

贺濛初, 李思婷, 王志, 等. 鸡源复合益生菌对肉仔鸡免疫球蛋白及 Toll 样受体通路的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(2): 26-33.
HE Mengchu, LI Siting, WANG Zhi, et al. Effects of chicken-derived compound probiotics on immunoglobulin and Toll-like receptor pathway of broilers[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(2): 26-33.

鸡源复合益生菌对肉仔鸡免疫球蛋白及 Toll 样受体通路的影响

贺濛初^{1†}, 李思婷^{1†}, 王 志¹, 舒迎霜¹, 桂雪儿¹,
朱 杰², 李锦春¹, 吴金节¹

(1 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2 宣城市木子禽业专业合作社, 安徽 宣城 242000)

摘要:【目的】探究益生菌对肉仔鸡血清免疫球蛋白与肠道 Toll 样受体通路的影响。【方法】选择 90 只 1 日龄白羽肉杂鸡, 随机分为 3 组, 即对照组、益生菌低剂量组和益生菌高剂量组。其中对照组饲喂基础日粮, 益生菌低剂量组在每千克基础日粮中添加复合益生菌 10⁹ cfu, 益生菌高剂量组在每千克基础日粮中添加复合益生菌 2×10⁹ cfu。第 21 天, 每组随机选取 10 只鸡放血致死, 并立即采集样本, 进行 ELISA、免疫组化、qPCR 及 Western blot 检测。【结果】在第 21 天, 益生菌低剂量组和益生菌高剂量组鸡的料肉比分别比对照组降低 9% 和 12% ($P<0.05$), 血清 IgG 含量分别升高 28% 和 40% ($P<0.01$), 血清 IgM 含量分别升高 44% 和 58% ($P<0.01$)。益生菌低剂量组 TLR4 蛋白表达和 mRNA 相对表达量比对照组分别升高 33% 和 28%, AP-1 蛋白表达和 mRNA 相对表达量分别比对照组升高 106% 和 67% ($P<0.01$); 益生菌高剂量组 TLR4 蛋白表达及 mRNA 相对表达量比对照组分别升高 106% 和 69%, AP-1 蛋白表达及 mRNA 相对表达量比对照组分别升高 163% 和 98% ($P<0.01$)。【结论】饲喂益生菌可降低肉仔鸡料肉比, 提高血清中 IgG、IgM 的含量, 并且通过调节 Toll 样受体通路蛋白表达可以提高机体免疫力。

关键词: 白羽肉杂鸡; 益生菌; 免疫球蛋白; 肠道; Toll 样受体通路
中图分类号: S831.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)02-0026-08

Effects of chicken-derived compound probiotics on immunoglobulin and Toll-like receptor pathway of broilers

HE Mengchu^{1†}, LI Siting^{1†}, WANG Zhi¹, SHU Yingshuang¹, GUI Xueer¹,
ZHU Jie², LI Jinchun¹, WU Jinjie¹

(1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
2 Xuancheng Muzi Poultry Cooperative Society, Xuancheng 242000, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of probiotics on serum immunoglobulin and intestinal Toll-like receptor pathway in broilers. 【Method】Ninety one-day-old white feather chicks were randomly divided into three groups including control group, low-dose probiotic group and high-dose probiotic group. The chicks in control group were fed basal diet, 10⁹ cfu probiotics per kg basal diet were added in the low-dose probiotic

group, and 2×10^9 cfu probiotics per kg basal diet were added in the high-dose probiotic group. On the 21st day, ten chicks in each group were sacrificed by bloodletting, and the samples were collected immediately for ELISA, immunohistochemistry, qPCR and Western blot. 【Result】 Compared with the control group on the 21st day, the feed conversion ratios of low- and high-dose probiotic groups decreased by 9% and 12% ($P<0.05$), the IgG levels in serum increased by 28% and 40% ($P<0.01$), and the IgM levels in serum increased by 44% and 58% ($P<0.01$) respectively. The protein and mRNA expression of TLR4 increased by 33% and 28% respectively in low-dose probiotic group ($P<0.01$), and the protein and mRNA expression of AP-1 increased by 106% and 67% respectively in low-dose probiotic group ($P<0.01$). The protein and mRNA expression of TLR4 increased by 106% and 69% respectively in high-dose probiotic group ($P<0.01$), and the protein and mRNA expression of AP-1 increased by 163% and 98% respectively in high-dose probiotic group ($P<0.01$). 【Conclusion】 Feeding probiotics can reduce the feed conversion ratio in broilers, increase the levels of IgG and IgM in serum, and enhance the immunity by regulating the expression of Toll-like receptor pathway proteins.

