

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第47卷 第4期(总第224期)

2022年8月18日出版

中国标准连续出版物号 $\frac{\text{ISSN } 1005-8567}{\text{CN } 44-1243/S}$

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院动物卫生研究所

广东省畜牧兽医学会

编辑委员会

编委主任:廖明

编委副主任:罗成龙 孙铭飞 卢受昇

编委(排名按姓氏笔画):

马现永 王刚 王丽 王贵平

王修启 元文宝 巨向红 邓百川

石达友 卢受昇 卢桂强 田允波

宁章勇 吕殿红 任涛 向华

向荣 江青艳 孙永学 孙铭飞

李加琪 杨琳 吴珍芳 吴银宝

张永亮 张建峰 张细权 张哲

张桂红 陈卫东 陈金顶 陈瑞爱

陈瑶生 林德锐 林鑫 罗成龙

郑春田 赵志辉 聂庆华 徐志宏

郭世宁 唐兆新 黄运茂 黄显会

黄淑坚 黄燕华 曹永长 曹伟胜

曹俊明 彭国良 蒋守群 蒋宗勇

舒鼎铭 曾振灵 简纪常 蔡更元

管武太 廖明 廖新倮 翟少伦

魏文康 翟浩

编辑部

主编:廖明

副主编:王刚 郑春田

主任:马新燕

编辑:康桦华 吕晓慧 张洁华 邢亚琪

王片片 张锦宁 郭婷婷

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大丰一街1号(510640)

电话:020-87576452

E-mail:gdmsyjkj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

国内定价:10.00元/册

广告发布登记通知书编号:440100190079

目次

·专家论坛·

规模猪场应激性致病风险及防控 巨向红(1)

·试验研究·

不同浓度亚硒酸钠对猪骨骼肌卫星细胞增殖和硒蛋白基因表达的影响.....

..... 何逸懿,申露露,等(9)

云南安宁猪链球菌的分离鉴定及耐药性研究..... 周玉照,张冲,等(15)

禽流感油乳剂灭活疫苗抗原质量快速评价方法 赖汉漳,王小芬,等(21)

·兽医临床·

高温高湿诱发猪传染性胸膜肺炎和链球菌混合感染的诊断 徐民生,柯海意,等(24)

犬口腔微生物研究进展 林琳,龚丽微,等(30)

·专题综述·

猪营养研究与饲料科技创新促进我国养猪业发展 茅沈丽,张赛(36)

重要黄酮类物质药理作用及在畜禽养殖应用的研究进展..... 吴琪,张晓琳,等(42)

胆汁酸受体介导胆汁酸调控肠道屏障功能的机制 杨亚慧,覃丽梅,等(47)

轮状病毒感染及其免疫逃逸与疫苗研究进展 许汪,王贵平,等(55)

发酵木薯渣在畜禽生产中的应用研究进展 马旭东,左清清,等(59)

沙门氏菌的检测与分离鉴定技术研究进展 温珍玉,张红霞,等(66)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

August 2022 Volume 47, Number 4 (Total No.224)

Contents

- The risk, prevention, and control of stress related diseases in large-scale swine farms Ju Xianghong(1)
- Effect of different concentrations of sodium selenite on proliferation and selenoprotein gene expression in porcine skeletal muscle satellite cells HE Yiyi, SHEN Lulu, et al(9)
- Study of isolation, identification and drug resistance of *Streptococcus suis* in Anning, Yunnan
..... ZHOU Yuzhao, ZHANG Chong, et al(15)
- Rapid Evaluation Method for the Antigen Quality of Avian Influenza Oil Emulsion Inactivated Vaccine
..... LAI Hanzhang, WANG Xiaofen, et al(21)
- Diagnosis of Mixed Infection of Porcine Infectious Pleural Pneumonia and *Streptococcus* Induced by High Temperature and Humidity XU Minsheng, KE Haiyi, et al(24)
- Research Progress on the Oral Microbiota of Dogs LIN Lin, GONG Liwei, et al(30)
- Swine nutrition research and feed technology innovation boost development of Chinese swine industry
..... Mao Shenli, Zhang Sai(36)
- Research progress on pharmacological effects of major flavonoids compounds and their application in livestock and poultry industry
..... WU Qi, ZHANG Xiaolin, et al(42)
- The mechanism of bile acid receptors mediate the bile acid regulation of intestinal barrier function
..... YANG Yahui, QIN Limei, et al(47)
- Research progress of rotavirus infection, immune escape and relevant vaccine development
..... XU Wang, WANG Guiping, et al(55)
- Research progress in the application of fermented cassava residue in livestock and poultry production
..... MA Xudong, ZUO Qingqing, et al(59)
- Research Progress in Detection, Isolation and Identification of *Salmonella* WEN Zhenyu, ZHANG Hongxia, et al(66)

Sponsored by: Guangdong Association of Animal Husbandry
and Veterinary Medicine, Institute of Animal
Health, Guangdong Academy of Agricultural
Sciences.

Published by: Editor Office Guangdong Journal of Animal
and Veterinary Science.

Chief Editor: Liao Ming

Editor Add: No. 1 Dafeng one Street, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊一次性支付作者著作
权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

目前本刊已加入的数据库有:中国学术期刊(光盘版)、中文科技期刊数据库、万方数据——数字化期刊群。

规模猪场应激性致病风险及防控

巨向红

(广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088)

摘要:随着我国养猪业的规模化程度越来越高,各种应激性致病因素的风险不断加大。应激不仅导致猪的采食量、日增重、肉品质及繁殖率等生产性能下降,还能引起机体粘膜屏障损伤、炎症反应和免疫抑制,使传染性疫病的暴发风险增高,严重影响了养殖效益和防疫效果。本文就规模猪场常见的断奶应激、热应激、免疫应激、运输应激和宰前应激等风险因素,从发生原因、危害、致病机制及防控对策进行综述,为应激性致病风险的控制和应激损伤的缓解提供依据。

关键词: 应激; 猪; 危害; 防控

中图分类号:S858.28 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)04-0001-08

The risk, prevention, and control of stress related diseases in large-scale swine farms

JU Xianghong

(Department of veterinary medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088)

Abstract: With the increasing of pig industry scale in China, the risk of various stress pathogenic factors is serious to host health. Stress not only leads to the decline of production performance, such as feed intake, daily weight gain, meat quality, and reproduction rate of pigs, but also causes the damage of intestinal mucosal barrier, inflammatory response, and immunosuppression of the host. Consequently, the risk of outbreak of infectious diseases is increased that seriously affects the breeding efficiency and epidemic prevention effect. This paper reviewed the common risk factors in scale pig farm, such as weaning stress, heat stress, immune stress, transportation stress, and pre-slaughter stress. We focused on the causes, hazards, pathogenesis and prevention and control techniques of various stress, so as to provide basis for the control of stress-induced disease.

Keywords: Stress; Pig; Detriment; Prevention and control

我国是世界上最大的生猪饲养和消费大国。后非瘟时代,散户数量锐减,以农业龙头企业为代表的规模化猪场数量急剧攀升,生物安全被高度重视,疫苗免疫规范化施行^[1]。尽管如此,疫病仍是威胁我国养猪业安全的最主要因素。目前,呈新病突发、常在常发、老病新发和多重混合感染的流行态势。为何在疫苗免疫和生物安全被高度重

视的条件下,疫病防控依然困难?笔者认为,各种应激因素引起的免疫抑制可能扮演重要角色。应激是指机体在受到外界及内部异常刺激时做出的一系列非特异性应答反应的总和^[2]。养殖密度、断奶、免疫接种、氨气、运动限制、温度、湿度、噪音、抓捕、运输及各类病原菌侵袭等均能引起动物的应激反应,导致生长性能和繁殖能力下降,代谢紊乱及

收稿日期:2022-05-17

基金项目:国家自然科学基金(31101862;31472243)

作者简介:巨向红(1977-),男,博士,教授,主要从事畜禽应激性致病机制及防控相关研究工作。E-mail:Juxh77@163.com

免疫抑制,进而危害猪体健康和增加传染性疫病风险^[3]。如何从源头降低应激风险及缓解应激损伤是猪场管理的重要课题。本文就规模猪场常见应激风险及防控技术进行讨论,希望引起猪场管理层和技术人员的高度重视,从而减少应激性致病因素对猪群的危害。

1 应激的发生原因

1.1 断奶应激

在自然环境中,仔猪的断奶是一个逐渐的过程,在10~12周完成。然而,在现代化的生产模式下,仔猪的断奶时间被缩短至14~30天内完成。断奶时,仔猪突然与母猪分离,并从吸吮母乳转变为颗粒饲料,加之饲养环境的改变、与其它仔猪的混合、运输及疫苗接种等,这些都会成为断奶仔猪的应激源^[4]。

1.2 免疫应激

免疫应激又称免疫激发。狭义的免疫应激指动物接种抗原后,机体产生免疫应答而引起的全身性非特异性适应反应。广义的免疫应激是指在卫生条件较差或亚健康状况下,机体频繁感染各种病原微生物,导致免疫系统不断被激活,产生针对病原微生物入侵的免疫反应,引起非特异性适应性反应^[5]。由于规模化高密度养殖环境及过分注重生产性能的遗传改良,使猪极易受到多种条件性致病菌的侵袭,而且要在较短的生产周期内频繁接种多种疫苗。尽管免疫接种可保护猪群免受病原侵害,但也成为一种特殊的应激因子而引起免疫应激^[3]。

1.3 湿热应激

湿热应激是指动物处于超过自身体温调节能力的高温环境时,机体对其作出的一系列非特异性应答反应^[6]。随着全球气候的持续升温、夏季极端高热天气的频发以及养殖业集约化养殖的发展,高温极易导致热带及亚热带地区的养殖场发生热应激。研究表明,环境湿度在75%、温度在25℃以上时,猪就进入了热应激的危险温区。即使在配备水帘降温系统的封闭猪舍,猪采食量、日增重和繁殖率在高温高湿季节(6~9月份)仍明显下降,说明仅依靠环境控制还不能完全解决南方养猪业面临的热应激问题。

1.4 运输应激

运输应激是指在动物运输过程中所面临的各种应激原综合刺激,从而引发动物免疫、内分泌、代谢和行为的改变。这些应激原包括运输过程中的禁食、限饲、驱赶、颠簸、冷热刺激、恐惧、拥挤和相互撕咬等^[7]。

1.5 宰前应激

宰前应激是指从养殖场到屠宰场,畜禽经受驱赶、运输、禁食、混群、击晕方式、环境变化、宰前休息以及运输等因素的影响,而造成的应激反应^[8]。

2 应激的主要危害

2.1 免疫功能

不同应激引起的危害各有侧重,但均能引起神经-内分泌-免疫系统的激活。神经-内分泌-免疫系统是生物体内一种复杂的调控网络,借助信号分子(化学递质、激素、细胞因子等)联系并调节各系统和器官的功能,使它们互相协调,达到整体功能的平衡。当机体处于应激状态时,应激原刺激可通过神经-内分泌-免疫系统之间双向的信息传递机制来影响机体内环境的平衡^[9-10]。首先,应激激活了交感神经-肾上腺-髓质(SAM)轴以及下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴,使机体产生快速应答,导致肾上腺髓质分泌儿茶酚胺(如去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺)和糖皮质激素增加(主要为皮质醇)。儿茶酚胺的释放能引起体内的细胞因子释放,导致免疫应答过度激活。而皮质醇可以通过靶向细胞因子、趋化因子、炎性因子及其受体相关的基因而抑制免疫系统。同时,其还能诱导T淋巴细胞、B淋巴细胞和树突状细胞的凋亡,抑制细胞增殖、分化和迁移,导致机体发生免疫抑制^[3]。因此,就免疫功能来说,短期急性应激能够在一定程度上增加机体的免疫功能,但长期慢性应激则引起免疫抑制的发生。

2.2 生长性能

无论是急性应激还是慢性应激,均会对猪的生长性能产生不利影响。一方面,应激影响动物的采食、消化和吸收功能。从机制来看,应激引起大脑内抑食神经元的激活,使采食量急剧下降^[11]。同时,结肠组织发生损伤,肠屏障完整性

破坏,降低或抑制了乳糖酶、蔗糖酶、脂肪酶、胰蛋白酶、葡萄糖协同转运蛋白、脂肪酸结合蛋白和兴奋性氨基酸转运蛋白等消的含量或活性^[12-13]。另一方面,应激引起体内营养再分配以对抗外部或内部的不利因素。如免疫应激时,机体释放的促炎细胞因子可通过血脑屏障直接作用于体温调节中枢,通过增加呼吸产热,减少机体散热,从而使体温上升,导致能量的大量消耗^[14-15]。免疫应激还使骨骼肌蛋白沉积减少,降解率增加。外周蛋白质分解速度也加快,肝脏急性期蛋白大量合成,并促进葡萄糖的异生作用和糖原水解,葡萄糖生成量快速增加^[16-17]。另外,骨骼肌和心肌等外周组织对葡萄糖的摄取量减少,这增加了血糖含量,促进葡萄糖转化为乳酸,以满足特异性的细胞生成和参与免疫反应的组织代谢,最终导致猪生产性能的下降^[5]。

2.3 繁殖性能

应激严重损害猪的繁殖性能,其发生机制涉及两个方面:一方面,应激导致猪的采食量下降,消化和吸收功能减弱,机体的能量摄入减少或营养不平衡,从而影响精子发生、卵巢发育和胎儿生长等;另一方面,是通过神经内分泌途径,引起促性腺激素释放激素、促性腺激素和性激素的分泌紊乱,影响动物的正常生殖生理进程。同时,应激可直接损伤生殖细胞的功能,如引起卵母细胞、颗粒细胞、精子和支持细胞的凋亡等^[18]。

具体而言,对能繁母猪,应激导致发情率下降、排卵数减少、乏情期增长、受孕率下降、流产率和死胎率增加、弱仔数增加和泌乳力下降等现象,严重影响母猪的繁殖性能^[19-20]。对公猪,应激则导致性欲低下、爬跨减少、精液密度下降、精子活力降低、死精率升高、精子畸形率升高和采精量降低,甚至不育等现象,严重影响了种公猪的遗传资源利用率^[21-22]。

2.4 肉质

肉质是与鲜肉或加工肉的外观、适口性和营养价值等有关的理化性质,其评定指标包括感官特征、物理学评价及化学评价,而肉品质的优劣直接影响产品的经济价值^[23]。应激不仅对动物的生长性能产生负面影响,同时还会影响肌肉代谢和脂肪沉积,扰乱能量在脂肪、碳水化合物及蛋白质

之间的平衡,导致肉品质的下降,增加PSE和DFD肉的产生风险^[24]。其中,宰前应激是影响肉品质的重要原因。其导致机体营养物质储备的消耗加快,分解代谢加强,从而增加了氧的需要量。同时,体温升高,机体转为厌氧代谢,糖原分解也以厌氧方式进行,乳酸等代谢产物含量增加,肌肉pH在宰后迅速下降^[25]。当动物屠宰后,血液循环及氧气供应停止,三磷酸腺苷急剧减少,在磷酸肌酸被耗尽后,肌肉只能靠无氧酵解分解自身的糖原和葡萄糖提供ATP。动物宰前肌肉内能量含量以及宰后的能量消耗速度和程度决定了肌肉的乳酸含量和极限pH,最终对肉质造成影响^[26-27]。屠宰后肌肉pH_{1h}小于6.0时,肉产品被认为是PSE肉,表现为苍白、质地松软和弹性减弱,表面渗出肉汁^[28]。当宰后pH_{24h}值高达6.5以上,肉产品被认为是DFD肉,表现为暗红、质地坚硬且表面干燥^[29]。

