增重显著升高($P<0.05$);试验A组各指标无显著变化($P>0.05$)。与对比对照组相比,试验C组的平均日增重显著升高($P<0.05$);试验B组各指标无显著变化($P>0.05$);试验A组的终末体重、平均日增重显著降低($P<0.05$),腹泻率、便秘率显著升高($P<0.05$)。

表 3　补喂复合益生菌制剂对幼犬生长性能的影响

Table 3　Effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on growth performance of puppies

组别 Groups	初始体重 Initial weight/g	终末体重 Final weight/g	平均日增重 Average daily gain/[g/(d·只)]	腹泻率 Diarrhea rate/%	便秘率 Constipation rate/%
阴性对照组 Negative control group	623.1±60.4	1 176.7±98.8[a]	18.3±1.6[a]	6.67[a]	4.58[a]
试验 A 组 Test group A	617.5±61.2	1 184.4±104.3[a]	18.6±1.0[a]	5.33[a]	4.26[a]
试验 B 组 Test group B	600.8±59.8	1 203.9±98.5[ab]	20.0±1.2[b]	3.75[ab]	1.67[ab]
试验 C 组 Test group C	604.5±58.6	1 244.8±92.4[b]	22.2±2.5[c]	2.08[b]	0.83[b]
对比对照组 Contrast control group	619.7±62.3	1 237.4±97.1[b]	20.2±1.5[bd]	2.50[ab]	1.25[b]

同列数据肩标相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

In the same column, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2　补喂复合益生菌制剂对幼犬血清胃肠激素含量的影响

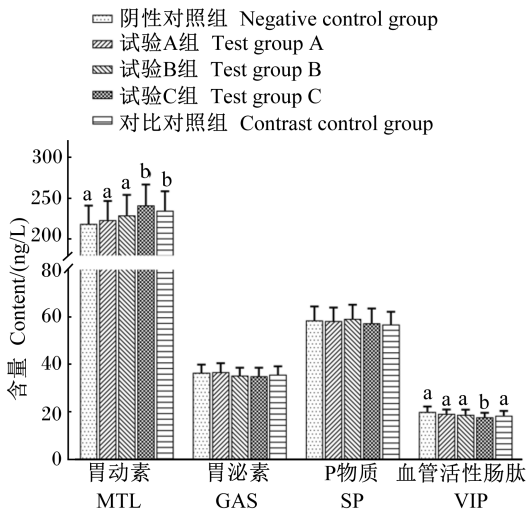
补喂复合益生菌制剂对幼犬血清胃肠激素含量的影响见图 1。与阴性对照组相比,试验 C 组血清中 MTL 含量升高[(241.2±25.6) ng/L vs. (218.6±22.4) ng/L],差异显著($P<0.05$),VIP 含量降低[(17.8±1.9) ng/L vs. (20.1±2.2) ng/L],差异显著($P<0.05$),GAS 和 SP 含量变化不大,无显著差异($P>0.05$);试验 A 组、试验 B 组各指标均无显著变化($P>0.05$)。与对比对照组相比,各试验组血清中 MTL、GAS、SP 和 VIP 含量均无显著变化($P>0.05$)。

2.3　补喂复合益生菌制剂对幼犬血清肠道屏障功能指标的影响

由表 4 可知,试验 C 组血清中 DAO 活性及 *D*-乳酸和 LPS 含量均低于阴性对照组,差异显著($P<0.05$),与对比对照组则无显著差异($P>0.05$);试验 A 组、试验 B 组血清中 DAO 活性、*D*-乳酸含量与阴性对照组、对比对照组均无显著差异($P>0.05$),而 LPS 含量则显著低于阴性对照组($P<0.05$)。

2.4　补喂复合益生菌制剂对幼犬血清炎性细胞因子含量的影响

由表 5 可知,与阴性对照组相比,试验 C 组血清中 TNF-α 含量显著降低($P<0.05$),IL-10 含量显著升高($P<0.05$);试验 B 组血清中 TNF-α 含量显著降低($P<0.05$)。与对比对照组相比,各试验组血清中 TNF-α、IL-10 含量均无显著变化($P>0.05$)。血清中 IL-6 含量各组间均无显著变化($P>0.05$)。