Key words: white feather broiler; probiotics; immunoglobulin; intestine; Toll-like receptor pathway

肠道疾病为雏鸡的常见多发病^[1],目前预防雏鸡肠道感染的主要措施是在饲料饮水中添加抗生素。随着我国对畜禽饲料饮水中添加促生长类抗生素的限制,“减抗”、“替抗”产品的研发迫在眉睫。益生菌作为最常用的微生态制剂,具有无毒、无耐药性、无残留、提高机体免疫力、预防鸡消化道疾病等特点^[2],单一的益生菌如乳酸杆菌 *Lactobacillus*、芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 对鸡腹泻有较好的预防作用,而复合益生菌能更好地防治肠道感染^[3]。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是一类 I 型跨膜糖蛋白模式识别受体,TLR 在家禽各个器官中都参与抗病原菌感染作用,其中 TLR2 和 TLR4 分别起到识别革兰阳性菌的肽聚糖和革兰阴性菌的脂多糖的作用^[4],并通过影响下游的 Myd88 依赖通路^[5],改变 TRAF-6 和 AP-1 蛋白的表达,影响血清中免疫球蛋白的含量^[6]。而血清中的 IgG、IgM 作为非特异性免疫的重要一环,对于识别和清除体内外来抗原具有重要作用^[7],血清中 IgG、IgM 水平的适度上升代表着机体对病原抵抗力的上升^[8]。

本试验在 1 日龄雏鸡饲料中添加乳酸菌与芽孢杆菌,观察添加益生菌对雏鸡血清中免疫球蛋白和肠道组织中 TLR2、TLR4、Myd88、TRAF-6、AP-1 等 Toll 样受体通路蛋白表达的影响,探究饲料中添加益生菌对鸡肠道 Toll 样受体通路及其下游免疫因子的调控作用,研究益生菌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: MRS 肉汤及琼脂培养基、LB 肉汤及琼脂培养基购自杭州百思生物科技有限公司,生

理盐水、磷酸、氢氧化钠、多聚甲醛、无水乙醇、异丙醇购自无锡展望化工有限公司,DEPC 水购自 MDL 公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自南京擎科生物公司,ELISA 试剂盒购自上海源叶生物有限公司,UltraPure Agarose、SuperScript III RT 反转录 kit 和 Sybrqpcr mix 购自 ABI-invitrogen 公司。

仪器: MIC-4 qPCR 仪购自 BMS 公司,微量移液器购自 Eppendorf 公司,TGL-18R 台式高速离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司,超净工作台购自苏州智净净化设备有限公司,电泳仪、凝胶成像仪购自 Biorad 公司。

1.2 试验动物及分组

分离益生菌和试验用鸡均由安徽宣城市木子禽业专业合作社提供。试验用鸡为 1 日龄白羽肉杂鸡。90 只雏鸡随机分为 3 组,分别为对照组、益生菌低剂量组和益生菌高剂量组,每组 3 个重复,每个重复 10 只鸡。其中,对照组饲喂基础日粮(表 1),低剂量组在每千克基础日粮中添加复合益生菌 10^9 cfu,高剂量组在每千克基础日粮中添加复合益生菌 2×10^9 cfu。

1.3 益生菌分离鉴定

分别选取 7、14、28 日龄健康鸡,剖检后无菌采集十二指肠和空肠内容物。

乳酸菌分离:将 1 g 新鲜肠道内容物用生理盐水进行 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度稀释,并分别滴加到含 0.75%(w)CaCO₃ 的 MRS 固体选择培养基上,涂布均匀。把培养基小心装入厌氧罐,放入 37 ℃ 的恒温箱中连续培养 24 h。观察待检菌落的形成、发育和溶钙环的大小。挑取有明显溶钙环的单个菌,在

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)

基础日粮 Basic diet	w/%	营养组分 Nutrient component	w/%
玉米 Corn	55.71	粗蛋白质 Crude protein	21.00
豆粕 Soybean meal	32.57	钙 Ca	1.00
玉米蛋白粉 Corn protein meal	5.00	有效磷 Available P	0.41
大豆油 Soybean oil	2.50	赖氨酸 Lys	1.25
石粉 Limestone	1.34	蛋氨酸 Met	0.55
预混料 ¹⁾ Premix	2.88	蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.90
代谢能 ²⁾ /(MJ·kg ⁻¹) Metabolic energy	12.34	苏氨酸 Thr	0.88

1)预混料为每千克饲料提供: 维生素A 10 000 IU, 维生素D₃ 2 500 IU, 维生素E 25 mg, 维生素K₃ 5 mg, 维生素B₁ 2.5 mg, 维生素B₂ 7.5 mg, 维生素B₆ 5 mg, 维生素B₁₂ 0.025 mg, 烟酸50 mg, D-泛酸15 mg, 叶酸1.5 mg, 生物素0.137 5 mg, Cu²⁺ 6.4 mg, Fe²⁺ 90 mg, Mn²⁺ 106 mg, Zn²⁺ 70 mg, I⁺ 0.80 mg, Se²⁺ 0.30 mg; 2)代谢能为计算值, 其余为实测值

1)The premix provided the following per kg of diets: Vitamin A 10 000 IU, vitamin D₃ 2 500 IU, vitamin E 25 mg, vitamin K₃ 5 mg, vitamin B₁ 2.5 mg, vitamin B₂ 7.5 mg, vitamin B₆ 5 mg, vitamin B₁₂ 0.025 mg, nicotinic acid 50 mg, D-pantothenic acid 15 mg, folic acid 1.5 mg, biotin 0.137 5 mg, Cu²⁺ 6.4 mg, Fe²⁺ 90 mg, Mn²⁺ 106 mg, Zn²⁺ 70 mg, I⁺ 0.80 mg, Se²⁺ 0.30 mg; 2) Metabolic energy is a calculated value and others are measured values