3 应激的防控措施

3.1 控制应激源

3.1.1 断奶应激

断奶应激的管理对猪场尤为重要。原因是此阶段是仔猪胃肠道发育、微生物定植及免疫系统发育的关键环节,管理是否到位不仅影响仔猪成活率,还直接影响后期的生长发育性能。缓解断奶应激,要鼓励仔猪快速采食,并给予充足和高质量的营养物质。如补饲L-谷氨酰胺、核苷酸、复合益生菌及电解多维等,均能获得理想的生长效果。从管理角度而言,应避开高温时段,转舍后限饲4小时以上,给予干爽垫料、清洁环境及注重保温等。

3.1.2 热应激

高温是猪群热应激的初始原因。因此,防暑降温是最直接有效的防治措施。常用的防控措施有:科学建造猪舍,减少太阳热辐射;植树绿化,改善猪场小气候;使用配备水帘降温系统的封闭猪舍,并加强通风换气;撒水降温;供给充足清洁饮水;调整饲喂时间,如选择早晚凉爽时多喂,中午少喂;降低饲养密度等^[18]。需要注意的是,在南方地区,夏季极端高温条件下,水帘降温系统的降温效果有限,需要大功率风扇直吹的方式给猪体降

温。

3.1.3 免疫应激

短时间内过度的疫苗接种是导致免疫应激发生的原因,因此合理安排疫苗接种是解决免疫应激的最直接方法。为了确定哪种疫苗是必要的,有必要考虑养殖背景、区域疫病特点、与其他养殖场的距离及生物安全水平^[30]。疫苗免疫程序的安排应该综合考虑多种因素,例如各种疫苗之间是否会有相互影响、母源抗体的干扰、疫苗的种类、疫苗接种的方式和疫苗接种频率等。其核心是在保证猪不受疫病侵害的前提下,避免不必要的疫苗接种,减少对猪免疫系统的过度激发^[31-32]。

联合免疫是一个值得考虑的方案。联合免疫是指同时注射两种或多种抗原以减轻动物应激^[33]。据报道,猪使用三价疫苗(猪肺炎支原体+猪圆环病毒2型+猪繁殖与呼吸综合征病毒)对三种病原体的感染均具有很好地保护作用,抗体水平与单价疫苗相似,生长性能优于未免疫的猪只^[34]。一般来说,在不干扰每种疫苗效果的情况下,联合免疫应该是猪场的首选方案。这能大大减少免疫接种次数,降低交叉感染风险,减少应激免疫发生,提高健康水平和生产效率。

3.1.4 宰前应激

合理的运输条件可缓解畜禽的运输应激,降低劣质肉的发生风险。为减少运输应激的发生,应当做到尽量减少运输时间,合理控制运输密度,避免混群,保证饮水,做好保温及降温措施^[35-37]。MPPérez等利用150头体重110~120 kg的二元杂猪进行试验,通过测定皮质醇、葡萄糖、乳酸盐、肌肉中酶活性、血液指标以及肉品质,发现禁食12 h后运输,屠宰前猪只在温暖条件下进行宰前休息3 h,能较好地避免肉品质的下降^[38]。因此,合理的运输条件可缓解猪宰前应激,降低劣质肉的发生机率。

屠宰前,合理的宰前禁食时间,适当的宰前休息时间,规范的驱赶方式,人道的致晕方式,避免混群,增加福利玩具,以及避免噪音等福利屠宰策略,有利于缓解宰前应激,从而降低影响肉品质的风险。

3.2 缓解应激损伤

通过营养调控缓解应激,是近年来国内外学

者所关注的方向。在应激状态下,动物会消耗大量营养以合成特定的效应分子来抗衡应激反应。大量的研究表明,氨基酸类、脂肪类、维生素类及植物提取物等都能缓解应激、增强机体抵抗力、提高生长性能、提高繁殖性能及提高肉品质。

3.2.1 氨基酸添加剂

应激不但影响机体氨基酸需要量,也会影响氨基酸平衡模式。Zhu等人发现,在日粮中添加L-精氨酸能够有效缓解免疫应激引起的肠粘膜免疫屏障功能受损和维持肠道完整性^[39-40]。王方园等人发现,日粮中添加一定量 γ -氨基丁酸可改善短途运输猪只的肉品质^[41]。Tan等人发现,L-精氨酸能够有抑制TLR4信号通路和CD14⁺细胞百分比,从而抑制促炎因子的表达并缓解应激损伤。另外,多种氨基酸及其衍生物被发现具有缓解应激的作用,可作为抗应激添加剂在饲料中应用。如谷氨酸、谷氨酸前体 α -酮戊二酸、L-茶氨酸、 γ -氨基丁酸、半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸、甘氨酸、甘氨酸谷氨酰胺、甘氨酸谷氨酰胺和天冬氨酸等^[42-57]。

3.2.2 维生素添加剂

维生素是动物生长和代谢所必须的微量有机物,具有抗应激、调节免疫和抗炎等作用。维生素C(VC)是养殖当中最常使用的维生素添加剂,被认为是抗应激因子。正常情况下,动物自身合成的VC能满足代谢需要。但在应激条件下,动物对VC的需要量增加,需要饲料添加才能满足需要。Zhang等人发现VC能有效调节免疫应激时的炎症反应和氧化应激,减少海马体凋亡,这与Eicher等人也在仔猪上的发现一致^[58-59]。VE是一种细胞内抗氧化剂,能刺激免疫器官,增强机体免疫力,提高机体抗应激的能力。有研究指出,饲料添加VE能缓解母猪热应激,并提高产仔数、活仔数及仔猪初生重。而添加抗应激复合维生素(VA、VC、VE),能获得更好的繁殖效率^[60]。

3.2.3 微量元素添加剂

微量元素被发现具有调节免疫机能和降低应激的作用。Song等人报道,酵母铬能有效降低仔猪血清中的IL-1 β 、TNF- α 和COR水平,从而缓解免疫应激^[61]。育肥猪屠宰前饲料添加有机镁不仅可降低血液中的皮质醇水平、缓解宰前应激反应和提高肉品质,还能提高运输应激后的肌肉色值,降

低PSE肉的发生率,并有降低剪切力的趋势。另外,许多其它微量元素被发现也具有缓解应激的作用,如锌、镁和硒等^[62-64]。

3.2.4 益生菌类添加剂

益生菌又名微生态制剂,是一类对宿主有益的活性微生物。益生菌的作用是通过增加肠道有益菌的定植和组成,调节肠道pH值,以及通过肠-脑轴来改善肠道健康及免疫功能^[65]。在热应激条件下,添加活酵母和益生菌可以显著增加母猪的采食量和饲料利用率,并改善妊娠母猪的分娩过程,增加活仔猪的数量,降低仔猪死亡率^[66-68]。Wang等人发现,含有枯草芽孢杆菌的饲料可通过调节免疫系统来改善应激诱导的行为和炎症反应^[69]。另外,多种益生菌或其发酵产物被认为具有缓解应激的功能,如解淀粉芽孢杆菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌、罗氏乳杆菌、粪肠球菌和丁酸梭菌等^[70-78]。

3.2.5 植物提取物添加剂

植物中存在种类丰富的低分子量次生代谢产物,大量的研究证明这些植物提取物具有多种生物学效应,包括调节机体免疫机能、抗菌、抗病毒、抗炎及抗肿瘤等多种功能,有较好的抗应激作用。同时,因其低毒、安全性高及作用效果明显等特点,现已成为饲料添加剂领域的研究热点^[79]。

有研究指出,黄芪多糖可通过抑制大鼠体内TLR4-NF- κ B信号通路的激活,从而抑制运输应激大鼠肝肺炎症^[80-81]。海藻多糖也被报道可以通过抑制肠道炎症反应进而缓解猪的免疫应激^[82]。除此之外,姜黄素、槲皮素、鞣花酸和黄连素等也被发现有较好的应激缓解作用^[83-87]。另外,本课题组筛选了对热应激和断奶应激有较好缓解作用的天然活性物质,发现黄芩苷、茶树油、壳寡糖和海洋真菌源丁内酯-I可通过平衡肠道菌群、抑制肠道炎症和保护粘膜屏障等作用而降低应激损伤,有很好的开发利用价值。

4 小结

应激严重影响猪的免疫功能、生长性能、繁殖性能和肉质,并增加了传染性疫病暴发风险。无论猪场的管理人员或技术人员,必需明确应激对猪生产性能和养殖效益的严重影响,从思想上

高度重视猪场的应激管理。从技术层面来看,既要通过多种措施减少应激的发生,还要通过营养调控缓解应激损伤,从而控制应激危害,提高养殖效益。

参考文献:

- [1] 师铭威. 规模化猪场限位饲养致妊娠母猪慢性应激调查及褪黑素疗效观察[D]. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [2] SELYE H. Stress and the general adaptation syndrome [J]. *British Medical Journal*, 1950, 1(4667): 1383-1392.
- [3] NIU X, DING Y, CHEN S, et al. Effect of Immune Stress on Growth Performance and Immune Functions of Livestock: Mechanisms and Prevention [J]. *Animals: an open access journal from MDPI*, 2022, 12(7): 909.
- [4] MOESER A J, POHL C S, RAJPUT M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs [J]. *Animal Nutrition*, 2017, 3(4): 313-321.
- [5] 张彩云. 白藜芦醇对雏鸡免疫应激的调控及其机制研究[D]. 博士学位论文. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- [6] WEST J W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow [J]. *Journal of animal science*, 1999, 77(suppl_2): 21-35.
- [7] 朱振. 应激对北京鸭血液指标、肉品质及组织hsps mRNA转录水平的影响[D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [8] 邹波. 宰前驱赶应激对猪肉品质的影响及控制[D]. 硕士学位论文. 南京农业大学, 2019.
- [9] 孙耀贵, 程佳, 李宏全, 等. 柴术抗激颗粒对LPS诱导大鼠神经-内分泌-免疫相关因子调节机制研究[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(23): 4718-4725.
- [10] GLASER R, KIECOLT-GLASER J K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(3): 243-251.
- [11] JEONG J H, LEE D K, LIU S M, et al. Activation of temperature-sensitive TRPV1-like receptors in ARC POMC neurons reduces food intake [J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(4): e2004399.
- [12] MCCracken B A, SPURLOCK M E, ROOS M A, et al. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine [J]. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129(3): 613-619.
- [13] AL-ZGHOUL M B, ALLIFTAWI A R S, SALEH K M M, et al. Expression of digestive enzyme and intestinal transporter genes during chronic heat stress in the thermally manipulated broiler chicken [J]. *Poultry Science*, 2019, 98(9): 4113-4122.
- [14] YAO M, GAO W, TAO H, et al. The regulation effects of danofloxacin on pig immune stress induced by LPS [J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 110: 65-71.

- [15] BOEVER S D, BEYAERT R, VANDEMAELE F, et al. The influence of age and repeated lipopolysaccharide administration on body temperature and the concentration of interleukin-6 and IgM antibodies against lipopolysaccharide in broiler chickens [J]. *Avian Pathology*, 2008, 37(1):39-44.
- [16] W J R. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view [J]. *Journal of animal science*, 1997, 75(5): 1244-1255.
- [17] AIJUAN Z, ANRONG Z, ZHIMIN C, et al. Molecular mechanisms of growth depression in broiler chickens (*Gallus Gallus domesticus*) mediated by immune stress: a hepatic proteome study [J]. *Journal of animal science and biotechnology*, 2021, 12(1):90.
- [18] CHEN S, YONG Y, JU X. Effect of heat stress on growth and production performance of livestock and poultry: Mechanism to prevention [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2021, 99: 103019.
- [19] ROSS J W, HALE B J, SEIBERT J T, et al. Physiological mechanisms through which heat stress compromises reproduction in pigs [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2017, 84(9): 934-945.
- [20] A I F M M, A E D, B A F, et al. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review - ScienceDirect [J]. *Small Ruminant Research*, 2007, 71(1-3): 1-12.
- [21] RAHMAN M B, SCHELLANDER K, LUCEÑO N L, et al. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility [J]. *Theriogenology*, 2018, 113: 102-112.
- [22] HOU Y, WANG X, LEI Z, et al. Heat-stress-induced metabolic changes and altered male reproductive function [J]. *Journal of proteome research*, 2015, 14(3): 1495-1503.
- [23] 梁静, 张文举, 王博. 影响羊肉品质因素的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(5): 1250-1254.
- [24] GONZALEZ-RIVAS P A, CHAUHAN S S, HA M, et al. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review [J]. *Meat Science*, 2020, 162: 108025.
- [25] DICKSON T B, KICHLINE P D. Functional management of stress fractures in female athletes using a pneumatic leg brace [J]. *American Journal of Sports Medicine*, 1987, 15(1): 86-89.
- [26] BEE G, BIOLLEY C, GUOX G, et al. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(1): 191-203.
- [27] HAMILTON D N, MILLER K D, ELLIS M, et al. Relationships between longissimus glycolytic potential and swine growth performance, carcass traits, and pork quality [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(9): 2206-2212.
- [28] 丁玉庭, 刘化章, 周晓云. 猪PSE肉与正常肉的肌原纤维形态学比较研究[J]. *中国食品学报*. 2005, (2): 39-44.
- [29] 柴进. 宰前应激对猪肉质的影响及其机制研究[D]. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [30] SHARMA J M. Introduction to poultry vaccines and immunity [J]. *Advances in Veterinary Medicine*, 1999, 41:481-494.
- [31] S M, L B. The use of vaccination in poultry production [J]. *Revue Scientifique et Technique*, 2007, 26(1):265-274.
- [32] SARJOON A C M, VICTOR P T, ARUNA A, et al. Hatchery Vaccination Against Poultry Viral Diseases: Potential Mechanisms and Limitations [J]. *Viral Immunol*, 2018, 31(1): 23-33.
- [33] YANG X M. A review of combined immunization: current research situation and its promising future [J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2020, 41(1): 120-126.
- [34] OH T, PARK K H, YANG S, et al. Evaluation of the efficacy of a trivalent vaccine mixture against a triple challenge with *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, and PRRSV and the efficacy comparison of the respective monovalent vaccines against a single challenge [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 342.
- [35] 齐彪, 刘志勇, 李颖, 等. 牛运输应激综合征防控技术[J]. *畜牧兽医学(电子版)*, 2021, 85(1): 126-127.
- [36] 杨林. 肉牛运输应激综合症及防治措施[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2020, 528(12): 112-3.
- [37] 安永福, 王晓芳, 孙凤莉, 等. 奶牛长途运输过程中的应激缓解措施[J]. *饲料研究*, 2018, (1): 13-16.
- [38] PÉREZ M P, PALACIO J, SANTOLARIA M P, et al. Influence of lairage time on some welfare and meat quality parameters in pigs [J]. *Veterinary research*, 2002, 33(3): 239-250.
- [39] ZHU HL, LIU YL, HUANG JJ, et al. Effect of L-arginine on intestinal mucosal immune barrier function in weaned pigs after *Escherichia coli* LPS challenge [J]. *Innate Immunity*, 2013, 19(3):242-252.
- [40] LIU Y, HUANG J, HOU Y, et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs [J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(3):552-560.
- [41] 王方园. 环境应激对猪肉品质的影响及改善策略[J]. *今日养猪业*, 2019, 111(3): 78-79.
- [42] QIN Q, XU X, WANG X, et al. Glutamate alleviates intestinal injury, maintains mTOR and suppresses TLR4 and NOD signaling pathways in weanling pigs challenged with lipopolysaccharide [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):15124.
- [43] YIHANG L, ZEHE S, A K K, et al. Chronic social stress in pigs impairs intestinal barrier and nutrient transporter function, and alters neuro-immune mediator and receptor expression [J]. *PLoS one*, 2017, 12(2):e0171617.
- [44] LEI W, YONGQING H, DAN Y, et al. Dietary supplementation with glutamate precursor α -ketoglutarate attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in young pigs [J]. *Amino acids*, 2015, 47(7):1309-1318.
- [45] LEI W, DAN Y, YONGQING H, et al. Dietary Supplementation