数据柱上标相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下图同。

Value columns with the same or no letters mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letters mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

图 1　补喂复合益生菌制剂对幼犬血清胃肠激素含量的影响

Fig.1　Effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on gastrointestinal hormone contents in serum of puppies

2.5　补喂复合益生菌制剂对幼犬空肠黏膜相关基因mRNA 相对表达量的影响

补喂复合益生菌制剂对幼犬空肠黏膜相关基因 mRNA 相对表达量的影响见图 2。与阴性对照组比较,试验 C 组空肠黏膜中 occludin mRNA的相对表达量显著上调($P<0.05$);试验 C 组和试验 B 组 *ZO*-1 mRNA 的相对表达量上调,*MLCK* mRNA

的相对表达量下调,差异均显著($P<0.05$);试验 A 组各基因 mRNA 的相对表达量无显著变化($P>0.05$)。与对比对照组比较,试验 A 组空肠黏膜中 occludin、*ZO*-1 mRNA 的相对表达量显著降低($P<0.05$),*MLCK* mRNA 的相对表达量显著升高($P<0.05$);试验 B 组和试验 C 组各基因 mRNA 的相对表达量无显著变化($P>0.05$)。此外,试验 C 组空肠黏膜中 occludin mRNA 的相对表达量显著高于试验 A 组($P<0.05$),*ZO*-1 mRNA 的相对表达量显著高于试验 A 组和试验 B 组($P<0.05$),试验 C 组和试验 B 组空肠黏膜中 *MLCK* mRNA 的相对表达量显著低于试验 A 组($P<0.05$)。

表 4 补喂复合益生菌制剂对幼犬血清肠道屏障功能指标的影响

Table 4 Effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on intestinal barrier function indicators in serum of puppies

组别 Groups	二胺氧化酶 DAO/(U/L)	*D*-乳酸 *D*-lactic acid/(mg/mL)	脂多糖 LPS/(EU/mL)
阴性对照组 Negative control group	56.71±2.35[a]	45.68±1.61[a]	4.36±0.22[a]
试验 A 组 Test group A	55.33±3.78[ab]	44.79±3.28[ab]	4.12±0.19[b]
试验 B 组 Test group B	55.90±3.24[ab]	44.47±3.08[ab]	4.10±0.18[b]
试验 C 组 Test group C	52.76±3.58[b]	41.25±3.51[b]	4.05±0.13[b]
对比对照组 Contrast control group	53.63±3.59[ab]	42.51±2.69[b]	4.00±0.16[b]

表 5 补喂复合益生菌制剂对幼犬血清炎性细胞因子含量的影响

Table 5 Effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on inflammatory cytokine contents in serum of puppies ng/L

组别 Groups	白细胞介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子-α TNF-α	白细胞介素-10 IL-10
阴性对照组 Negative control group	235.71±18.99	145.92±11.27[a]	150.00±13.47[a]
试验 A 组 Test group A	226.44±19.26	138.38±10.21[ab]	153.80±9.04[ab]
试验 B 组 Test group B	230.32±20.12	135.94±9.49[b]	158.39±11.39[ab]
试验 C 组 Test group C	228.93±14.45	131.65±7.92[b]	163.41±11.32[b]
对比对照组 Contrast control group	223.86±17.78	135.55±10.94[b]	155.14±10.21[ab]

3 讨 论

3.1 补喂复合益生菌制剂对对幼犬生长性能的影响

幼犬由于断奶应激、饲养环境改变及母源抗体降低等因素很容易导致消化功能紊乱,进一步影响其生长发育。而益生菌作为一类有益于宿主的活性微生物,常作为饲料添加剂应用于畜牧生产上,益生菌通过维持肠道菌群平衡,保持益生菌优势地位,促进肠胃消化吸收,从而提高生产性能。研究表明,不论单种益生菌还是复合益生菌均具有一定促进幼犬生长的作用。吴德华等[7]在研究纳豆芽孢杆菌对断奶仔犬增重和肠道菌群影响的试验中发现饲粮中添加 0.2%的纳豆芽孢杆菌可使仔犬平均日增重提高 27.48%;燕珍寿等[8]发现给予复合益生菌制剂不但可提高幼龄金毛巡回猎犬的平均日增重和料重比,还可减少腹泻的发病率。本研究结果表明,补喂不同剂量的复合益生菌制剂均可提高幼犬的平均日增重,降低腹泻率,且试验 C 组效果>试验 B 组>试验 A 组,呈量效关系。这可能是由于复合益生菌制剂中的地衣芽孢杆菌增强了肠道消化酶活性,提高了营养物质利用率所致,另外,这些益生菌进入肠道后均可抑制致病菌生长,从而减少腹泻的发生。