MRS 选择培养基上进行厌氧培养。在 37 ℃ 恒温箱中培养 24 h, 观察细菌生长情况。再次接种培养, 直到形成形态均一、分布均匀的单一菌落为止^[9]。

芽孢杆菌分离^[10]: 将 1 g 新鲜肠道内容物用生理盐水进行 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 梯度稀释, 并分别取 100 μL 涂布于普通营养琼脂培养基, 37 ℃ 恒温条件下培养 24 h。镜检培养基上的单个菌落。挑取芽孢杆菌单菌落在普通营养琼脂平板上画线培养, 每个单菌落平板画线重复 2~3 次, 得到纯的芽孢杆菌。将芽孢杆菌接种于营养琼脂斜面, 保存备用。分离的菌株纯化扩增后, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书上的方法, 提取细菌的基因组 DNA, 并送往南京擎科生物公司测序鉴定菌株。

1.4 免疫球蛋白 ELISA 检测

分别选取 7、14、21 日龄鸡, 翅静脉采血, 分离血清, -20 ℃ 保存。按照 ELISA 试剂盒详细步骤要求, 检测血清 IgG、IgM 含量。

1.5 免疫组织化学 (IHC) 法检测肠道通路蛋白

每组随机选取 10 只 21 日龄鸡放血致死, 采取十二指肠, 保存于体积分数为 20% 的多聚甲醛溶液中, 制成蜡块并切片。采用 IHC 方法, 应用标准的三步法进行检测。设置阴性对照, 一抗分别为 TLR2、TLR4、Myd88、TRAF-6、AP-1 的特异性单克隆抗体, 二抗为生物素标记山羊抗鼠 IgG 抗体。染色后在 200 倍光学显微镜下进行观察并拍照, 同一视野重复 3 次, 并将所拍图像在 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统上进行光密度值分析。

1.6 RT-qPCR 法检测十二指肠 Toll 样受体通路蛋白的 mRNA 相对表达量

Trizol 法提取鸡十二指肠组织中的 RNA, 使用分光光度计检测 RNA 纯度, 之后反转录为 cDNA 进行 qPCR 检测, qPCR 反应体系为 20 μL: 模板 2 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, qPCR MIX 10 μL, dd H₂O 7 μL。qPCR 反应引物 (表 2) 由南京擎科公司合成^[11]。

1.7 Western blot 法检测 Toll 样受体通路蛋白表达量

将各组鸡十二指肠在冰上研磨, 加入混有蛋白酶抑制剂以及蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 漩涡振荡器混合均匀, 置于冰上 20 min 使细胞充分裂解。13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行操作, 并根据标准曲线算出蛋白浓度。将提取的蛋白质样品煮沸 5 min, 在 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 然后转移至 PVDF 膜。用牛血清白蛋白 (Bull serum albumin, BSA) 在室温下封闭膜 4 h 后, 放入一抗, 在 4 ℃ 条件下孵育过夜。将膜洗涤 3 次, 并用二抗在室温下水平振荡孵育 45 min, 洗膜后放入凝胶成像系统 (BIO-RAD) 中成像。

1.8 数据处理

试验数据均以“平均值±标准差”表示, 利用统计软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析, 并用 Duncan’s 法对数据进行多重比较, 运用数据软件 GraphPad Prism7.0 进行柱状图的绘制。Western

表 2 qPCR 引物参数
Table 2 qPCR primer parameters

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence	$\theta_{\text{熔断}}/^{\circ}\text{C}$ Fusing-off temperature	产物大小/bp Product size
TLR2	Forward	AACATTCTGAAAATAACGGCAT	55.9	72
	Reverse	AAACTCCTGCATCTGTACCTGA	57.1	
TLR4	Forward	CATTCAAGGCAATTCCTACAGC	57.0	138
	Reverse	TTGAGAAACACAATGCCCTC	56.2	
Myd88	Forward	TGCCTTCATCTGCTACTGTCA	56.4	79
	Reverse	TTTGAAGTCCGTTTGCTCC	56.0	
TRAF-6	Forward	CTCAAACGTACTATCCGAGA	53.6	70
	Reverse	AAATACCATTACATTGTTGTGC	53.6	
AP-1	Forward	CCGCAGCATCACATAAACCC	59.3	145
	Reverse	CTTIGATTCTCTCTGCGACT	58.3	

blot 结果采用 AlphaEase FC 软件进行灰度值分析。

2 结果与分析

2.1 益生菌菌株与性质

经测序鉴定, 所分离出的菌株是动物乳酸杆菌 BNCC134981 和蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* VP11。将 2 种细菌分别在发酵罐中培养至 10^8 cfu / mL, 然后冻干成干粉。干粉中的活细菌量为 10^{12} cfu / g, 并且 2 种细菌以 1:1 的质量比混合, 直接添加到日粮中并搅拌均匀。

2.2 白羽肉杂鸡料肉比变化

由表 3 可知, 第 7 天时, 益生菌高剂量组鸡平

均体质量和平均日采食量分别比对照组高 12% 和 10%($P<0.05$), 分别比益生菌低剂量组高 11% 和 10%($P<0.05$)。各组间料肉比差异不显著。第 14 天时, 益生菌低剂量组和高剂量组平均体质量分别比对照组高 8% 和 11%($P<0.05$), 各组间平均日采食量差异不显著; 益生菌低剂量组和高剂量组料肉比分别比对照组低 6% 和 8%($P<0.05$)。第 21 天时, 益生菌低剂量组和高剂量组鸡平均体质量分别比对照组高 8% 和 12%($P<0.01$), 益生菌高剂量组平均体质量比益生菌低剂量组高 4%($P<0.05$), 各组间平均日采食量差异不显著; 益生菌低剂量组与高剂量组料肉比分别比对照组低 9% 和 12%($P<0.01$)。