- with α -Ketoglutarate Activates mTOR Signaling and Enhances Energy Status in Skeletal Muscle of Lipopolysaccharide - Challenged Piglets [J]. *The Journal of nutrition*, 2016, 146(8): 1514-1420.
- [46] ZHOU P, FAN H, LAN T, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin [J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 255-258.
- [47] 钟光. 精氨酸、 γ -氨基丁酸、有机铬和硒对热应激黄羽肉鸡的作用研究[D]. 硕士学位论文. 泰安:山东农业大学, 2019.
- [48] TAKAHASHI K, OHTA N, AKIBA Y. Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection, and mitogenic response in broiler chickens [J]. *British Journal of Nutrition*, 1997, 78(5):815-821.
- [49] YI D, HOU Y, XIAO H, et al. N - Acetylcysteine improves intestinal function in lipopolysaccharides - challenged piglets through multiple signaling pathways [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(12): 1915-1929.
- [50] HOU Y, WANG L, ZHANG W, et al. Protective effects of N - acetylcysteine on intestinal functions of piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1233 - 1242.
- [51] DAN Y, YONGQING H, LEI W, et al. Dietary N-acetylcysteine supplementation alleviates liver injury in lipopolysaccharide - challenged piglets [J]. *The British journal of nutrition*, 2014, 111(1):46-54.
- [52] TAKAHASHI K, AOKI A, TAKIMOTO T, et al. Dietary supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens [J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(5):1019-1028.
- [53] 王振鑫. 基于肠-脑轴初步探讨二甲基甘氨酸缓解热应激下肉鸡肠道屏障损伤的机制研究[D]. 硕士学位论文. 泰安:山东农业大学, 2021.
- [54] JIANG Z Y, SUN L H, LIN Y C, et al. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(12): 4050-4056.
- [55] B H C, W L J, J H H, et al. Effects of supplemental glutamine on growth performance, plasma parameters and LPS - induced immune response of weaned barrows after castration [J]. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 2012, 25(5):674-681.
- [56] DINGAN P, YULAN L, HAIFENG S, et al. Dietary supplementation of aspartate enhances intestinal integrity and energy status in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge [J]. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2014, 25(4):456-462.
- [57] XIUYING W, YULAN L, SHUANG L, et al. Asparagine attenuates intestinal injury, improves energy status and inhibits AMP - activated protein kinase signalling pathways in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide [J]. *The British journal of nutrition*, 2015, 114(4):553-565.
- [58] ZHANG X Y, XU Z P, WANG W, et al. Vitamin C alleviates LPS - induced cognitive impairment in mice by suppressing neuroinflammation and oxidative stress [J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 65:438-447.
- [59] EICHER S D, MCKEE C A, DAJOR E A, et al. Supplemental vitamin C and yeast cell wall beta-glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(9):2352-2360.
- [60] 蔡华林, 李同洲, 曹洪战, 等. 抗热应激处理对妊娠母猪繁殖性能的影响研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015, (1): 91-92.
- [61] SONG C, JIANG J, HAN X, et al. Effect of immunological stress to neuroendocrine and gene expression in different swine breeds [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(6): 3569 - 3576.
- [62] 李文祥. 不同锌源对不同温度下肉种母鸡相关性能及分子指标的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- [63] GAO F, DING B, ZHOU L, et al. Magnesium sulfate provides neuroprotection in lipopolysaccharide - activated primary microglia by inhibiting NF- κ B pathway [J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 184(2): 944-950.
- [64] EL-RATEL I T, GABR A A. Effect of Spirulina and Vitamin E on Reproduction and *in vitro* Embryo Production in Heat-stressed Rabbits [J]. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 2019, 22(11): 545-553.
- [65] BARBA - VIDAL E, MARTÍN - ORÚE S M, CASTILLEJOS L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review [J]. *Livestock Science*, 2019, 223: E140-8.
- [66] BARBA - VIDAL E, MARTÍN - ORÚE S M, CASTILLEJOS L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review [J]. *Livestock Science*, 2019, 223: 84-96.
- [67] HAYAKAWA T, MASUDA T, KUROSAWA D, et al. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post - weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets [J]. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 2016, 87(12): 1501-1510.
- [68] KRITAS S K, MARUBASHI T, FILIOUSSIS G, et al. Reproductive performance of sows was improved by administration of a sporing bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102) [J]. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(1): 405 - 413.
- [69] WANG W C, YAN F F, HU J Y, et al. Supplementation of *Bacillus subtilis* - based probiotic reduces heat stress - related behaviors and inflammatory response in broiler chickens [J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96(5): 1654-1666.

- [70] LI Y, ZHANG H, CHEN Y P, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress and intestinal damage in lipopolysaccharide - challenged broilers [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 208:1504-1511.
- [71] YUYING W, XUE Y, WEIWEI Z, et al. *Lactobacillus casei* Zhang Prevents Jejunal Epithelial Damage to Early - Weaned Piglets Induced by *Escherichia coli* K88 via Regulation of Intestinal Mucosal Integrity, Tight Junction Proteins and Immune Factor Expression [J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2019, 29(6):863-876.
- [72] ZHAO D, WU T, YI D, et al. Dietary Supplementation with *Lactobacillus casei* Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in a Porcine Model [J]. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2017, 18(12):2535.
- [73] BURDICK N C, CARROU J A, BROADWAY P R, et al. Supplementation of a *Lactobacillus acidophilus* fermentation product can attenuate the acute phase response following a lipopolysaccharide challenge in weaned pigs [J]. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 2019, 13(1):144-152.
- [74] BROADWAY P R, CARROLL J A, SANCHEZ N C B, et al. Supplementation of a *Lactobacillus acidophilus* fermentation product can attenuate the acute phase response following a lipopolysaccharide challenge in pigs [J]. *Animal*, 2019, 13(1):144-152.
- [75] FENGMING C, HOUJUN W, JIAYI C, et al. *Lactobacillus delbrueckii* Ameliorates Intestinal Integrity and Antioxidant Ability in Weaned Piglets after a Lipopolysaccharide Challenge [J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020:6028606.
- [76] ZHILIN W, LI W, ZHUANG C, et al. In Vitro Evaluation of Swine - Derived *Lactobacillus reuteri*: Probiotic Properties and Effects on Intestinal Porcine Epithelial Cells Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2016, 26(6):1018-1025.
- [77] KANGLI W, GUANGYONG C, GUANGTIAN C, et al. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecalis* on growth performance, intestinal structure, and inflammation in lipopolysaccharide - challenged weaned piglets [J]. *Journal of animal science*, 2019, 97(10):4140-4151.
- [78] CHEN L, LI S, ZHENG J, et al. Effects of dietary *Clostridium butyricum* supplementation on growth performance, intestinal development, and immune response of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9(4):957-970.
- [79] SPINU M, NICULAE M, PAȘTIU A I, et al. Vegetal extracts influence in vitro on the cell-mediated immunity in carnivores depending on health status, target species and plant taxonomy [J]. *Industrial Crops & Products*, 2016, 88:44-47.
- [80] 牟唐维, 薛长定, 魏明洁, 等. 黄芪生脉饮对模拟运输应激大鼠肺脏组织TLR4和NF- κ B p50 mRNA表达的影响[J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(6):39-43.
- [81] 孙金旭. 黄芪多糖拮抗运输应激致雏鸡肝脏损伤的作用[D]. 硕士学位论文. 泰安:东北农业大学, 2020.
- [82] HEIM G, O'DOHERTY J V, O'SHEA C J, et al. Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets [J]. *Journal of Nutritional Science*, 2015, 4:e27.
- [83] KHAN M S, MUHAMMAD T, IKRAM M, et al. Dietary Supplementation of the Antioxidant Curcumin Halts Systemic LPS-Induced Neuroinflammation-Associated Neurodegeneration and Memory/Synaptic Impairment via the JNK/NF- κ B/Akt Signaling Pathway in Adult Rats [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019:7860650.
- [84] NA L, XINGMEI L, JIAYAO Y, et al. Curcumin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Lipid Metabolism Disorder by Modification of m6A RNA Methylation in Piglets [J]. *Lipids*, 2018, 53(1):53-63.
- [85] CHANG YC, TSAI MH, SHEU W HH, et al. The therapeutic potential and mechanisms of action of quercetin in relation to lipopolysaccharide-induced sepsis in vitro and in vivo [J]. *PLoS ONE*, 2017, 8(11):e80744.
- [86] LOPES D G, SORRAILA D O J, RIEGER D A E J, et al. Ellagic Acid Inhibits Neuroinflammation and Cognitive Impairment Induced by Lipopolysaccharides [J]. *Neurochemical Research*, 2020(10):2456-2473.
- [87] YANG L, LIU G, LIANG X, et al. Effects of berberine on the growth performance, antioxidative capacity and immune response to lipopolysaccharide challenge in broilers [J]. *Animal Science Journal*, 2019, 90(9):1229-1238.

不同浓度亚硒酸钠对猪骨骼肌卫星细胞增殖和硒蛋白基因表达的影响

何逸懿, 申露露, 李莉, 洪兴, 李大江, 肖明飞, 唐青松, 徐娥*
(贵州大学动物科学学院, 动物营养与饲料研究所, 贵州 贵阳 550025)

摘要:为研究不同浓度亚硒酸钠对猪骨骼肌卫星细胞增殖分化以及硒蛋白 W (Selenoprotein W, SelW) 和硒结合蛋白 1 (Selenium-binding protein 1, SBP1) 表达的影响。分别在 0 (对照组)、0.02 (0.02% 组)、0.1 (0.1% 组)、0.5 (0.5% 组)、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.5% 组) 亚硒酸钠浓度的培养基条件下培养骨骼肌卫星细胞, 在第 1、2、3、4 天观察细胞增殖分化情况, 分别在第 1、3、5、7 天收集处理后的细胞。提取上述收集细胞的 mRNA, 检测 SelW 和 SBP1 基因表达。结果表明: 1) 从第 1 天到第 4 天, 0.02% 组、0.1% 组、0.5% 组细胞增殖与对照组相似, 其中以 0.1% 组与对照组最接近。然而, 2.5% 组在第 3 天后降低了细胞数量, 细胞出现大量死亡。2) 不同浓度亚硒酸钠对 SelW 的表达在第 3 天影响最大, 随着亚硒酸钠浓度增加呈现先增加后降低的趋势。第 3 天数据表明, 与对照组相比, 0.02% 组、0.1% 组、0.5% 组和 2.5% 组均显著增加 SelW 的 mRNA 表达量, 且 0.1% 组和 0.5% 组的表达量显著高于 0.02% 组和 2.5% 组 ($P < 0.05$)。不同浓度亚硒酸钠对 SBP1 的表达在第 3 天和第 7 天影响最大, 随着亚硒酸钠浓度增加呈现先增加后降低的趋势。在第 3 天时, 与对照组相比, 0.02% 组和 0.5% 组显著增加 SBP1 的 mRNA 表达, 且 0.02% 组组表达量显著高于 0.1% 组和 2.5% 组, 0.5% 组表达量显著高于 0.1% 组 ($P < 0.05$)。在第 7 天时, 0.1% 组和 0.5% 组 SBP1 的 mRNA 表达量显著高于对照组、0.02% 组和 2.5% 组, 且 2.5% 组表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。综上所述, 0.02% 和 0.1% 的低浓度亚硒酸钠不抑制和损害细胞增殖, 而 0.5% 的亚硒酸钠水平会抑制细胞增殖速率, 2.5% 的亚硒酸钠水平有较强细胞毒性。0.02% 和 0.1% 低浓度的亚硒酸钠可促进硒蛋白 SelW 和 SBP1 的 mRNA 表达, 2.5% 浓度亚硒酸钠抑制 SelW 和 SBP1 的 mRNA 表达。

关键词: 亚硒酸钠; 硒蛋白; 细胞增殖; SelW; SBP1

中图分类号: S816.7 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)04-0009-06

Effect of different concentrations of sodium selenite on proliferation and selenoprotein gene expression in porcine skeletal muscle satellite cells

HE Yiyi, SHEN Lulu, LI Li, HONG Xing, LI Dajiang, XIAO Mingfei, TANG Qingsong, XU E
(Institute of Animal Nutrition and Feed science, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025)

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018]5781号); 贵州大学 SRT 项目(2021058)

作者简介: 何逸懿(1998-), 女, 本科生, 研究方向: 动物营养与饲料科学。E-mail: 1052893604@qq.com

*通信作者: 徐娥(1978-), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 肉品质营养调控。E-mail: exu@gzu.edu.cn

Abstract: This experiment was designed to investigate the effects of different concentrations of sodium selenite on the proliferation and differentiation of porcine skeletal muscle satellite cells and on the expression of SelW and SBP1. The skeletal muscle satellite cells were isolated from white pigs, and the differentiation of skeletal muscle satellite cells and their status were identified by immunohistochemistry. The skeletal muscle satellite cells were cultured at five concentrations of sodium selenite: 0 (control group), 0.02 (0.02% group), 0.1 (0.1% group), 0.5 (0.5% group), and 2.5 (2.5% group) $\mu\text{g/mL}$, and the cell proliferation and differentiation were observed on days 1 to 4, respectively. Cells which were cultured by the abovementioned different concentration of sodium selenite were collected on day 1, 3, 5, and 7 respectively and RNA were extracted for detecting the expression of SelW and SBP1 gene. The results showed that: 1) From day 1 to day 4, cells proliferation in the 0.02%, 0.1%, and 0.5% groups were similar to that of the control group, with the 0.1 $\mu\text{g/mL}$ group showing the closest trend to the control group. However, the number of cells in the 2.5% group decreased after day 3 and massive cells death occurred. 2) The expression of SelW was mostly affected by different concentrations of sodium selenite on day 3, showing a trend of first upregulation and then downregulation, along with increased concentration of sodium selenite. Data of day 3 showed that the mRNA expression of SelW was significantly increased in the 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% groups compared with the control group, and the expression in the 0.1% and 0.5% groups was higher than that in the 0.02% and 2.5% groups ($P < 0.05$). The expression of SBP1 was mostly affected by different concentrations of sodium selenite on day 3 and day 7, showing a trend of increasing and then decreasing with increasing sodium selenite concentration. At day 3, compared with the control group, the mRNA expression of SBP1 was significantly increased in the 0.02% and 0.5% groups, the expression in the 0.02% group was significantly higher than that in the 0.1% and 2.5% groups, and the expression in the 0.5% group was significantly higher than that in the 0.1% group ($P < 0.05$). At day 7, the mRNA expression of SBP1 in the 0.1% and 0.5% groups was significantly higher than that in the control, 0.02% and 2.5% groups, and the expression in the 2.5% group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). In conclusion, low concentrations of sodium selenite at 0.02% and 0.1% did not inhibit and impair cell proliferation, while 0.5% sodium selenite level inhibited cell proliferation rate and 2.5% sodium selenite level had strong cytotoxicity. The mRNA expression of SelW and SBP1 was promoted by low concentrations of sodium selenite at 0.02% and 0.1%, whereas the mRNA expression of SelW and SBP1 was inhibited by 2.5% concentration of sodium selenite.