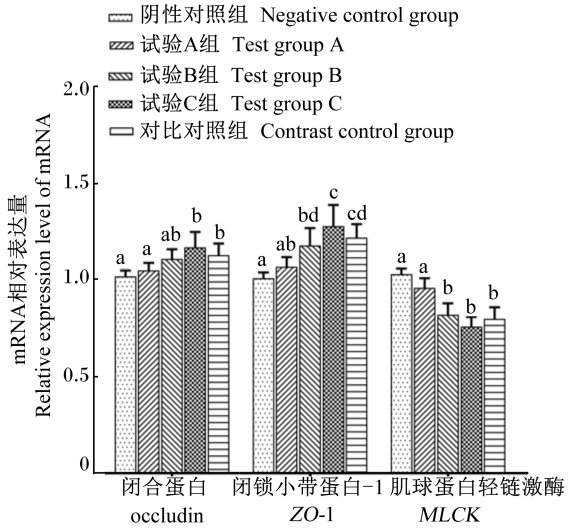


图 2　补喂复合益生菌制剂对幼犬空肠黏膜相关基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.2　Effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on mRNA relative expression levels of related genes in jejunum mucosa of puppies

3.2　补喂复合益生菌制剂对幼犬胃肠动力的影响

胃肠运动,特别是胃肠移行性复合运动(MMC),具有促进消化道内营养物质消化吸收的作用,主要受肠神经系统和胃肠激素调节[9]。近年来的研究指出,MLT 可刺激 MMC 的发生与移行,是启动移行性复合运动Ⅲ相的重要启动因子之一[10]。GAS 可刺激胃酸、胰液和胆汁的分泌,延缓胃排空,提高胃肠道化学消化吸收能力[11-12]。莫伟彬等[13]研究发现,补充益生菌可以提高竭性运动大鼠血清中 MLT、GAS 含量,并使其逐渐恢复到安静时的水平。SP 可明显引起肠运动增强、胆囊收缩、胰液分泌量增加,并可刺激唾液分泌,Bayguinov 等[14]发现 SP 可通过刺激胃肠壁内神经元的去极化,促使胃肠道平滑肌的收缩。以上 3 种物质均为兴奋消化道运动的胃肠激素,而 VIP 是一种抑制消化道运动的激素,能引起人和动物胃肠平滑肌的强烈舒张。赵力芳[15]在研究双歧杆菌三联活菌胶囊治疗儿童腹泻时发现,益生菌能显著降低 VIP 及 5-HT 含量,从而有效改善临床症状,提高疗效。本研究发现,补喂复合益生菌制剂可以在生理范围内提升血清中 MLT 含量,降低 VIP 含量,以试验 C 组效果最佳。根据结果推断,对胃肠激素 MLT、VIP 的调节是是本试验所用复合益生菌制剂维护幼犬健康的作用机制之一。