表 3 益生菌对鸡生长性能的影响¹⁾
Table 3 Effect of probiotics on growth performance of chicks

组别 Group	7 d			14 d			21 d		
	体 质量/g Weight	日采 食量/g Daily feed intake	料肉比 Feed conversion ratio	体 质量/g Weight	日采 食量/g Daily feed intake	料肉比 Feed conversion ratio	体 质量/g Weight	日采 食量/g Daily feed intake	料肉比 Feed conversion ratio
对照组 Control group	103±18.2Aa	165.8±15.4Aa	1.61±0.28a	264±14.2Aa	427.7±19.6a	1.62±0.29Ab	426±38.7Aa	728.5±28.6a	1.71±0.46Bb
益生菌低剂量组 Low-dose probiotic group	104±14.3Aa	165.4±13.2Aa	1.59±0.14a	285±16.9Ab	437.8±21.5a	1.52±0.45Aa	458±29.7Bb	709.9±38.9a	1.55±0.68Aa
益生菌高剂量组 High-dose probiotic group	115±23.6Ab	181.7±29.2Ab	1.58±0.23a	292±23.3Ab	435.0±32.5a	1.49±0.51Aa	475±31.7Bc	712.5±26.5a	1.50±0.54Aa

1) 表中数据为平均值±标准差; 同列数据后的不同小、大写字母分别表示差异达到0.05和0.01的显著水平(Duncan's法)
1) Data in the table are means ± standard deviations; Different lowercase and capital letters in the same column indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Duncan's method)

2.3 鸡血清免疫球蛋白 IgG 与 IgM 含量的变化

由表 4 可知,第 7 天时,各组间 IgG、IgM 含量差异不显著。第 14 天时,益生菌低剂量组血清 IgG、IgM 含量分别比对照组高 21%($P>0.05$)和 23% ($P<0.05$),益生菌高剂量组血清 IgG、IgM 含量分别比对照组高 28% 和 44%($P<0.01$),益生菌高剂量组

血清 IgG、IgM 含量显著高于益生菌低剂量组 ($P<0.01$)。第 21 天时,益生菌低剂量组血清 IgG、IgM 含量分别比对照组高 28% 和 44%($P<0.01$),益生菌高剂量组血清 IgG、IgM 含量分别比对照组高 40% 和 58%($P<0.01$),益生菌低剂量组与高剂量组相比差异不显著。

表 4 益生菌对鸡血清 IgG 和 IgM 含量的影响¹⁾
Table 4 Effect of probiotics on IgG and IgM contents in chicken serum $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$

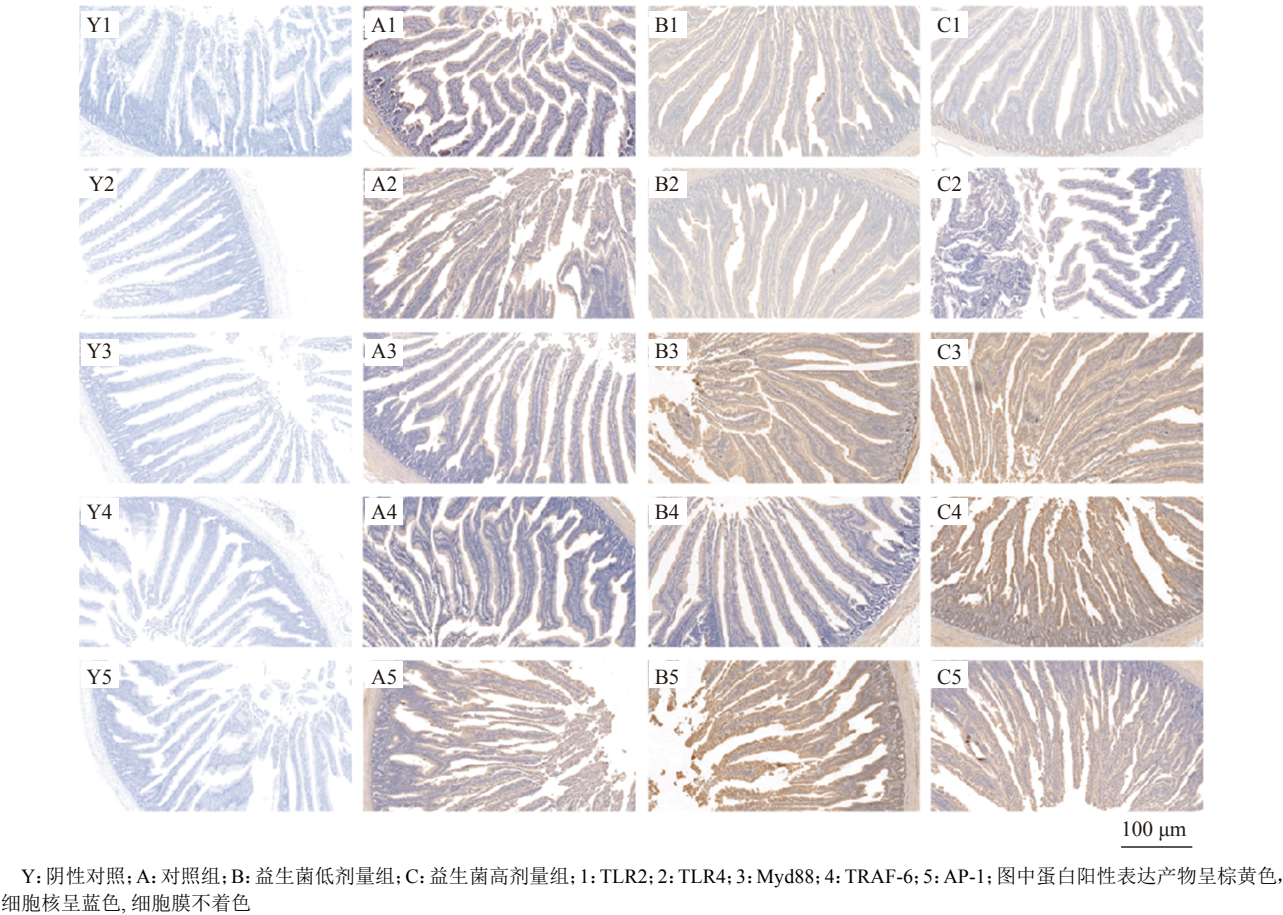
组别 Group	IgG			IgM		
	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
对照组 Control group	1 265±134a	1 312±87Aa	1 341±177Aa	812±89a	851±186Aa	869±150Aa
益生菌低剂量组 Low-dose probiotic group	1 323±67a	1 587±142Aa	1 723±73Bb	834±145a	1 043±179Ab	1 252±198Bb
益生菌高剂量组 High-dose probiotic group	1 277±213a	1 673±59Bb	1 880±214Bb	828±121a	1 226±96Bc	1 376±134Bb