Keywords: Sodium selenite; Selenoprotein, cell; Proliferation; SelW; SBP1

硒(Selenium, Se)既是动物必须的微量元素,也是不可或缺的微量营养素。硒具有广泛的生物学功能,包括抗氧化、抗癌、维持正常代谢和增强免疫力等功能^[1]。缺硒会导致氧化相关的代谢和免疫应答紊乱,甚至引起肝坏死、骨骼肌变性和死亡,而过量硒的摄入会引起硒中毒,造成动物疾病和死亡^[2]。硒的另一个重要的生理功能是参与硒蛋白合成,且硒的生物学功能发挥是通过含半胱氨酸的硒蛋白来介导实现的。目前,猪饲料中仍较多使用亚硒酸盐来补硒,最常见的是亚硒酸钠。

硒蛋白大多是参与氧化还原调节和抗氧化保护的酶,此外硒蛋白W(Selenoprotein W, SelW)和硒结合蛋白1(Selenium-binding protein 1, SBP1)是近年发现且具有重要生理调节作用的2种硒蛋白^[3-5]。SelW是第一个被发现的与动物肌肉发育和

形成相关的硒蛋白,在动物体内主要的作用是抗氧化、抗炎症、抗细胞凋亡以及免疫作用^[6-7]。SelW还对骨骼肌肌源性分化调节因子具有调控作用,进而影响着畜禽骨骼肌的生长发育。此外,SBP1在机体参与细胞内蛋白质的降解和运输,并参与氧化还原平衡的调节和肿瘤免疫调节,同时是脂肪细胞发育成熟的标志物^[8-9]。本课题组前期利用转录组测序(RNA-seq)从江香猪和大白猪背肌中筛选出SelW和SBP1基因在大白猪和从江香猪具有不同的表达模式,表明SelW和SBP1在肉质调控上具有关键作用^[10]。猪骨骼肌卫星细胞是探究猪肌肉形成过程的良好模型,分离培养获得的猪骨骼肌卫星细胞具有较高的折光性,贴壁培养多呈梭形或纺锤形,细胞增殖速度快^[11]。通过建立体外肌卫星细胞的分离培养体系对探索猪肌肉生长

发育过程具有指导意义。然而,不同亚硒酸钠水平对肌卫星细胞增殖及SelW和SBP1的表达的影响尚不清楚。因此,本实验旨在研究不同硒浓度硒对肌卫星细胞增殖的影响,以及不同硒浓度硒对SelW和SBP1基因的表达的调控作用,以期营养调控硒蛋白的表达,改善猪肉品质提高参考。

1 材料与方法

1.1 肌卫星细胞的分离培养

选取3头90日龄、同一胎次和体重相近的大白猪,麻醉处死,在无菌环境取出背最长肌,用含双抗的PBS缓冲液处理,去除结缔组织,进行猪卫星细胞分离。将分离出的背最长肌剪碎,放到无菌、装有1 g/L胶原酶的离心管,37℃水浴振荡环境消化1 h。然后用10%FBS完全培养基终止消化,尼龙筛过滤,1 200 rpm离心10 min,将上清细胞转移至完全培养基,1 000 rpm离心10 min,以上步骤重复两次,然后添加完全培养基。采用差速贴壁法来分离猪肌卫星细胞,即将过滤好的单个肌细胞放在37℃、5%的CO₂环境下培养3 h,观察细胞的贴壁情况,非肌源性肌细胞贴壁生长,未贴壁细胞(肌细胞)转至新的相同培养环境,继续培养3 h,此时所获得的细胞为较为纯净的肌细胞。传代是在细胞融合至80%~90%用胰蛋白消化传代。

1.2 细胞增殖与不同浓度亚硒酸钠处理

将亚硒酸钠加入到含10%胎牛血清、DMEM液体培养基和1%双抗(青霉素和链霉素)的培养基配制成0、0.02、0.1、0.5、2.5 μg/mL的亚硒酸钠培养基,pH为7.2~7.4,随后过滤除菌后为增殖培养基备用。将传代培养3代的猪肌卫星细胞置于96孔板中配置成100 μL细胞悬液,然后在37℃、5%的CO₂条件下预培养24 h,取出,向培养板中加入增殖培养液10 μL。细胞增殖检测方法按照Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒进行。

1.3 诱导分化

采用在1.2中增殖培养基的配制方法,使用2%的马血清替换10%的胎牛血清制备新的培养基。将传代培养3代的猪卫星细胞制成细胞爬片后,使用1.2中制备好的胎牛血清培养基进行培养,当细胞增殖至70%时(预计3 d),更换为分化培养基(2%的马血清培养基)进行培养。分别在分

化后的1 d、3 d、5 d、7 d收集细胞提取RNA。

1.4 Desmin免疫组化

肌卫星细胞接种于载玻片24 h,经通风干燥后按照SABC免疫组化染色试剂盒进行,简要步骤如下:细胞使用4%的多聚甲醛固定30 min,3%的H₂O₂室温孵育5~10 min,5%的胎牛血清蛋白(BSA)室温封闭30 min,随后4℃一抗孵育过夜和室温二抗孵育30 min,滴加SABC反应30 min后进行DAB显色。在倒置显微镜上观察切片图像,Image-Pro软件采集图像。一抗为肌结蛋白(鼠抗,1:300),二抗为生物素化山羊抗小鼠IgG。

1.5 提取RNA与实时荧光定量(qRT-PCR)

利用Trizol试剂(Invitrogen,美国)提取细胞总RNA,用微量紫外分光光度计Nano Drop-2000C(Thermo Fisher Scientific,美国)检测总RNA的纯度和浓度。使用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增效果。以总RNA为模板,根据反转录试剂盒Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit操作说明书反转录得到第1链cDNA。qRT-PCR(CFX System, Bio-Rad,美国)体系为20 μL体系:RNAase ddH₂O 7.4 μL,上、下游引物(10 mM)各0.8 μL,cDNA 1 μL,2×Es Taq MasterMix(Dye)10 μL。反应条件为:94℃ 2 min预变性;94℃ 30 s,60℃ 30 s,延伸72℃ 30 s,循环39次;72℃ 2 min,4℃保存。根据NCBI中猪的基因序列使用Primer Premier 6.0和Beacon designer 7.8软件进行引物设计,引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。本研究检测的目的基因和内参基因(18S rRNA)的引物序列见表1。采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的mRNA表达量,对照组表达量设为1。

1.6 数据分析

采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),邓肯(Duncan)法进行多重比较,利用GraphPad Prism 8.0软件作图。所有结果均以平均值±标准误表示,P<0.05为差异显著。

2 结果

2.1 猪卫星细胞的鉴定

分离的猪肌卫星细胞用Desmin免疫组化和标志基因MyoD和MyoG的表达进行鉴定。图1(A)为Desmin免疫组化的结果,可以看出,肌结蛋白

表1 实时荧光定量PCR引物

基因	登录号	引物序列(5'→3')	产物片段
18S rRNA	NR046215	F: CCCACGGAATCGAG AAAGAG	122
		R: TTGACGGAAGGGCA CCA	
MyoG	NM001012406.1	F: CTTCTACCAGGAAC CCCCTTCT	164
		R: GTCCCAGCCCCTTA TCTTC	
MyoD	U1257.1	F: TGCCTATTCTCAACC CCTC	248
		R: AGTATGCAAGGGTG GAGTGG	
SBP1	NC_003075.7	F: ATCCCCCGGAAGGG AAGTAG	169
		R: TCGGTGCTTGTGTTT CGGTA	
SelW	NM_213977.1	F: CGCCGTTCGAGTCGT CTATT	176

注:F:上游引物;R:下游引物

成棕黄色, 呈现阳性反应。标志基因的表达鉴定结果如图1(B)和(C)所示, 在分离的细胞中均有MyoD和MyoG基因的表达。因此可以确定我们所分离得到的细胞为猪骨骼肌卫星细胞, 可以用于下一步的实验。

2.2 不同浓度亚硒酸钠对细胞增殖的影响

如图2所示, 细胞经亚硒酸钠培养液培养后, 从第1天到第4天, 0.02%组、0.1%组、0.5%组与对照组相似, 均逐步增加了细胞数量, 其中以0.1%

组趋势与对照组最接近。然而, 2.5%组在第3天后降低了细胞数量, 细胞大量死亡。

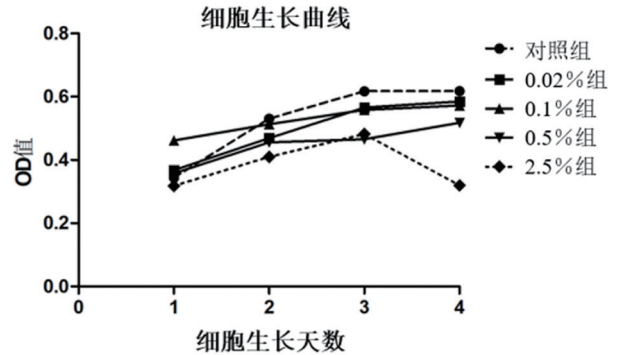
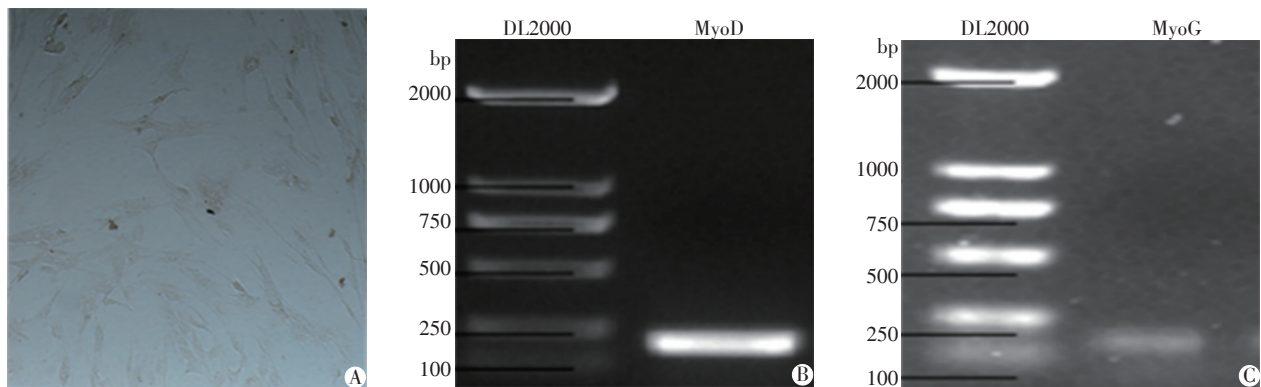


图2 不同亚硒酸钠浓度对细胞增殖的影响

不同亚硒酸钠浓度对SelW的mRNA表达结果如图3所示, 不同亚硒酸钠浓度对SelW的mRNA表达在第3天影响最大。统计分析结果显示, 在第1天时, 与对照组相比, 0.02%组、0.1%组、0.5%组和2.5%组均显著降低SelW的mRNA表达量 ($P < 0.05$)。在第3天时, 与对照组相比, 0.02%组、0.1%组、0.5%组和2.5%组均显著增加SelW的mRNA表达量, 且0.1%组和0.5%的表达量显著高于0.02%组和2.5%组 ($P < 0.05$)。在第5天时, 与对照组相比, 0.5%组显著降低SelW的mRNA表达量 ($P < 0.05$)。在第7天时, 与对照组相比, 0.1%和2.5%组显著降低SelW的mRNA表达量, 而0.5%组表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

不同亚硒酸钠浓度对肌卫星细胞SBP1的mRNA表达结果如图4所示。在第1天时, 与对照



注:A:猪肌卫星细胞Desmin免疫组化;B:MyoD标志基因表达;C:MyoG标志基因表达

图1 肌卫星细胞鉴定

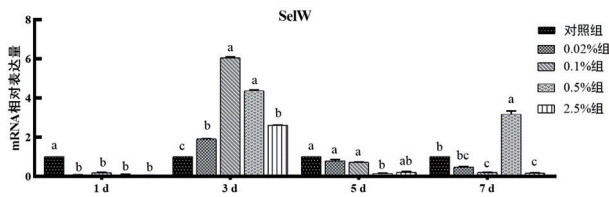


图3 不同浓度亚硒酸钠对SelW表达的影响

组相比, 0.02%组和2.5%组显著降低SBP1的mRNA表达($P<0.05$)。在第3天时, 与对照组相比, 0.02%组和0.5%组显著增加SBP1的mRNA表达, 且0.02%组组表达量显著高于0.1%组和2.5%组, 0.5%组表达量显著高于0.1%组($P<0.05$)。在第5天时, 与对照组相比, 0.02%组显著增加SBP1的mRNA表达, 且0.05组表达量显著低于对照组和0.02%组($P<0.05$)。在第7天时, 0.1%组和0.5%组SBP1的mRNA表达量显著高于对照组、0.02%组和2.5%组, 且2.5%组表达量显著低于对照组($P<0.05$)。

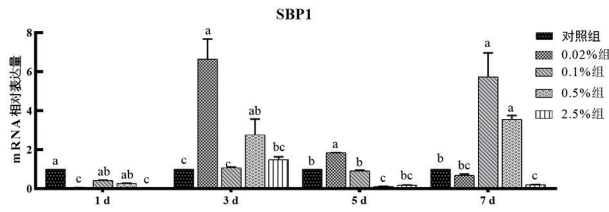


图4 不同浓度亚硒酸钠对SBP1表达的影响

3 讨论

硒是动物生长发育的一种必需微量营养素, 已知动物缺硒或过量硒均会导致代谢紊乱、免疫动态失衡甚至死亡等病理现象。硒在畜禽体内发挥功能主要以硒蛋白的形式进行, 硒蛋白作为畜禽机体生命活动的重要载体, 对机体的正常发育及骨骼肌生长至关重要。畜禽体内硒主要以硒蛋白形式参与抗氧化应激、骨骼肌发育和生殖生理等一系列生命活动^[4]。缺硒易引起硒蛋白含量和活性降低, 进而造成机体正常生理功能受阻, 同时也会导致畜禽骨骼肌和心肌组织的变性和坏死^[12-13]。因此, 本研究探讨不同浓度硒对细胞增殖和硒蛋白表达的影响, 结果发现2.5%的亚硒酸钠对细胞增殖有损害作用, 显示了较强的细胞毒性, 0.1%和

0.5%的亚硒酸钠浓度有助于调控硒蛋白表达。

骨骼肌卫星细胞是存在于骨骼肌膜和基膜之间的一类单核肌源性干细胞。肌卫星细胞多处于静息状态, 在肌肉组织受到物理或化学刺激或损伤时, 可使部分肌卫星细胞转为活跃状态, 并增殖分化, 以修补受损部分的肌肉组织^[14]。细胞复制是生命体生长、发育、繁殖和遗传的生物基础, 通过细胞增殖状况反应动物的生长情况^[10]。本实验通过分离相同生长状况的同窝仔猪的背最长肌, 分离培养猪肌卫星细胞, 诱导分化后制成细胞爬片, 置于不同浓度的亚硒酸钠培养基中培养, 研究细胞的增殖情况。结果表明0.02%和0.1%的亚硒酸钠对1~4天肌卫星细胞数量影响不大, 但当亚硒酸钠浓度提高至0.5%时, 细胞数量增长速率明显下降, 2.5%的高浓度亚硒酸钠在第3天后显著抑制细胞增殖甚至杀死细胞, 反映出较强毒性作用。由此可见, 0.02%和0.1%的亚硒酸钠对肌卫星细胞没有损害作用, 0.5%的浓度会抑制细胞增殖, 2.5%的高浓度亚硒酸钠具有较强的细胞毒性作用。