3.3　补喂复合益生菌制剂对幼犬肠道屏障功能的影响

DAO 是肠黏膜上层绒毛细胞内酶,胃肠黏膜受损后,大量的 DAO 被释放入肠腔,并通过肠壁细胞间隙及淋巴回流到达血液循环,血浆 DAO 的活性与肠黏膜上皮细胞的完整性和成熟度密切相关。Fukudome 等[16]通过给小鼠注射 5-氟尿嘧啶证实 DAO 活性反映了肠道黏膜的损伤程度。*D*-乳酸是肠道细菌的代谢产物,肠黏膜受损后肠腔内大量 *D*-乳酸通过受损部位进入血液,使血液中 *D*-乳酸含量升高,因此血液中 *D*-乳酸含量升高往往提示肠黏膜损伤及通透性增高[17]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的成分,现有研究认为,LPS 的分子质量比细菌小,更容易穿过肠道黏膜屏障,肠道黏膜屏障受损后,可导致血液中 LPS 含量升高。有研究表明,益生菌降低急性腹泻大鼠血液中 *D*-乳酸和 LPS 含量,减轻腹泻指数[18]。本研究结果表明,按 1.0 g/(kg BW · d)的剂量补喂复合益生菌制剂可降低幼犬血清中 DAO 活性及 *D*-乳酸和 LPS 的含量,而其他 2 个剂量的效果不明显,说明高剂量复合益生菌具有降低肠黏膜通透性,减少肠道中 LPS 进入血液循环。

幼犬免疫系统发育不完全,容易受到断奶应激、饲粮改变及环境改变等因素的影响,特别是肠道内 LPS,容易激发促炎细胞因子 IL-6、TNF-α 等,抑制抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 等。研究发现,炎性细胞因子对肠道屏障有着一定的影响,促炎细胞因子损伤肠道黏膜屏障,增加上皮通透性,提高病原菌易感性,从而激活甚至扩大炎症反应[19];相反,抗炎细胞因子能够通过降低肠道上皮通透性,缓解肠道炎症反应和肠道黏膜损伤[20]。Sturm 等[21]的研究认为益生菌能够通过调控 TNF-α、TNF-β、IL-10 等细胞炎症介质来起到抑制肠道炎症的作用。Custodero 等[22]通过 Meta 分析发现,益生菌可以显著地减少中老年人血清中 IL-6 和 C-反应蛋白的含量,从而减少全身性炎症的发生。本研究发现,复合益生菌制剂可以降低血清中 TNF-α 的含量,试验 C 组和试验 B 组与阴性对照组有显著差异,与对比对照组差异不显著,且试验 C 组血清中 IL-10 含量上升。上述结果说明本试验所用复合益生菌制剂可以抑制促炎细胞因子,激发抗炎细胞因子,发挥缓解机体炎症反应,提高肠道黏膜屏障功能,减少疾病发生,且呈量效关系。

紧密连接相关蛋白是胃肠道机械屏障的基础结构,可维持正常的细胞旁通透性,防止大分子有毒物质如细菌代谢产物等通过细胞旁连接入侵机体,主要包括跨膜蛋白 occludin、封闭蛋白-1(claudin-1)及胞内蛋白 ZO-1 等,其含量变化和结构改变均可影响肠道屏障功能。研究发现,MLCK 对紧密连接相关蛋白表达及结构具有调控作用,*MLCK*表达量的增加可提高肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化水平,导致与其相连的 ZO-1 和 occludin 蛋白结构发生变化,表达量降低,从而提高肠上皮细胞旁通透性[23]。先已证实益生菌可提高紧密连接蛋白的表达,增强上皮紧密连接的完整性。给新生仔猪口服罗伊氏乳杆菌 I5007 后,空肠和回肠上皮 occludin、ZO-1、claudin-1 的蛋白表达量显著增加[24]。在饲粮中添加 0.02%的植物乳酸杆菌可提高断奶仔猪肠道黏膜 occludin-1、*ZO*-1 基因 mRNA的表达量[25]。但关于益生菌与 MLCK 相互关系的研究较少。本研究中,复合益生菌制剂不但可上调幼犬空肠黏膜 occludin、*ZO*-1 基因 mRNA的相对表达量,还可下调 *MLCK* 基因mRNA 的相对表达量,说明该复合益生菌制剂提高肠道机械性屏障作用涉及到肠道紧密连接蛋白及其信号转导调节,具体机制还需进一步研究。

4 结 论

综上所述,补喂复合益生菌制剂可以提高幼犬的平均日增重,减少腹泻率和便秘率,增强胃肠动力,降低肠黏膜损伤,保护肠黏膜机械性屏障作用,缓解机体炎症反应水平,说明复合益生菌制剂对幼犬具有保健作用,按每天 1 g/kg BW 的剂量补喂时效果最佳。

参考文献:

[1] 陈丽玲,陈丽雄.Beagle 幼犬腹泻的综合防治[J].中国畜牧兽医,2006,33(11):90-91.