1)同列数据后的不同小、大写字母分别表示差异达到0.05和0.01的显著水平(Duncan’s法)
1)Different lowercase and capital letters in the same column indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Duncan’s method)

2.4 肠道通路蛋白分布

IHC 检测结果见图 1。由图 1 可见,TLR2、TLR4、

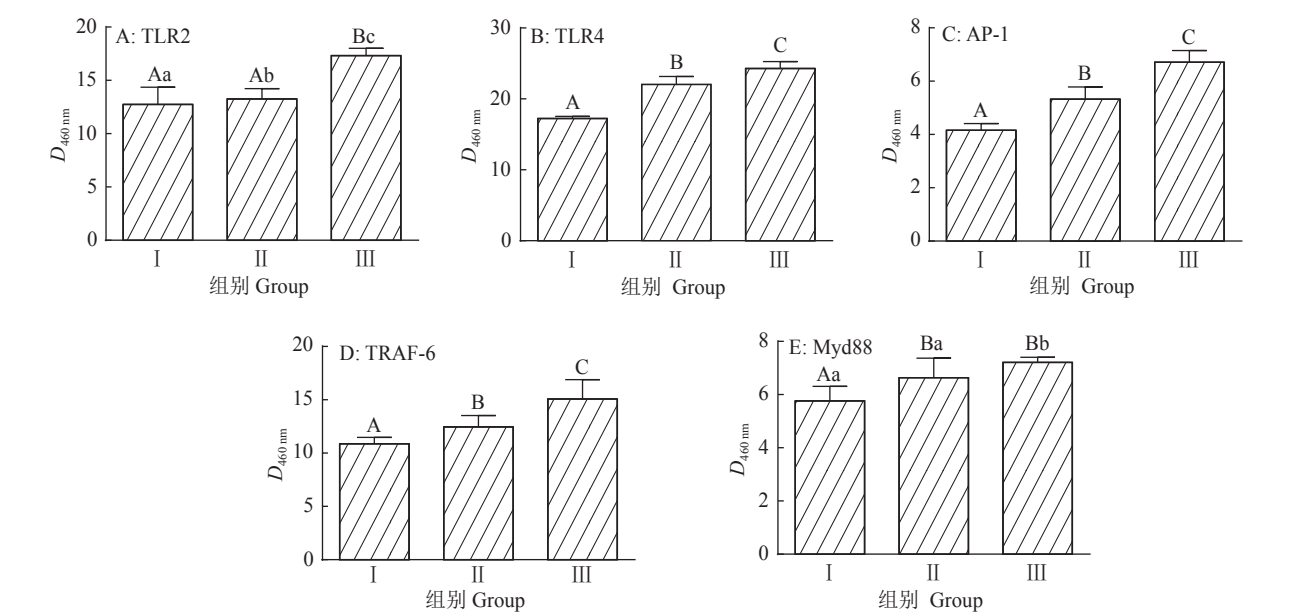
Myd88、AP-1、TRAF-6 蛋白皆在十二指肠中表达,其主要表达区域为肠绒毛外侧与肠壁细胞中。



Y: 阴性对照; A: 对照组; B: 益生菌低剂量组; C: 益生菌高剂量组; 1: TLR2; 2: TLR4; 3: Myd88; 4: TRAF-6; 5: AP-1; 图中蛋白阳性表达产物呈棕黄色,细胞核呈蓝色,细胞膜不着色
Y: Negative control; A: Control group; B: Low-dose probiotic group; C: High-dose probiotic group; 1: TLR2; 2: TLR4; 3: Myd88; 4: TRAF-6; 5: AP-1; In the figure protein positive expression products were stained brown-yellow, the nuclei were stained blue, and the cell membranes were not stained