硒蛋白是硒发挥益生理功能的主要载体, SelW和SBP1是硒蛋白家族的重要成员。硒蛋白的研究经过数十年发展, 已发现SelW广泛存在于畜禽心肌、骨骼肌和大脑等组织部位, 硒的降低将导致组织中的SelW表达量减少^[15]。研究表明, SelW在骨骼肌中的表达与动物机体的生长发育以及体内成肌细胞的增殖分化呈正相关, 特别是腿部肌肉的发育, 对饲料中的硒含量尤为敏感^[16]。最近一项研究表明, SelW在破骨细胞中通过细胞还原状态增加来增加其抗凋亡作用^[17]。本试验在细胞培养的过程中发现, 不同浓度对SelW的表达在第3天影响最大, 且随着浓度增加呈先上调后下降的表达趋势, 0.1%的亚硒酸钠促进SelW效果最好。然而, 即使2.5%浓度的亚硒酸钠对肌卫星细胞有毒性作用, 但相比对照组在第3天仍然可以提高SelW的表达, 但随着处理时间增加, 第7天抑制了SelW的表达, 结合本试验不同浓度亚硒酸钠对细胞增殖的影响来看, 这可能是在第3天时毒性作用还未完全发挥出来。

SBP1是硒蛋白中的另一重要蛋白, 是肉质调控的关键基因。有学者论述了SBP1基因在动物体内可能是一种肿瘤抑制基因, 在体内的作用主

要为调节细胞氧化还原平衡、调节囊泡内高尔基体转运、在神经组织中的潜在生物学功能^[18]。另外, SBP1 在肿瘤致癌过程中具有作为标志物的作用^[19]。也有研究表明, SBP1 是脂肪细胞分化的内源性刺激因子, 是脂肪细胞发育成熟或分化的标志^[20-21]。肖明飞等人证明 SBP1 和 SelW 基因是猪背最长肌品质调控的关键基因, 且在不同猪种两种基因的表达模式不同^[22]。在本研究中, 不同浓度亚硒酸钠在第 3 天和第 7 天对 SBP1 的表达影响最大。数据表明, 在第 3 天时, 0.02% 浓度的亚硒酸钠促进了肌卫星细胞 SBP1 的高表达, 第 7 天时 0.1% 和 0.5% 促进了 SBP1 高表达, 但随着处理时间增加, 第 7 天时 2.5% 浓度亚硒酸钠抑制了 SBP1 的表达。由此可见, 0.02%、0.1% 和 0.5% 浓度的亚硒酸钠对肌卫星细胞 SBP1 表达的影响最大, 在试验第 7 天仍然有较好的促表达作用, 然而 2.5% 的高浓度亚硒酸钠仍然不利于 SBP1 的表达。

4 结论

(1) 0.02% 和 0.1% 的低浓度亚硒酸钠不抑制和损害细胞增殖, 0.5% 的浓度亚硒酸钠会抑制细胞增殖速率, 2.5% 浓度亚硒酸钠有较强细胞毒性。

(2) 低浓度亚硒酸钠可促进肌卫星细胞 SelW 和 SBP1 的表达, 表达呈先上调后下降的趋势; 本试验中, 0.02% 和 0.1% 浓度亚硒酸钠促进 SelW 表达效果最好, 0.1% 和 0.5% 浓度促进 SBP1 表达效果最好, 但随着处理时间增加, 2.5% 高浓度亚硒酸钠会抑制 SelW 和 SBP1 的表达。

参考文献:

[1] 刘旭光, 熊康宁, 汤小朋, 等. 硒的生物学作用及其在牛生产中的应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2021, 33(10): 5475-5485.

[2] XIE M, SUN X, LI P, et al. Selenium in cereals: Insight into species of the element from total amount [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(3): 2914-2940.

[3] LABUNSKYY V M, HATFIELD D L, GLADYSHEV V N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles [J]. Physiological reviews, 2014, 94(3): 739-777.

[4] STEINBRENNER H, SPECKMANN B, KLOTZ L. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 595: 113-119.

[5] RAYMAN M P. Selenium and human health. [J]. Lancet (London, England), 2012, 379(9822): 1256-1268.

[6] 韩莉欣, 熊咏民. 硒蛋白 W 生物学功能及其与疾病关系的研究进展[J]. 国外医学(医学地理分册), 2015, 36(3): 182-185.

[7] WHANGER P D. Selenoprotein W: a review [J]. Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS, 2000, 57(13-14): 1846-1852.

[8] STEINBRENNER H, MICOOGULLARI M, HOANG N A, et al. Selenium - binding protein 1 (SELENBP1) is a marker of mature adipocytes [J]. Redox Biology, 2019, 20: 489-495.

[9] 张锐, 钱立庭. 硒结合蛋白 1 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(5): 451-458.

[10] 申露露. 猪肉质关键功能基因筛选及硒对关键基因表达的影响[D]. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州大学, 2020.

[11] 秦本源, 杨阳, 张燕伟, 等. 猪骨骼肌卫星细胞分离培养、鉴定及其生物学特性[J]. 中国农业科学, 2020, 53(8): 1664-1676.

[12] CHEN X, ZHAO Z, ZHOU J, et al. Evolution, regulation, and function of porcine selenogenome [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2018, 127: 116-123.

[13] OU B, JIANG M, LIN C, et al. Characterization and expression of chicken selenoprotein W [J]. Biometals, 2011, 24(2): 323-333.

[14] 刘佳婷, 黎嘉海, 殷超, 等. 骨骼肌卫星细胞表观遗传调控的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(13): 21-27.

[15] 王晓龙. 横纹肌相关含硒蛋白 SelW 的研究进展[J]. 中国兽医科技, 2004(11): 51-54.

[16] RUAN H, ZHANG Z, WU Q, et al. Selenium regulates gene expression of selenoprotein W in chicken skeletal muscle system [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 145(1): 59-65.

[17] KIM H, LEE K, KIM J M, et al. Selenoprotein W ensures physiological bone remodeling by preventing hyperactivity of osteoclasts [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2258.

[18] MOSTAFA E, ALAN M D. Selenium - binding protein 1 in human health and disease [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3437.

[19] NADER J S, BOISSARD A, HENRY C, et al. Cross - species proteomics identifies CAPG and SBP1 as crucial invasiveness biomarkers in rat and human malignant mesothelioma [J]. Cancers, 2020, 12(9): 2430.

[20] HOLGER S, MUSTAFA M, NGOC A H, et al. Selenium - binding protein 1 (SELENBP1) is a marker of mature adipocytes [J]. Redox Biology, 2018, 20: 489-495.

[21] RANDI E B, CASILI G, JACQUEMAI S, et al. Selenium - binding protein 1 (SELENBP1) supports hydrogen sulfide biosynthesis and adipogenesis [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2021, 10(3): 361.

[22] 肖明飞, 申露露, 何逸懿, 等. 基于 RNA-seq 筛选影响猪肉品质的关键候选基因 [J/OL]. 中国畜牧杂志: 1-14 [2022-05-05]. DOI:10.19556/j.0258-7033.20210918-06.

云南安宁猪链球菌的分离鉴定及耐药性研究

周玉照¹, 张冲², 李娟³, 张小苗^{1*}

(1.大理农林职业技术学院, 云南 大理 671003;

2.昆明海关技术中心, 云南 昆明 650228;

3.云南中科基因技术有限公司, 云南 昆明 650500)

摘要:为了解云南安宁某猪场病死猪的致病菌及耐药性。采集病死猪只的肝、肺、脾、淋巴结进行涂片染色镜检、分离培养、生化试验、动物致病性试验、16S rRNA 鉴定、血清型鉴定、毒力因子基因表型检测、药敏试验等方法对分离菌株进行研究。结果表明从病死猪的脏器中分离鉴定的菌株 Ynanning SS 为 2 型猪链球菌, Ynanning SS 的 16S rRNA 基因序列与 LC377187、KM972351 同源高达 99.3%, 与其它猪链球菌 16S rRNA 序列同源性都高于 92.5% 以上。且遗传进化树与 LC377187 属于同一分枝, 亲缘关系较近; Ynanning SS 毒力因子基因表型为 E_{pf}+M_{rp}+S_{ly}+, 属于强毒力菌株; Ynanning SS 对庆大霉素、克林霉素、林可霉素、头孢唑林、头孢呋肟、头孢他啶、磺胺对甲氧嘧啶耐药, 对青霉素、环丙沙星中介, 对多西环素、头孢曲松、头孢噻肟、四环素、磺胺嘧啶敏感。选用对临床分离菌株敏感的药物治疗可取得良好的治疗效果, 相关研究结果为当地猪链球菌病的防治提供一定参考依据。

关键词:猪链球菌; 分离鉴定; 血清型; 毒力因子基因; 药敏试验

中图分类号:S852.61 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2022)04-0015-06

Study of isolation, identification and drug resistance of *Streptococcus suis* in Anning, Yunnan

ZHOU Yuzhao¹, ZHANG Chong², LI Juan³, ZHANG Xiaomiao^{1*}

(1. Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali Yunnan 671003;

2. Kunming Customs Technical Center, Kunming Yunnan, 650228;

3. Yunnan Zhongke Gene Technology Co., Ltd, Kunming Yunnan, 650500)

Abstract: This test was researched for the pathogenic bacteria and drug resistance of dead pigs in a pig farm in Anning, Yunnan Province. Collecting liver, lung, spleen, and lymph nodes of dead pigs for smear staining, microscopic examination, separation culture, biochemical test, animal pathogenicity test, 16S rRNA identification, serotype identification, virulence factor genotype and phenotype detection, and drug sensitivity test to study the isolated strains. The results showed that the Ynanning SS from the organs of dead pigs was *Streptococcus suis* type 2. The 16S rRNA gene sequence of Yinanning SS was 99.3% homologous to LC377187 and KM972351, and was higher than 92.5% homologous to other *Streptococcus suis*. Ynanning SS is resistance to gentamicin, clindamycin, lincomycin, cefazolin, cefuroxime, ceftazidime and sulfamethoxam, moderately sensitive to penicillin, ciprofloxacin, and sensitive to doxycycline, ceftriaxone, cefotaxime, tetracycline and sulfadiazine. Selecting sensitive drugs to

收稿日期:2021-06-29

作者简介:周玉照(1988-),男,云南宣威人,硕士,讲师,研究方向:动物微生物与免疫学。E-mail:806377756@qq.com

*通讯作者:张小苗(1989-),女,云南保山人,硕士,研究方向:动物传染病及流行病学分析。E-mail:980459415@qq.com

clinical isolates can achieve good therapeutic effects. The research results provide a certain reference for the prevention and treatment of local *Streptococcus suis* disease.

Keywords: *Streptococcus suis*; Isolation and identification; Serotype; Virulence factor gene; Drug sensitivity test

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种世界流行的人畜共患病病原菌,可引起猪败血症、脑膜炎、心内膜炎等疾病,给养猪业带来严重危害^[1]。根据荚膜多糖抗原特性,猪链球菌可分为35个血清型(1~34型和1/2型),有致病性的为1~5型、7型、9型、11型和1/2型,其中2型流行广且致死性最强,1型次之^[2]。猪链球菌的致病性与其所携带的毒力因子相关,其主要的毒力因子包括溶菌酶释放蛋白(Mrp)、胞外因子(Epf)和溶血素(Sly)等^[3]。欧美国家对2型猪链球菌部分毒力因子的分布情况已有报道,发现多种基因型,且致病性最强的基因型为cps2/epf+/mrp+/sly+^[4]。目前,猪链球菌病主要通过药物和疫苗来防治,但由于猪链球菌菌株的血清型繁杂,且各血清型之间交叉免疫保护力不强,猪群接种链球菌疫苗存在免疫原性差异,可能与当地流行的血清型不符。单独使用市场上常见的疫苗进行预防通常效果欠佳,目前普遍采用多种抗菌药物综合防控猪链球菌,因此,选择合适的药物显得尤为重要^[5-6]。本试验通过对安宁市某猪场疑似猪链球菌感染的濒死猪采集内脏病料组织进行涂片染色镜检,采用分离培养、生化试验、动物致病性试验、16S rRNA鉴定、血清型鉴定、毒力因子基因表型检测、药敏试验等方法对分离菌株进行病原菌分离鉴定、耐药性分析研究,获得致病菌株的血清型、毒力因子以及对药物的敏感性,对于该病的防治有重要意义,可以为指导临床合理用药以及优势血清型的疫苗研发等提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 样品来源

采集云南省安宁市某猪场疑似感染猪链球菌的濒死猪的肝脏、肺脏、脾脏、淋巴结。

1.2 试验材料

HE琼脂培养基、HTB培养基、Todd-Hewitt琼脂、麦康凯琼脂平板、伊红美兰琼脂平板,普通营

养琼脂平板、血琼脂平板、革兰氏染色液、生化鉴定管、细菌DNA提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;小白鼠由昆明医科大学惠赠。

1.3 细菌分离培养及镜检

无菌剪取肝、肺、脾、淋巴结等病料,分别涂布于HE琼脂平板、麦康凯琼脂平板、伊红美兰琼脂平板、普通营养琼脂平板、血琼脂平板,37℃恒温培养24h后,将在血平板出现β溶血的菌落进行革兰氏染色镜检。镜检有G⁺双球菌或短链状球菌的菌落划线于Todd-Hewitt琼脂平板,37℃恒温培养24h后,再挑取平板上的单个可疑菌落进行革兰氏染色,镜检后,接种于HTB培养液中纯化培养。

1.4 生化试验

将分离菌株的纯培养液分别接种到生化鉴定管中,37℃恒温培养24~72h后,记录试验结果。

1.5 动物致病性试验

将健康的小白鼠4只随机分成2组,每组2只,猪链球菌试验组取纯培养菌液各2mL,腹腔注射,空白对照组注射2mL生理盐水。接种后每天观察小白鼠的发病和死亡情况,连续观察6d。并对发病和死亡的小白鼠进行细菌分离鉴定。

1.6 PCR鉴定

1.6.1 引物的设计与合成

根据GenBank中的保守序列,应用Primer 5软件设计8对引物,分别是鉴别猪链球菌的16S rRNA引物,鉴别猪链球菌1、2、7、9型的引物CPS1、CPS2、CPS7、CPS9,鉴别毒力因子Epf、Mrp、Sly的引物,引物由昆明硕擎生物科技有限公司合成。引物信息见表1。

1.6.2 PCR扩增及序列分析

用细菌DNA提取试剂盒提取分离菌株总DNA,以DNA为模板,用16S rRNA基因引物进行PCR鉴定,将PCR产物送华大基因进行测序,并用MegAlign软件构建进化树。根据测序鉴定结果确定为猪链球菌后再分别用猪链球菌1、2、7、9型

表1 引物序列信息

引物名称	引物序列信息	退火温度/℃	片段大小/bp	引物用途
16S rRNA	5'-AGAGTTTGATCCTGCTTG-3'	55	1500	鉴别猪链球菌
	5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'			
CPS1	5'-TTTAGTAGACGAAAACGGGT-3'	56	461	鉴别1型链球菌
	5'-TTGGCAAGAAGTCAATTATCC-3'			
CPS2	5'-TTCGTATTAACCTTACTTGGCGT-3'	56	450	鉴别2型链球菌
	5'-TAAATCCCATATGCCAAATCC-3'			
CPS7	5'-AGCTCTAACACGAAATAAGGC-3'	56	252	鉴别7型链球菌
	5'-GTCAAACACCCTGGATAGCCG-3'			
CPS9	5'-CGAAATCAAAGTGTATCAGC-3'	56	346	鉴别9型链球菌
	5'-TTCTATCCGAAGTATCTGGG-3'			
Epf	5'-GCTACGACGGCCTCAGAAATC-3'	55	626	鉴别毒力因子 Epf
	5'-TGGATCAACCACTGGTGTAC-3'			
Mrp	5'-GACAGATGGTGAGGAAAATGG-3'	55	747	鉴别毒力因子 Mrp
	5'-TGAGCTTTACCTGAAGCGGT-3'			
Sly	5'-TAAAGCAGCCATCAAAGG-3'	55	480	鉴别毒力因子 Sly
	5'-ACATGAAGATTGCCAGCA-3'			