[2] SALISU S S,NURA S,SHAAIBU A S,et al.Potentials of probiotics as alternative therapy in combating bacterial diseases:a review[J].British Journal of Applied Science and Technology,2014,4(9):1392-1410.

[3] MAKIOKA Y,TSUKAHARA T,IJICHI T,et al.Oral supplementation of *Bifidobacterium longum strain* BR-108 alters cecal microbiota by stimulating gut immune system in mice irrespectively of viability[J].Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry,2018,82(7):1180-1187.

[4] 曹煜成,李卓佳,冯娟,等.地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究[J].热带海洋学报,2005,24(6):6-12.

[5] 王运东,张俊秀,韩真.微生态制剂干预肠易激综合征患者疗效 meta 分析[J].中国微生态学杂志,2011,23(6):543-545.

[6] CHIANG M L,CHEN H C,CHEN K N,et al.Optimizing production of two potential probiotic *Lactobacilli* strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets[J].Asian-Australasian Journal of Animal Science,2015,28(8):1163-1170.

[7] 吴德华,杜莉,徐汉坤,等.纳豆芽孢杆菌对仔犬日增重和肠道菌群的影响[J].家畜生态学报,2009,30(3):64-67.

[8] 燕珍寿,许琴,周宇翔.添加益生菌对仔犬生长性能影响的研究[J].中国畜牧兽医文摘,2014,30(5):200,201.

[9] 赵平,董蕾,兰康,等.多种胃肠激素在消化间期移行性复合运动中作用的研究[J].中华消化杂志,2005,25(2):95-97.

[10] CARLINI V P,GHERSI M,SCHIÖTH H B,et al.Ghrelin and memory:differential effects on acquisition and retrieval[J].Peptides,2010,31(6):1190-1193.

[11] 牛亭惠,吴国泰,陈振鹤,等.幼龄厌食模型大鼠胃肠激素变化规律研究进展[J].甘肃中医学院学报,2017,34(1):82-85.

[12] DOCKRAY G,DIMALINE R,VARRO A.Gastrin:old hormone,new functions[J].Pflügers Archiv,2005,449(4):344-355.

[13] 莫伟彬,杨衍滔,郭艳菊,等.益生菌干预对运动大鼠胃肠激素与 AQP4 表达的影响[J].中国实验动物学报,2018,26(4):411-417.

[14] BAYGUINOV O,HAGEN B,SANDERS K M.Substance P modulates localized calcium transients and membrane current responses in murine colonic myocytes[J].British Journal of Pharmacology,2003,138(7):1233-1243.

[15] 赵力芳.双歧杆菌三联活菌胶囊联合思密达对儿童腹泻血浆 VIP、NPY 及肠黏膜 5-HT 的影响[J].中国微生态学杂志,2015,27(8):917-920.

[16] FUKUDOME I,KOBAYASHI M,DABANAKA K,et al.Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats[J].Medical Molecular Morpholo-

gy,2014,47(2):100-107.

[17] 朱锦龙,方兴亮.急性胰腺炎患者早期血浆 *D*-乳酸和内毒素水平与病情严重度评估系统的相关性研究[J].中华危重症医学杂志(电子版),2013,6(5):41-43.

[18] 胡长霞.益生菌对轮状病毒性腹泻小鼠肠道屏障的影响及机制的探讨[D].硕士学位论文.武汉:华中科技大学,2013.

[19] AL-SADI R,YE D M,SAID H M,et al.Cellular and molecular mechanism of interleukin-1β modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine,2011,15(4):970-982.

[20] FORSYTH C B,BANAN A,FARHADI A,et al.Regulation of oxidant-induced intestinal permeability by metalloprotease-dependent epidermal growth factor receptor signaling[J].Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,2007,321(1):84-97.

[21] STURM A,RILLING K,BAUMGART D C,et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via Toll-like receptor 2 signaling[J].Infection and Immunity,2005,73(3):1452-1465.

[22] CUSTODERO C,MANKOWSKI R T,LEE S A,et al.Evidence-based nutritional and pharmacological interventions targeting chronic low-grade inflammation in middle-age and older adults:a systematic review and meta-analysis[J].Ageing Research Reviews,2018,46:42-59.