图 1 鸡十二指肠 Toll 样受体通路蛋白的免疫组化图
Fig. 1 Immunohistochemical photographs of Toll-like receptor pathway proteins in duodenum of chicks

由图 2 可知, 益生菌低剂量组十二指肠 TLR4、AP-1 蛋白光密度均比对照组高 28%($P<0.01$)。益生菌高剂量组十二指肠 TLR2、TLR4、AP-1 和 TRAF-6 蛋白光密度分别比对照组高 36%、41%、61% 和 39%($P<0.01$)。益生菌高剂量组十二指肠 5 种蛋白的光密度均显著高于益生菌低剂量组 ($P<0.05$)。



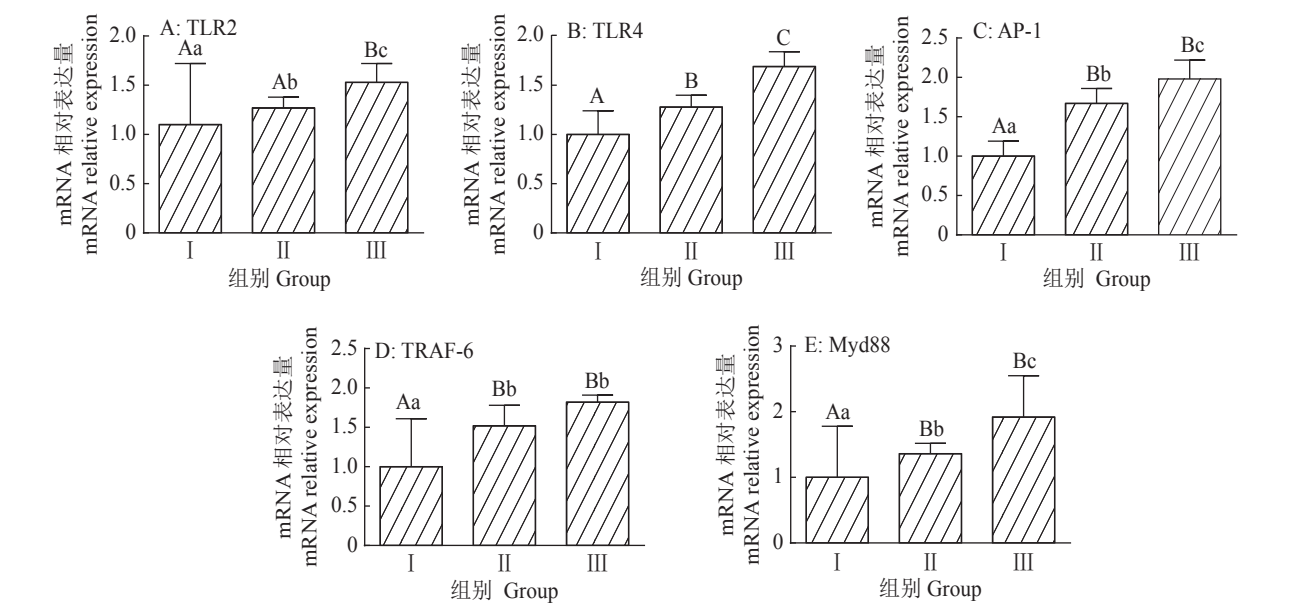
I : 对照组, II : 益生菌低剂量组, III: 益生菌高剂量组; 各图中, 柱子上方的不同小、大写字母分别表示差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (Duncan's 法)
I : Control group, II : Low-dose probiotic group, III: High-dose probiotic group; In each figure, different lowercase and capital letters on bars indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Duncan's method)

图 2 益生菌对 Toll 样受体通路蛋白光密度的影响

Fig. 2 Effect of probiotics on optical density of Toll-like receptor pathway protein

2.5 肠组织通路蛋白 mRNA 相对表达量

如图 3 所示, 与对照组相比, 益生菌低剂 量组十二指肠 TLR4、AP-1 的 mRNA 相对表 达量升高 28% 和 67%($P<0.01$), 益生菌高剂量组十



I : 对照组, II : 益生菌低剂量组, III: 益生菌高剂量组; 各图中, 柱子上方的不同小、大写字母分别表示差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (Duncan's 法)
I : Control group, II : Low-dose probiotic group, III: High-dose probiotic group; In each figure, different lowercase and capital letters on bars indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Duncan's method)

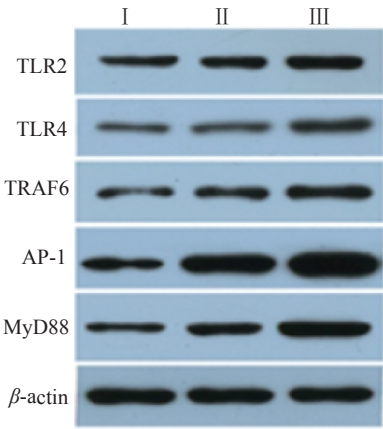
图 3 益生菌对 Toll 样受体通路蛋白 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 3 Effect of probiotics on the mRNA relative expression of Toll-like receptor pathway protein