特异性引物对分离菌株进行血清型分型鉴定;用猪链球菌毒力基因 Epf、Mrp、Sly 特异性引物进行毒力因子基因表型检测。PCR 扩增体系: Ex Taq 0.5 μL、10×Ex Taq Buffer 3μL、上下游引物各 0.5 μL、dNTP 2.5 μL、DNA 2 μL、ddH₂O 21 μL, 共 30 μL 体系;PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 55 °C (56 °C) 退火 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 终延伸 8 min^[7]。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 药敏试验

取 100 μL 纯培养菌液于血清琼脂平板上均匀涂布, 待平皿面稍干, 将药敏纸片平放在平板上, 37 °C 培养 24 ~ 72 h 后, 观察并测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 镜检结果

挑取血平板出现 β 溶血的菌落进行革兰氏染色镜检, 镜检发现菌体成双或成单排列、短链状、革兰氏阳性球菌(图 1), 初步判定为链球菌。

2.2 细菌分离培养结果

将肝、肺、脾、淋巴结等病料涂布于培养基, 只有肺脏和淋巴结病料组织在血平板上有菌落生长, 并且出现 β 溶血环(图 2F), 在 Todd-Hewitt 琼

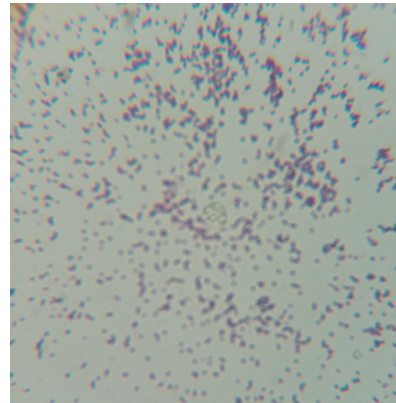


图1 镜检结果

脂平板上长出菌落(图 2E)。在 HE 琼脂平板(图 2A)、麦康凯琼脂平板(图 2B)、伊红美兰琼脂平板(图 2C)、普通营养琼脂平板(图 2D)上均不生长。

2.3 生化试验结果

参考《兽医微生物学(第五版)》《常见细菌系统鉴定手册》等书籍基本判定, 分离菌株判定为猪链球菌(表 2)。

2.4 动物致病性试验结果

腹腔注射了分离猪链球菌试验组小白鼠 24 h 内全部死亡, 对照组 72 h 后全部存活。将死亡的

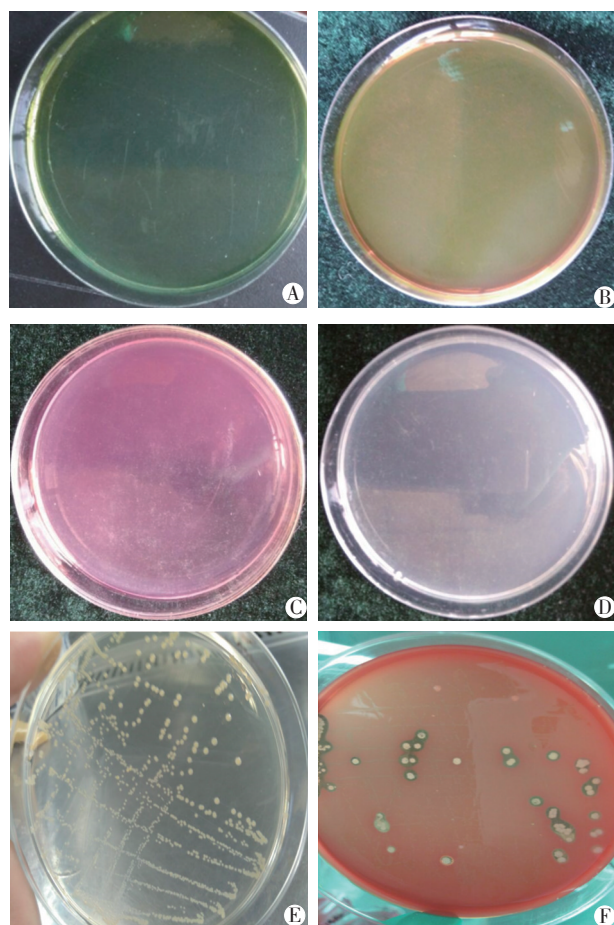


图2 细菌分离培养结果

表2 生化试验结果

项目	结果	项目	结果
七叶苷	+	菊糖	+
葡萄糖	+	甘露醇	-
水杨素	+	山梨醇	-
阿拉伯糖	-	棉籽糖	-
蔗糖	+	海藻糖	+
乳糖	+	肌醇	-
麦芽糖	+	M.R.	+

注：“+”表示阳性，发酵对应的糖产酸不产气；“-”表示阴性

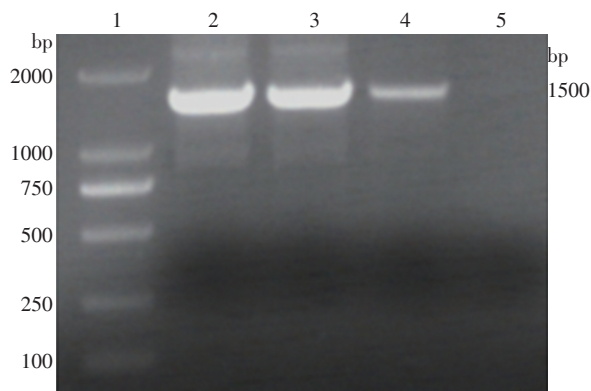
小白鼠全部进行剖检，取内脏涂布于Todd-Hewitt琼脂平板培养，结果全部都长出了菌落。

2.5 PCR 鉴定结果

2.5.1 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

将分离菌株进行16S rRNA基因扩增，经1%琼脂凝胶电泳获得大小约1500 bp的特异性目的条

带，与预期结果相符(图3)。



注:1: Marker 2000; 2-3:猪链球菌; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照

图3 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

2.5.2 16S rRNA 基因序列的同源性分析结果

将上述PCR产物进行纯化后送华大基因进行测序。利用BLAST，将测序得到的16S rRNA基因序列同GenBank数据库中的猪链球菌的16S rRNA序列进行同源性比较。结果与LC377187、KM972351同源高达99.3%，与其它猪链球菌16S rRNA序列同源性都高于92.5%以上(图4)。且遗传进化树与LC377187属于同一分枝，亲缘关系较近(图5)。因此，这次分离到的分离菌属于猪链球菌并命名为Ynanning SS。

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	█	94.5	93.7	99.7	99.7	99.7	99.7	94.1	98.6	98.3	97.6	1	AB071349.seq
	2	4.2	█	93.5	93.3	93.7	94.2	93.7	89.1	95.6	95.3	94.6	2	AB689682.seq
	3	4.6	5.4	█	93.0	92.9	92.3	92.9	89.1	95.3	94.5	94.0	3	AF009509.seq
	4	0.3	4.5	4.5	█	100.0	100.0	100.0	94.3	98.6	98.1	98.1	4	EU477176.seq
	5	0.3	4.3	4.5	0.0	█	100.0	100.0	94.3	98.6	98.2	97.7	5	JF813735.seq
	6	0.3	4.4	4.5	0.0	0.0	█	100.0	94.3	98.6	98.2	98.2	6	JX207111.seq
	7	0.3	4.3	4.5	0.0	0.0	0.0	█	94.3	98.6	98.2	97.7	7	KC511309.seq
	8	1.2	5.1	5.5	1.0	1.0	1.0	1.0	█	93.0	92.5	92.5	8	KF897510.seq
	9	1.0	3.8	3.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.9	█	99.3	99.3	9	KM972351.seq
	10	1.3	3.8	4.2	1.5	1.4	1.4	1.4	2.4	0.7	█	99.3	10	LC377187.seq
	11	1.3	3.8	4.4	1.5	1.6	1.4	1.6	2.4	0.7	0.0	█	11	YNannig ss.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图4 16S rRNA 基因序列同源性比对结果

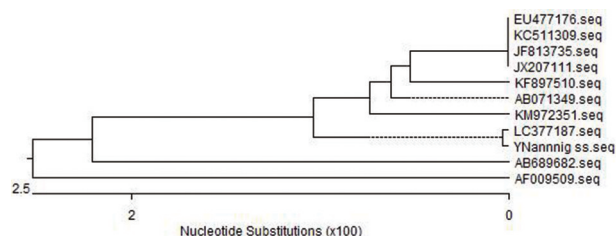
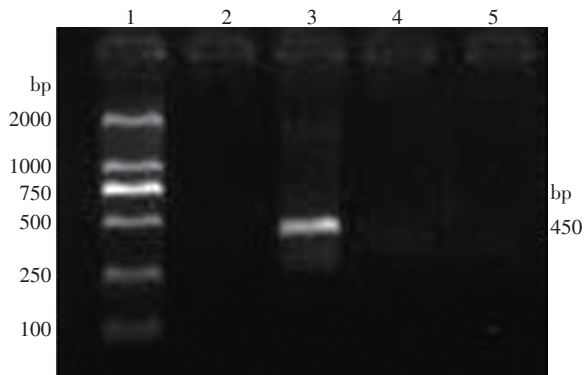


图5 16S rRNA 基因序列遗传进化树

2.5.3 血清型鉴定结果

将 Ynanning SS 分离菌株进行猪链球菌 CPS1、CPS2、CPS7、CPS9 基因扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定获得大小约 450 bp 的猪链球菌 CPS2 条带, 而没有扩增出猪链球菌 CPS1、CPS7、CPS9 基因片段(图 6)。表明该分离株属于 2 型猪链球菌。

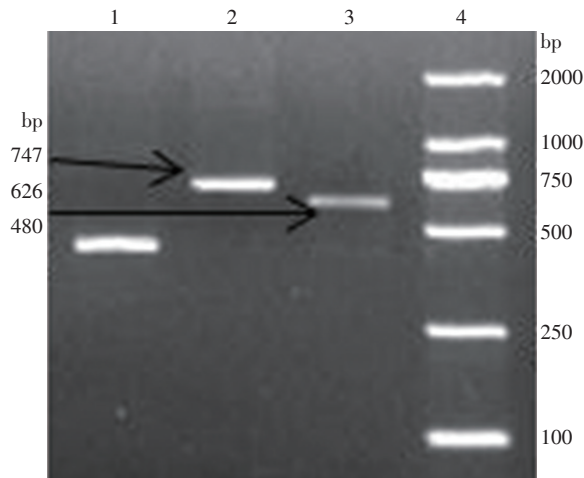


注: 1: Marker 2000; 2-5: 分离菌 1、2、7、9 血清型鉴定结果

图 6 猪链球菌血清型 PCR 扩增结果

2.5.4 毒力因子基因表型鉴定结果

将 Ynanning SS 分别进行 Epf、Mrp、Sly 毒力因子基因扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分别获得大小约 626 bp、747 bp、480 bp 的 Epf、Mrp、Sly 毒力因子基因(图 7)。表明 Ynanning SS 毒力因子基因表型含 Epf+Mrp+Sly+, 属于强毒力株。



注: 1-3: 分离菌毒力因子 Sly、Mrp、Epf 鉴定结果; 4: Marker 2000

图 7 毒力因子表型 PCR 扩增结果

2.6 药敏试验结果

14 种抗菌药物的药敏试验显示, Ynanning SS 分离菌株对庆大霉素、克林霉素、林可霉素、头孢唑林、头孢呋肟、头孢他啶、磺胺对甲氧嘧啶耐药, 对青霉素、环丙沙星中介, 对多西环素、头孢曲松、头孢噻肟、四环素、磺胺嘧啶敏感。

表 3 药敏试验结果

抗菌药物	药物含量/ μg	判定标准			抑菌直径/ mm	判定结果
		R	I	S		
青霉素	10	≤ 18	19-25	≥ 26	19	I
多西环素	30	≤ 12	13-15	≥ 16	20	S
环丙沙星	5	≤ 15	16-20	≥ 21	16.5	I
头孢曲松	30	≤ 13	14-20	≥ 21	23	S
庆大霉素	10	≤ 12	13-14	≥ 15	9	R
克林霉素	2	≤ 15	16-18	≥ 19	7.3	R
林可霉素	2	≤ 15	16-18	≥ 19	10.2	R
头孢唑林	30	≤ 14	15-17	≥ 18	10.4	R
头孢噻肟	30	≤ 14	15-22	≥ 23	23.6	S
头孢呋肟	30	≤ 14	15-22	≥ 23	11	R
头孢他啶	30	≤ 14	15-17	≥ 18	12	R
四环素	30	≤ 18	19-22	≥ 23	24	S
磺胺对甲氧嘧啶	250	≤ 12	13-16	≥ 17	9.3	R
磺胺嘧啶	250	≤ 12	13-16	≥ 17	19	S

注: R 代表耐药, I 代表中介, S 代表敏感

3 讨论

猪链球菌病由链球菌感染所引起, 几乎所有养猪的国家和地区都有本病的发生^[8]。由于不同地区流行的猪链球菌的血清型不同, 且流行菌株易出现血清型与毒力变异, 加之成年猪普遍存在带菌现象, 在临床上常与其它病原混合感染, 并表现为多种临床病型, 给临床诊断带来很大难度, 所以利用一种能快速检测出猪链球菌的方法尤为重要^[2]。相关实验结果表明利用 PCR 可在疫情中快速检测出猪链球菌, 且能对其致病因子 CPS、MRP、EF、SLY 进行鉴定和分型。其中 CPS 是分型的荚膜多糖, MRP 和 EF 是 II 型猪链球菌最重要的毒力因子, 菌株根据致病性差异一般可分为强毒力株(具有 MRP 和 EF)、弱毒力株(仅具有 MRP)和无毒力株(不具有 MRP 和 EF)^[9]。而本研究通过 PCR 鉴定出

致病菌株为2型猪链球菌(Ynanning SS), 且毒力因子基因表型为Epf+Mrp+Sly+, 属于强毒力株。

猪链球菌最初被划分为35个血清型, 每种血清型都含有较多序列类型, 不同的猪链球菌感染在基因序列、血清、临床症状、人畜共患性和流行潜力等方面具有特异性, 导致难以研发通用型疫苗防治不同类型的猪链球菌感染, 因此迫切需要选择敏感药物对其进行防治^[10-11]。目前, 临床上随着抗菌药物的普遍及不规范使用, 使得链球菌对药物的耐受作用日趋严重^[12]。张黎等对云南广南规模化猪场败血型链球菌药物敏感性研究中测定败血型链球菌对12种抗菌药物产生耐药性^[13]。邵靓等在四川地区分离到的猪链球菌16型菌株对青霉素、氨苄西林、头孢曲松、卡那霉素、环丙沙星、氯霉素敏感, 对四环素、庆大霉素耐药^[14]。雷宇平等在山西省分离到的猪链球菌对5种药物产生了耐药性^[15]。杨龙斌等在江淮地区分离到的猪链球菌2型, 对20种药物均表现出不同程度的耐药^[16]。本试验分离到的Ynanning SS也表现出对庆大霉素、克林霉素、林可霉素、头孢唑林、头孢呋肟、头孢他啶、磺胺对甲氧嘧啶耐药。不同地区的猪链球菌对药物的耐性也不相同, 其原因可能是养殖户滥用抗菌药物种类的差异。因此, 建议养猪场根据实际情况, 科学选择敏感的药物使用, 在使用过程中采取交替用药的方式, 避免产生耐药性。