[23] CHEN S W,ZHU J,ZUO S,et al.Protective effect of hydrogen sulfide on TNF-α and IFN-γ-induced injury of Intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers[J].Inflammation Research,2015,64(10):789-797.

[24] 杨凤娟,曾祥芳,谯仕彦.罗伊氏乳杆菌 I5007 对新生仔猪肠道形态、二糖酶活性和紧密连接蛋白表达的影响[J].中国农业科学,2014,47(22):4506-4515.

[25] 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.

Effects of Supplementary Feeding Complex-Probiotic-Preparation on Growth Performance, Intestinal Motility and Intestinal Barrier Function of Puppies

LU Jiang[1]　ZHU Daoxian[2*]　LU Pengfei[3]　ZHANG Donghao[2]　LIU Jing[1]　FU Hongqing[1]

(1. *Department of Pet Science and Technology, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou* 225300, *China*; 2. *Department of Animal Medicine, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou* 225300, *China*; 3. *Abram (Jiangsu) Animal Heath Co., Ltd., Taizhou* 225300, *China*)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the effects of supplementary feeding complex-probiotic-preparation on growth performance, intestinal motility and intestinal barrier function of puppies. Forty poodles at the age about 6 weeks were randomly divided into five groups with 2 replicates in each group and 4 poodles in each replicate. Among them, poodles in test group A were fed a basal diet+0.2 g/(kg BW · d) complex-probiotic-preparation; poodles in test group B were fed the basal diet+0.6 g/(kg BW · d) complex-probiotic-preparation; poodles in test group C were fed the basal diet+1.0 g/(kg BW · d) complex-probiotic-preparation; poodles in negative control group were fed the basal diet; and poodles in contrast control group were fed the basal diet+1.0 g/(kg BW · d) G-pet probiotic powder. The experiment lasted for 30 days. After experiment to sampling, the contents of gastrointestinal hormones and intestinal barrier function indicators in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, serum inflammatory factor contents

Author, LU Jiang, lecturer, E-mail: vetlj@163.com

* Contributed equally

were detected by immunoturbidimetry, and mRNA relative expression levels of related genes in jejunum mucosa were detected by quantitative real-time fluorescence PCR (RT-qPCR). The results showed as follows: 1) with the increase of feeding dosage of complex-probiotic-preparation, the final weight and average daily gain were increased, and the diarrhea rate and constipation rate were decreased. The average daily gain of test group C was significantly higher than that of other groups ($P<0.05$), and the diarrhea rate and constipation rate were significantly lower than those of negative control group ($P<0.05$). 2) With the increase of feeding dosage of complex-probiotic-preparation, the contents of motilin (MTL) and interleukin-10 (IL-10) in serum showed an increase trend, while the contents of asoactive intestinal peptide (VIP), *D*-lactic acid, lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) and the activity of diamine oxidase (DAO) in serum showed a decrease trend. Significant differences in above indices were found between test group C and negative control group ($P<0.05$), but no significant differences were found between test group C and contrast control group ($P>0.05$). 3) With the increase of feeding dosage of complex-probiotic-preparation, the mRNA relative expression levels of occludin and zonula occluden-1 (*ZO*-1) in ileal mucosa were up-regulated, while the mRNA relative expression level of myosin light-chain kinase (*MLCK*) was down-regulated. Significant differences in above indices were found between test group C and negative control group ($P<0.05$), but no significant differences were found between test group C and contrast control group ($P>0.05$). The mRNA relative expression level of ZO-1 in test group C was significantly higher than that of test groups A and B ($P<0.05$). In summary, supplementary feeding complex-probiotic-preparation can enhance the gastrointestinal motility and intestinal barrier function, alleviate the inflammatory stress and improve the growth performance of puppies, and the best supplementary feeding dosage is 1.0 g/kg BW per day. [***Chinese Journal of Animal Nutrition***, **2019**, **31**(**9**): **4242-4250**]

Key words: complex-probiotic-preparation; puppy; growth performance; intestinal motility; intestinal barrier function

(责任编辑 管景颖)