二指肠 TLR4、AP-1 的 mRNA 相对表达量升高 69% 和 98%($P<0.01$)。益生菌高剂量组十二指肠 AP-1、TLR2、TLR4 的 mRNA 相对表达量显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 高于益生菌低剂量组。

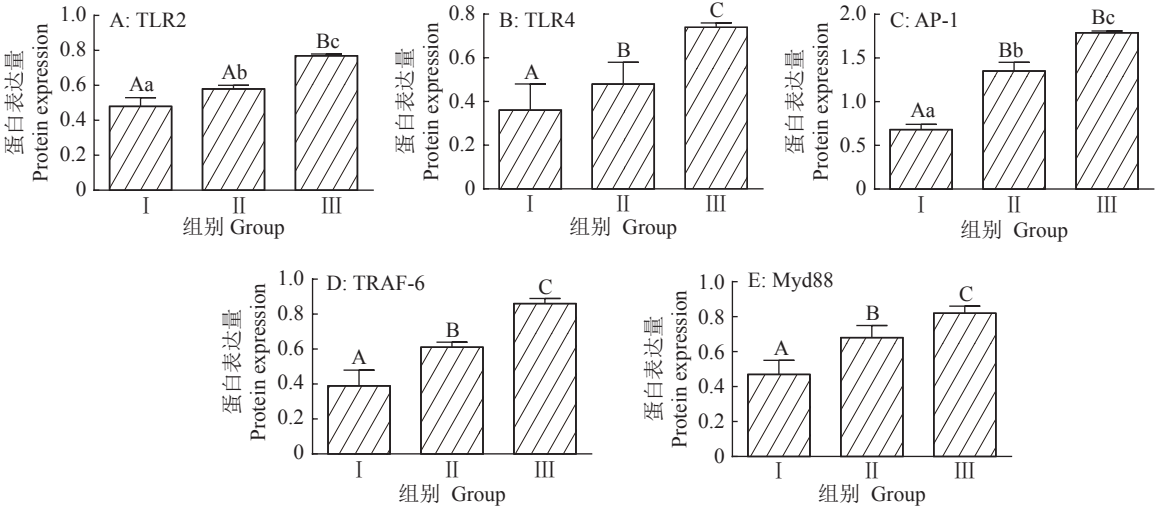
2.6 肠组织通路蛋白表达量

由图 4、5 可知, 与对照组相比, 益生菌低剂量组十二指肠 TLR2 蛋白表达量升高 21%($P<0.05$), TLR4、AP-1、TRAF-6 和 Myd88 蛋白表达量分别升高 33%、106%、56% 和 45%($P<0.01$), 益生菌高剂量组十二指肠 TLR2、TLR4、AP-1、TRAF-6 和 Myd88 蛋白表达量分别升高 60%、106%、163%、121% 和 72%($P<0.01$)。益生菌高剂量组十二指肠 5 种蛋白的表达量均显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 高于益生菌低剂量组。



I : 对照组, II : 益生菌低剂量组, III: 益生菌高剂量组
I : Control group, II : Low-dose probiotic group, III: High-dose probiotic group

图 4 Toll 样受体通路蛋白的电泳图
Fig. 4 Electrophoretic pattern of Toll-like receptor pathway protein



I : 对照组, II : 益生菌低剂量组, III: 益生菌高剂量组; 各图中, 柱子上的不同小、大写字母分别表示差异达到 0.05 和 0.01 的显著水平 (Duncan's 法)
I : Control group, II : Low-dose probiotic group, III: High-dose probiotic group; In each figure, different lowercase and capital letters on bars indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels respectively (Duncan's method)

图 5 益生菌对 Toll 样受体通路蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of probiotics on the expression level of Toll-like receptor pathway protein

3 讨论与结论

本试验结果表明, 在饲料中添加益生菌可降低肉鸡饲养的料肉比, 且益生菌高剂量组与益生菌低剂量组差异不显著。有研究显示, 在饲料中添加芽孢杆菌、乳酸菌、丁酸梭菌等益生菌可提高肉鸡生产性能, 包括增加日采食量、减少料肉比、提高体质量等^[12-13]。其主要作用为改善肠道健康, 以增强对饲料的吸收^[2, 12]。

王佳丽等^[3]通过体内试验证实, 在饲料中添加益生菌可显著提高肉鸡血清中免疫球蛋白含量。唐志刚等^[14]研究发现添加益生菌可提高肉鸡胸腺指数、法氏囊指数, 且血清 IgG、IgM、IgA 含量随之升

高, 以此增强肉鸡机体免疫能力。本试验在饲喂第 14 天时, 益生菌高剂量组血清免疫球蛋白含量显著高于益生菌低剂量组, 表明高剂量的益生菌在短期提高机体免疫力方面有更好的效果; 而饲喂第 21 天时, 益生菌高剂量组血清免疫球蛋白含量与益生菌低剂量组差异不显著, 表明大剂量的益生菌可以使雏鸡体内免疫球蛋白更快地达到正常雏鸡的峰值, 且不会突破峰值引起炎症反应。

Zhou 等^[15]研究表明, 饲喂黄芪多糖可调节 TLR4 受体通路, 并增加 Myd88 依赖的信号通路表达。Myd88 依赖通路通过调节下游蛋白 TRAF-6、AP-1 的表达来参与机体多项免疫反应^[16]。本试验中, 在饲料中添加益生菌后, 益生菌低剂量组与高