4 小结

云南安宁某猪场导致猪发病的致病菌为2型猪链球菌, 毒力因子基因表型为Epf+Mrp+Sly+, 属于强毒力株。致病菌对多种药物都产生耐药性, 临床上一一定要科学合理用药。

参考文献:

- [1] 蔡田, 罗行炜, 徐引第, 等. 猪链球菌对大环内酯类抗生素的耐药性研究[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(1):73-81.
- [2] 魏恒. 猪链球菌病的病因及防控措施[J]. 陕西农业科学, 2019, 65(6):93-95.
- [3] 张纯瑶, 解倩倩, 宋子杰, 等. 猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(1):69-72.
- [4] 李丽, 黄良宗, 谢博, 等. 9型猪链球菌广东株的分离鉴定和基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(4):1016-1026.
- [5] 李秀丽, 董志民, 燕晓翠, 等. 猪链球菌2型感染昆明小鼠模型的建立及评价[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(3):840-848.
- [6] 陈中申, 马家乐, 张新锋, 等. 致仔猪脑膜炎猪链球菌的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(1):148-155.
- [7] 周玉照, 张小苗, 柴俊, 等. 云南猪关节炎细菌性病原的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2):499-506.
- [8] 林斌. 猪链球菌病的种类及防控措施[J]. 今日畜牧兽医, 2019:39.
- [9] 马婷婷. 2017年广西部分地区猪链球菌2、7、9型流行病学调查[D]. 硕士学位论文. 南宁:广西大学, 2018.
- [10] 董志民, 杨春蕾, 田向学, 等. 猪链球菌的分离鉴定及其致病性分子基础研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(2):96-100.
- [11] 瑯贾丽, 朱僧, 雷斯, 等. 猪链球菌2型毒力相关基因在分离株中的分布与突变研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(1):50-54.
- [12] VAN HOUT J, HEUVELINK A, GONGGRIJP M. Monitoring of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* in the Netherlands, 2013-2015[J]. Vet Microbiol, 2016, 194:5-10.
- [13] 张黎, 刘萍丹, 张艳朵, 等. 云南广南规模化猪场败血型链球菌药物敏感性研究[J]. 养殖与饲料, 2019(10):7-9.
- [14] 邵靓, 陈斌, 周莉媛, 等. 四川地区一株猪链球菌16型菌株的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(5):109-111.
- [15] 雷宇平, 王仲兵, 张仲萍, 等. 山西省猪链球菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(8):68.
- [16] 杨龙斌, 毛天骄, 吴华健, 等. 江淮地区猪链球菌和肠球菌分离株的鉴定、分型及药物敏感性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(2):131-137.

禽流感油乳剂灭活疫苗抗原质量快速评价方法

赖汉漳², 王小芬², 麦康聪², 盘伟岚², 陈培军², 陈华坚², 陈瑞爱^{1,2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 肇庆大华农生物制品有限公司, 农业部动物疫病防控生物技术与制品创制重点实验室, 广东省兽用生物制品技术研究与企业重点实验室, 广东 肇庆 526238)

摘要:本研究建立了基于肉豆蔻酸异丙酯作为破乳剂的一种禽流感油乳剂疫苗抗原快速检测方法, 该方法成本低且环境友好, 实验条件简易, 保真度高, 可在数小时内准确快速测定禽流感等油乳剂疫苗成品抗原HA效价及分析其抗原性差异。使用该方法能够方便广大养殖户从不同来源疫苗中有针对性地选择优质高效的疫苗, 并在使用疫苗前确定其抗原效价, 避免使用低效价疫苗, 确保预期防控效果, 同时也方便兽药监察部门对市场上各个厂家的禽流感油乳剂灭活疫苗的质量进行实时监测。

关键词:禽流感疫苗; 抗原质量; 评价方法

中图分类号:S852.65*7 文献标识码:A 文章编号:1005-8567(2022)04-0021-03

Rapid Evaluation Method for the Antigen Quality of Avian Influenza Oil Emulsion Inactivated Vaccine

LAI Hanzhang², WANG Xiaofen², PAN Weilan², CHEN Peijun², CHEN Huajian², XU Jiahua², CHEN Rui'ai^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642;

2. Guangdong Enterprise Key Laboratory of Biotechnology R&D of Veterinary Biologics, Key Laboratory of Biotechnology and Bioproducts Development for Animal Epidemic Prevention, Ministry of Agriculture, Zhaoqing Dahuanong Biological Medicine Co., Ltd., Zhaoqing Guangdong 526238)

Abstract: A rapid evaluation method for avian influenza oil emulsion vaccine antigen based on isopropyl myristate as a demulsifier was established, which is low cost and environmentally friendly, and the experimental conditions are simple. It can accurately and quickly determine the HA titer of finished oil emulsion vaccines such as avian influenza and analyse their antigenic differences within a few hours. The method can facilitate the selection of high quality and efficient vaccines from different sources and the determination of their antigenic potency before use, avoiding the use of low potency vaccines and ensuring the expected control effect.

Keywords: Avian influenza vaccine; Antigenic quality; Evaluation method

禽流感在全世界范围内的流行给养禽业带来严重打击, 同时也对公共卫生事业构成重大威胁。接种油乳剂灭活疫苗被证实是用于禽流感等疫情预防和控制的有效方法。但事实上, 近几年免疫监测的结果显示, 仍有不少免疫群体抗体合格率较低, 在一些免疫禽群体中仍可以分离到病

毒^[1]。究其主要原因, 可能是疫苗本身所含抗原效价不高, 或者是由于运输保存等条件的限制导致抗原衰减。此外, 流行毒株抗原性与疫苗株差异较大可能导致疫苗免疫保护效果不理想, 疫苗水相中卵黄含量过高也会导致疫苗吸收不良等副反应^[1]。因此, 灭活疫苗所含抗原质量的优劣直接影

收稿日期:2021-07-05

作者简介:赖汉漳(1981-), 男, 高级兽医师, 从事动物医学及生物制品研究。E-mail: 465725552@qq.com

*通讯作者:陈瑞爱(1970-), 女, 教授, 从事动物医学及生物制品研究。E-mail: chensa727@yahoo.com.cn

响了疫病防控效果和养殖成绩。

目前对禽流感油乳剂灭活疫苗质量的检测, 主要由生产厂家按照国家相关要求与规程进行质检。由于疫苗质量标准中规定效检必须免疫SPF鸡, 对动物与实验设施要求较高, 需要SPF动物房及专用隔离器, 且耗时长(21天以上)、资金花费大, 多数生产厂家只能进行抽检。多数养禽业疫苗用户无相关的检测能力, 只能通过对禽群免疫接种后的抗体检测情况和保护情况来衡量实际免疫效果。

本研究旨在针对上述问题, 建立一种禽流感油乳剂疫苗抗原快速检测方法, 其在简单的实验条件下即可进行, 保真度高, 无需将疫苗免疫SPF鸡, 可在数小时内准确快速测定禽流感等油乳剂疫苗成品抗原HA效价及分析其抗原性差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗抗原、抗体

H9亚型禽流感病毒DA株、YS株灭活后胚液抗原、H9亚型禽流感DA株、YS株阳性血清及检测抗原均由肇庆大华农生物制品有限公司农业部动物疫病防控生物技术与制品创制重点实验室提供, 4℃保存备用。

1.1.2 试剂

肉豆蔻酸异丙酯购自国药集团化学试剂有限公司, 司本、吐温、白油、pH 7.2、0.01 mol/L等渗磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液)、1%鸡红细胞悬液等均由肇庆大华农生物制品有限公司提供。

1.1.3 试验器材

游涡振荡器、离心机以及血凝微量反应板、离心管、可调加样器等试验耗材均由肇庆大华农生物制品有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 含不同HA价抗原水相的禽流感油乳剂灭活疫苗的制备

用H9亚型禽流感DA株检测抗原测定DA株灭活后胚液的HA效价, 分别用适量PBS缓冲液稀释到HA效价分别为 $9 \log_2$ 、 $8 \log_2$ 、 $7 \log_2$ 、 $6 \log_2$, 再分别将这些抗原按照H9亚型禽流感灭活疫苗试规程中的乳化配方工艺制备4组油乳剂疫苗^[2], 编号依次为1~4。

1.2.2 乳化前和破乳后抗原水相比较

室温环境下, 取步骤1.2.1中编号为1~4的疫苗各10 mL, 分别放入50 mL离心管中, 加入10 mL肉豆蔻酸异丙酯, 置于游涡振荡器剧烈振荡5 min以上, 以3500 r/min转速进行离心5 min, 观察水相析出情况。用注射器将针头从离心管底部刺入, 小心吸出适量析出的水相, 按照中华人民共和国国家标准(GB/T 18936-2020)所述血凝(HA)试验方法, 对4份水相进行HA效价检测^[3]。

1.2.3 疫苗破乳所得水相抗原用于测定阳性血清HI抗体价比较

取步骤1.2.2中测定HA价的破乳后水相抗原, 分别配制成的4 HAU的抗原, 按照中华人民共和国国家标准(GB/T 18936-2020)所述血凝抑制(HI)试验方法对同一批次的H9亚型禽流感DA株、YS株疫苗阳性血清进行HI测定^[3]。设H9亚型禽流感DA株、YS株检测抗原作为对照。

2 结果

2.1 乳化前和破乳后抗原水相比较

取1~4组的疫苗各10 mL, 加入10 mL肉豆蔻酸异丙酯, 置于游涡振荡器剧烈振荡5 min, 以3500 r/min转速进行离心5 min即可见各组出现明显的油、水分离, 析出到下层的水相均约为4 mL, 其外观均与对应乳化前的淡黄色胚液抗原水相一致。对上述破乳后析出的4份水相进行HA价检测(表1), 可见测得的疫苗破乳前后抗原水相HA效价完全一致。说明本方法处理不影响油乳剂疫苗中HA蛋白的血凝活性及其浓度, 保真度高, 可用于下一步对疫苗内抗原水相HA的直接测定。

2.2 疫苗破乳所得水相抗原用于测定阳性血清HI抗体效价比较

由表2可知, 将不同配方组DA株疫苗按本法破乳获得的水相分别制备4 HAU抗原, 测定不同株H9禽流感疫苗阳性血清的HI抗体效价结果均

表1 乳化前和破乳后抗原水相HA效价

疫苗组别	HA价	
	乳化前配制水相	破乳析出水相
DA株水相1疫苗	$9 \log_2$	$9 \log_2$
DA株水相2疫苗	$8 \log_2$	$8 \log_2$
DA株水相3疫苗	$7 \log_2$	$7 \log_2$
DA株水相4疫苗	$6 \log_2$	$6 \log_2$

与使用DA株检测抗原检测的结果一致,说明本方法处理不影响油乳剂疫苗水相中HA蛋白的抗原性,不干扰HI抗体与HA抗原的结合,可直接用于配制HI检测用4HAU抗原。

表2 疫苗破乳所得水相抗原用于测定H9禽流感阳性血清HI抗体效价

4HAU 抗原来源	抗体效价	
	DA株阳性血清HI 抗体效价	YS株阳性血清HI 抗体效价
DA株检测抗原	12 log ₂	9 log ₂
YS株检测抗原	9 log ₂	13 log ₂
DA株水相1疫苗	12 log ₂	9 log ₂
DA株水相2疫苗	12 log ₂	9 log ₂
DA株水相3疫苗	12 log ₂	9 log ₂
DA株水相4疫苗	12 log ₂	9 log ₂

已报道疫苗毒株DA株与YS株的HA基因核苷酸相似性仅为93.5%,且其序列在分子进化关系上分别属于H9禽流感病毒的不同谱系分支^[1]。由表2可知,两株毒的交叉HI价有3 log₂的差异,而禽流感免疫血清对与其免疫原抗原性一致的4HAU抗原HI效价最高。说明本法还可用于快速比较疫苗成品所含抗原与疫苗标准抗原或者流行毒株抗原性差异。

3 讨论

禽流感油乳剂灭活疫苗的生产过程是将灭活病毒抗原水相与白油等佐剂乳化制成稳定的油包水(W/O)油乳剂疫苗。只有疫苗中含有足够的血凝素抗原,才能保证其免疫后产生足够的抗体水平。此外,不同谱系毒株抗原性差异大,诱导的中和抗体通常难以有效交叉保护。免疫疫苗或感染病毒后的血清抗体只对相应谱系的抗原具有最高的HI滴度。以上这些特点为评价疫苗质量提供了重要的理论依据。

常用的反复冻融法虽能让油乳剂疫苗实现一定程度的破乳,但该法耗时长,破乳效率低;此外,笔者在实践中发现,有些配方的油苗反复冻融离心后,其水相中的成分仍然会被油膜包裹,导致析出的水相不再是淡黄色液体而是无色液体,保真度差,影响疫苗水相杂蛋白含量等评价。有报道用三氯甲烷作为破乳剂进行禽流感油乳剂灭活疫苗HA的效价检测^[4]。该方法存在以下弊端:①三氯甲烷可使蛋白质变性,损害HA蛋白抗原性,

影响HA效价的准确度;②三氯甲烷在光照下遇空气逐渐被氧化生成剧毒的光气,不易安全存放;③三氯甲烷作用于中枢神经系统,对心、肝、肾有损害,对人体具有致癌、致畸、致突变性;④三氯甲烷对环境有危害,对水体可造成污染。有发明专利利用有机溶剂苯甲醇、正戊醇、正己醇作为口蹄疫苗破乳剂,但这些有机溶剂也都存在有毒易燃、可使蛋白变性等影响HA效价直接测定的弊端^[5]。

相比之下,本研究选用的破乳剂肉豆蔻异丙酯本身为化妆品级表面活性剂,对人体和环境安全无毒害且价廉易取;破乳操作对仪器设备与试剂要求低,操作简单,保真度高(不改变水相性状、HA效价与抗原性);分离出的水相可以直接用于进行HA、HI效价测定,进而快速比较疫苗成品所含抗原与疫苗标准抗原或者流行毒株抗原性差异。本方法具有很强的推广性,特别适合于广大养殖企业用户从不同来源疫苗中有针对性地选择优质高效的疫苗,并在使用疫苗前确定其抗原效价,避免使用低效价疫苗,确保预期防控效果,同时也方便兽药监察部门对市场上各个厂家的禽流感油乳剂灭活疫苗质量进行实时监测。

4 结论

本研究建立了基于肉豆蔻酸异丙酯作为破乳剂的一种禽流感油乳剂疫苗抗原快速检测方法,该方法成本低且对环境友好,实验条件要求低,保真度高,可准确快速测定禽流感等油乳剂疫苗成品抗原HA效价及分析其抗原性差异。

参考文献:

- [1] CHEN R, LAI H, LI L, et al. Genetic variation and phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9 avian influenza viruses isolated in China during 2010-2012[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 165:312-318.
- [2] 中华人民共和国农业部. 禽流感(H9亚型)灭活疫苗(SS株)试行规程(中华人民共和国农业部公告第2220号)[Z]. 北京:中华人民共和国农业部, 2015.
- [3] GB/T 18936-2020, 高致病性禽流感诊断技术[S]. 北京:中华人民共和国农业部, 2020.
- [4] 司兴奎, 陈建红, 张济培, 等. 禽流感油乳剂佐剂疫苗质量快速检测方法的建立[J]. 中国家禽, 2007, 29(14):20.
- [5] 韩润林, 刘国英, 刘玉梅, 等. 一种口蹄疫油乳剂灭活疫苗的破乳方法[P]. 中国, CN201110177350.1, 2012-03-21.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.04.05