剂量组鸡肠道 TLR2、TLR4、Myd88、TRAF-6 和 AP-1 蛋白的表达量和 mRNA 相对表达量显著或极显著升高, 且随着益生菌剂量的增加, 通路蛋白及其基因的表达量也随之上升, 表明添加益生菌对雏鸡肠道 TLR2、TLR4 通路及相关蛋白有上调作用。本试验中, 血清中 IgG、IgM 含量随着添加益生菌剂量增加而升高, 且其变化趋势与 TLR2 表达相一致, 表明 TLR2 受体蛋白的表达与 IgG 等免疫球蛋白分泌正相关。在炎症模型中, 中药、益生菌等抗生素替代品主要作用为抑制炎症通路, 从而减少炎症因子分泌, 减轻炎症反应。刘瑞等^[17] 研究证明, 在雏鸡模型中, 因雏鸡免疫器官未发育完全, 体内免疫因子含量低于正常水平, 因此使用黄芪多糖等可促使免疫器官发育, 提高 Toll 样受体通路蛋白含量, 这与本研究结果一致。

大量研究报道, 饲料中添加益生菌可增加鸡的免疫力和生长性能^[18-19], 但是对于益生菌对 Toll 样受体信号表达的研究, 主要还停留在小鼠模型和细胞层面。本研究通过体内试验, 证实益生菌可改善肠道内 TLR2 和 TLR4 介导的 Toll 样受体通路蛋白表达, 增加血清中 IgG、IgM 的含量。但 Toll 样受体通路蛋白表达与血清中免疫球蛋白含量是否有直接关联作用, 需进一步研究。

综上, 饲料中添加益生菌能有效降低白羽肉杂鸡仔鸡料肉比, 提高血清中 IgG、IgM 含量, 通过正向调控仔鸡体内 TLR2 与 TLR4 通路表达及相关蛋白含量, 增强机体免疫力。

参考文献:

[1] HAGHIGHI H R, ABDUL-CAREEM M F, DARA R A, et al. Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and *Salmonella* infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126(1/2/3): 225-233.

[2] 雷燕. 益生菌对肉鸡生产性能、消化道生理及肠道微生物区系的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.

[3] 王佳丽, 张玉科. 复合益生菌对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 饲料研究, 2013(8): 65-67.

[4] WANG Z, DONG B, FENG Z, et al. A study on immunomodulatory mechanism of Polysaccharopeptide mediated by TLR4 signaling pathway[J]. *BMC Immunology*, 2015, 16: 34. doi: 10.1186/s12865-015-0100-5.

[5] YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(11): 1144-1150.

[6] VERSTAK B, STACK J, VE T, et al. The TLR signaling adaptor TRAM interacts with TRAF6 to mediate activation of the inflammatory response by TLR4[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2014, 96(3): 427-436.

[7] CHEN X M, YU G Q, FAN S R, et al. Sargassum fusiforme polysaccharide activates nuclear factor kappa-B (NF-κB) and induces cytokine production via Toll-like receptors[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 105: 113-120.

[8] ANTHONI C, LAUKOETTER M G, RIJCKEN E, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of boswellic acid derivatives in experimental colitis[J]. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006, 290(6): G1131-G1137.

[9] GUSILS C, CHAIA A P, GONZÁLEZ S, et al. Lactobacilli isolated from chicken intestines: Potential use as probiotics[J]. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(3): 252-256.

[10] 王焕, 郭晓军, 张伟, 等. 1 株鸡肠源益生芽孢杆菌的分离、鉴定及其耐受特性研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(33): 14426-14430.

[11] 彭成璐, 张瑜, 夏晓冬, 等. β-伴大豆球蛋白通过 p38/JNK MAPK 信号通路引起 IPEC-J2 细胞损伤[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(2): 242-249.

[12] WANG L, FANG M, HU Y, et al. Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(7): 612-619.

[13] HAŠČÍK P, KAČÁNIOVÁ M, NOVÁKOVÁ I, et al. Effect of probiotics on protein production in fattening chicken meat[J]. *Slovak Journal of Animal Science*, 2009, 54(10): 2552-2560.

[14] 唐志刚, 王俊峰, 温超, 等. 益生菌对肉鸡生产性能、免疫器官指数和血清指标的影响[J]. *江苏农业科学*, 2010, 38(4): 208-210.

[15] ZHOU L, LIU Z, WANG Z, et al. *Astragalus* polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway in vitro and in vivo[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44822. doi: 10.1038/srep44822.

[16] YAO P, TAN F, GAO H L, et al. Effects of probiotics on Toll-like receptor expression in ulcerative colitis rats induced by 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(4): 1973-1980.

[17] 刘瑞. 黄芪多糖影响雏鸡免疫器官 TLR4 信号转导通路的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.

[18] TIMMERMAN H M, VELDMAN A, VAN DEN ELSEN E, et al. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics[J]. *Poultry Science*, 2006, 85(8): 1383-1388.

[19] KITAZAWA H, TOHNO M, SHIMOSATO T, et al. Development of molecular immunoassay system for probiotics via Toll-like receptors based on food immunology[J]. *Animal Science Journal*, 2007, 79(1): 11-21.