高温高湿诱发猪传染性胸膜肺炎和链球菌混合感染的诊断

徐民生^{1,2#}, 柯海意^{1,2#}, 杨冬霞², 臧莹安¹, 翟少伦², 蒙嘉佳², 张德泉^{3*}, 李春玲^{*}

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510305;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所/广东省畜禽疫病防治研究重点实验室/农业部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640;

3. 紫金县畜牧兽医水产技术推广中心, 广东 河源 517400)

摘要:为了确定广东省某规模化猪场病死猪的发病原因, 走访猪场的了解状况, 解剖并采集发病猪只的心脏、肺脏等病变组织进行实验室检测鉴定, 并对分离到的致病菌进行血清型鉴定和药敏试验分析。结果显示, 该猪场感染了猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)7型和猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)2型。其中夏季高温高湿的环境应激是细菌病的主要诱发因素, 并根据确诊结果和猪场整体环境情况提出相应的防治建议。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; 猪链球菌; 混合感染; 检测鉴定; 防治措施

中图分类号: S858.28 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)04-0024-06

Diagnosis of Mixed Infection of Porcine Infectious Pleural Pneumonia and Streptococcus Induced by High Temperature and Humidity

XU Minsheng^{1,2#}, KE Haiyi^{1,2#}, YANG Dongxia², ZANG Yingan¹, ZHAI Shaolun², MENG Jiajia²,

ZHANG Dequan^{3*}, LI Chunling^{2*}

(1. Zhongkai University of Agricultural Engineering, Guangzhou Guangdong 510305;

2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory of Animal and Poultry Epidemic Prevention and Control/Guangdong Science Observation and Laboratory Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture, Guangzhou Guangdong 510640;

3. Animal Husbandry and Veterinary Aquatic Technology Extension Center of Zijin County, Heyuan Guangdong 517400)

Abstract: In order to determine the etiology of dead pigs in a large-scale pig farm, the general situation of the pig farm was investigated in Guangdong Province. The diseased tissues such as heart and lung of the diseased pigs were dissected and collected for laboratory detection and identification. The isolated pathogenic bacteria were identified for

收稿日期: 2022-02-23

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021KJ119); 广州市重点研发项目(202206010192); 广东省动物疫病野外科学观测研究站项目(2021B1212050021); 广州市科技特派员项目(20212100027和20212100010); 广东省农业科学院学科建设新兴团队项目(202122TD)

#表示并列第一作者

作者简介: 徐民生(1995-), 男, 安徽舒城人, 硕士研究生, 主要从事畜禽疫病防控研究。E-mail: xms111417@163.com; 柯海意(1995-), 女, 广东茂名, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: 1056124851@qq.com

*通讯作者: 张德泉(1976-), 男, 广东紫金人, 兽医师, 主要研究方向为预防兽医学。E-mail: 592322858@qq.com; 李春玲(1965-), 女, 河南长葛人, 研究员, 主要研究方向为预防兽医学。E-mail: lclclare@163.com

serotypes and analyzed for drug sensitivity test. The results showed that the pig farm was infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) type 7 and *Streptococcus suis* (SS) type 2. In summer, the bacterial disease was mainly caused by the environmental stress with high temperature and humidity, and the corresponding prevention and control suggestions were put forward according to the diagnosis results and the overall environment of the pig farm.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Streptococcus suis*; Mixed infection; Detection and identification; Preventive measures

猪传染性胸膜肺炎是(Porcine contagious pleuropneumonia, PCP)由不同血清型的胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)引起的一种高度接触性的呼吸道传染病,是严重影响我国养猪业健康发展的重要呼吸道传染病之一^[1-2]。APP有15个血清型,我国目前已报道的APP流行血清型为1、2、3、4、5、7和10型,其中以1、3、7型为主且致病性最强^[3]。猪链球菌病是由多种不同群的链球菌(*Streptococcus suis*, SS)引起的不同临床类型传染病的总称^[4]。猪链球菌比较常见的血清型为1~10型,其中血清1型、2型、7型和9型的毒力较强^[5]。猪链球菌属于猪体内的常在菌之一,可原发或继发致病,是威胁养猪业的主要菌性病原之一。这两种病原都可引起猪体温升高、肺部病变等相似症状。混合感染后,猪只临床症状更加严重且与病毒性疾病难以区分,还需要依靠微生物学检测方法和分子生物学技术来鉴定。

广东省某规模化猪场出现了猪只体温升高、呼吸困难及咳嗽等症状,用常规药物治疗并无好转,发病严重猪只死亡。对3头发病猪只进行剖检采集了胸腔积液、肺脏和肝脏等组织病料,进行实验室相关病原的检测和鉴定,并对分离的病原菌株进行了血清型分型和药物敏感性实验,结合流行病学、临床症状及病理变化等方法,对病猪进行了诊断,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 发病情况调查

广东省某规模化养猪场是一家集约化程度较高的一家大型猪场,场内存栏母猪约5000余头,5月份开始该猪场保育后期及育肥猪群有些猪只出现体温升高、犬坐式呼吸及皮肤发红等临床症状,发病严重猪只甚至死亡,保育与育肥场内死亡率达到近10%,给该猪场造成严重的经济损失。发病初期该猪场曾用泰乐菌素等大环内酯类抗生素

板料及饮水内加药,但未见好转,经前期了解及排查,本场不存在非洲猪瘟感染,并正常接种了猪瘟、猪繁殖与呼吸道综合征和猪伪狂犬病等疫苗。

1.2 病理剖检与病料采集

对3头发病猪只(分别命名为1号、2号、3号)进行解剖,剖检过程中采集病变明显的肺脏、心脏、脾脏、肾脏、淋巴结和胸腔积液等病料并记录病理变化。

1.3 主要试剂

2×Taq PCR Master Mix、DNA Marker 2000购自宝生物工程(大连)有限公司;RNA逆转录酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;抗生素药敏片购自杭州天和生物试剂公司;TSA(胰蛋白大豆琼脂培养基)、TSB(胰蛋白大豆肉汤培养基)培养基、普通绵羊血平板购自广东环凯微生物科技有限公司;新生牛血清广州蕊特生物技术有限公司;NAD、病毒总核酸快速抽提试剂盒购自广州美基生物技术有限公司;Total RAN Kit试剂盒购自美国OMEGA有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.4 病毒病原学检测

1.4.1 病毒核酸提取

分别取3份病料中肺脏、脾脏、淋巴结等组织,剪成黄豆大小放于2 mL组织匀浆管中,加入磁珠和灭菌PBS,放入研磨仪中研磨破碎,12000 r/min离心2 min,取上清液,按照总DNA和RNA提取试剂盒说明书进行操作,再按照RNA反转录试剂盒说明书进行反转录。将DNA和转录产物cDNA于-20℃保存。

1.4.2 病毒核酸检测

病毒核酸检测引物信息见表1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系(总体积20 μL):模板2 μL,上下游引物各1 μL, Mix 10 μL, ddH₂O 6 μL。PCR反应程序:94℃预变

表1 病毒核酸检测引物信息

病原	基因名称	引物序列	片段大小/bp	退火温度/℃
猪圆环病毒2型(PCV 2)	Cap	F:5'-CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT-3'	703	57
		R:5'-TCGATCACACAGTCTCAGTAG-3'		
猪瘟病毒(CSFV)	E2	F:5'-CACAGCTCCAGAATCCCAGAAGTCATC-3'	372	60
		R:5'-TCGAATCAACCAATCGAGATAGGG-3'		
猪伪狂犬病毒(PRV)	gE	F:5'-ACGTCACGGTCATCAAGGA-3'	422	58
		R:5'-GGCGGGACATCAACAGG-3'		
猪繁殖与呼吸综合征(PRRSV)	ORF1	F:5'-ATGTTGTGCTTCCCGGAGTTG-3'	782	57
		R:5'-GGGAAGCCTCNTATTCAGTCTG-3'		

性5 min;94 ℃变性30 s,按照表1温度退火30 s,72 ℃延伸50 s,共35个循环;72 ℃终延伸10 min,16 ℃短暂保存。

1.5 细菌病原学检测

1.5.1 细菌的分离及纯化

无菌采集3份病死猪的组织病料,涂布接种到加有10%的新生牛血清和15 μg/mL NAD的TSA培养板及普通绵羊血平板上,37 ℃培养24~36 h,挑取疑似病原菌的单菌落进行纯化和扩大培养。

1.5.2 细菌的形态学观察

挑取疑似致病菌的单个菌落培养24~48 h后,判断其形态、颜色、大小、是否具有金属光泽等;再对其进行涂片和革兰氏染色,在显微镜下观察。

1.5.3 细菌病核酸检测

挑取疑似病原菌的单菌落接种于含有NAD的TSB培养基中进行纯化培养,根据细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取疑似菌液核酸,细菌核酸检测的引物信息见表2,由生工生物工程(广州)股份有限公司合成,PCR反应体系为:Premix r Taq 12.5 μL,10 μmol/L上、下游引物各0.5 μL,菌液核

酸1 μL,双蒸水补至25 μL。PCR反应程序为:95 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共35个循环;72 ℃延伸10 min。分别检测APP、SS的核酸。扩增后的产物用1%的琼脂糖凝胶电泳观察。

1.5.4 细菌分型

利用参考文献中APP的分型引物分别对实验中分离到的菌株进行PCR分型鉴定,根据猪链球菌不同血清型荚膜多糖Cps基因的特异性设计1、2、7、9型猪链球菌的分型引物,采用的引物信息如表3所示^[6-7]。

1.5.5 药敏试验

取经血清型鉴定后的致病菌,采用纸片扩散法进行药敏试验,将100 μL致病菌株的培养液均匀涂布于含有NAD的TSB平板表面,在室温下干燥5 min,用无菌镊子将20种猪场常用的药物纸片平贴于培养基表面,药敏片与培养皿边缘的距离保持在1.5 cm左右,每个药敏片距离保持在2 cm左右,然后放置在37 ℃下培养20~24 h后参照美国临床实验室标准化委员会提供的标准进行判断^[8]。

表2 细菌核酸检测引物信息

病原	基因名称	引物序列	片段大小/ bp	退火温 度/℃
APP	16sRNA	F:5'-TTATCCGAACCTTT GGTTTAGCC-3'	422	58
		R:5'-CATAATTTGATAAAA ACCATCCGTC-3'		
SS	16sRNA	F:5'-CAGTATTTACCGC ATGGTAGATAT-3'	294	58
		R:5'-GTAAGATACCGT CAAGTGAGAA-3'		

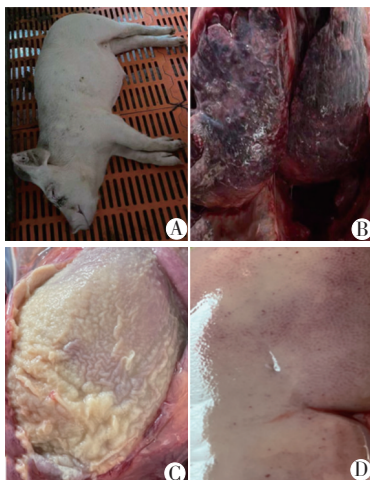
2 结果

2.1 病理剖检

保育后期猪只体型消瘦(图1A),根据死亡猪只的解剖可见:肺脏严重病变且有出血症状,呈间质性肺炎外观(图1B);胸膜表面有大量纤维性物质渗出,存在大量心包积液,且心脏呈典型“绒毛心”症状(图1C);腹腔内有大量积液,肠道间有黏连,脾脏、腹股沟淋巴结及肠系膜淋巴结均出现肿大;肾脏出有针尖状出血点(图1D)。

表3 细菌分型检测引物信息

病原	基因名称	引物序列	片段大小/ bp	退火温度/ °C
APP-1	Cps1	F:5'-GGGCAAGCCTCTGCTC GTAA-3'	754	62
		R:5'-GAAAGAACCAAGCTCC TGCAAT-3'		
APP-5	Cps5	F:5'-TTTATCACTATCACCGT CCACACCT-3'	1 100	62
		R:5'-CATTCGGGTCTTGTGG CTACTA-3'		
APP-7	Cps7	F:5'-GGTGACTGGCGTACGC CAAA-3'	396	62
		R:5'-GGGCTGCAGACTGAC GTAA-3'		
SS-1	Cps1	F:5'-GGCGTCTAGCAGATGC TCG-3'	441	56
		R:5'-GCCAACTGTTAGCAATG AC-3'		
SS-2	Cps2	F:5'-GTTGAGTCCTTATACAC CTGTT-3'	461	56
		R:5'-CAGAAAATTCATATTGT CCACC-3'		
SS-7	Cps7	F:5'-GAATCAATCCAGTCAGT GTTGG-3'	541	56
		R:5'-CTAATTCGATACGAAG CTAAAC-3'		
SS-9	Cps9	F:5'-GGCTACATATAATGGA AGCCC-3'	388	56
		R:5'-CCGAAGTATCTGGGCT ACTG-3'		

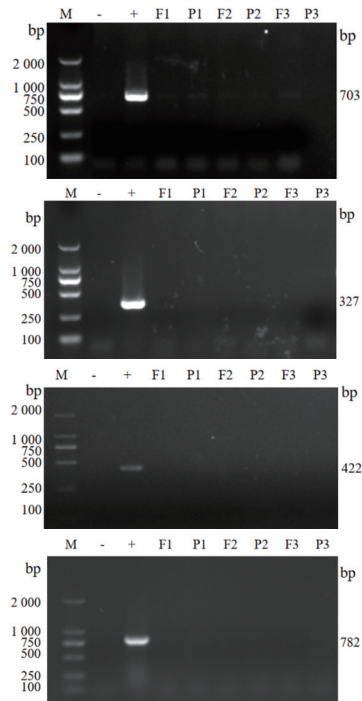


注:A:病猪外观;B:肺脏出血病变;C:浆液-纤维素性心包炎;D:肾脏肿大灰白有瘀点

图1 发病猪只的临床症状及剖检后的病理变化

2.2 病毒检测

由图2可知,在送检的组织病料中PCV2、CSFV、PRV及PRRSV均为阴性。



注:M:DL-2000 Marker;-:阴性对照;+:阳性;对照F1、P1:1号猪肺、脾;F2、P2:2号猪肺、脾;F3、P3:3号猪肺、脾

图2 病毒核酸检测结果

2.3 细菌检测

2.3.1 细菌分离、纯化及镜检

解剖后接种病死猪只的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结等病料于TSA平板(含NAD)和普通绵羊血平板上过夜培养后均有菌落生长聚集,观察其形态病挑取2株疑似病原菌的单个菌落进行纯化培养。从3号病料中的肾脏、淋巴结中分离的菌落呈针尖大小、灰白半透明、表面光滑、中间隆起且伴随 α 溶血状态(图3A、3B);挑取疑似菌落进行革兰氏染色、镜检,结果显示分离菌呈革兰氏染色阳性,以多个圆形或卵圆形构成的短链形式存在(图3C),初步判断为猪链球菌(SS)。另外从1号,2号发病猪只的肝脏,淋巴结中均有分离到呈针尖大小、半透明状、圆形光滑且边缘整齐的细菌(图3D),且接种病料的普通绵羊血平板上过夜培养后没有菌落生长(图3E),表明该菌株具有很强的NAD依赖性,同样挑取疑似菌落进行革兰氏染色并镜检(图

3F), 结果显示为革兰氏阴性球杆菌, 观察到呈单个、成双或链状的形态分布, 初步判断为猪传染性胸膜肺炎杆菌(APP)。

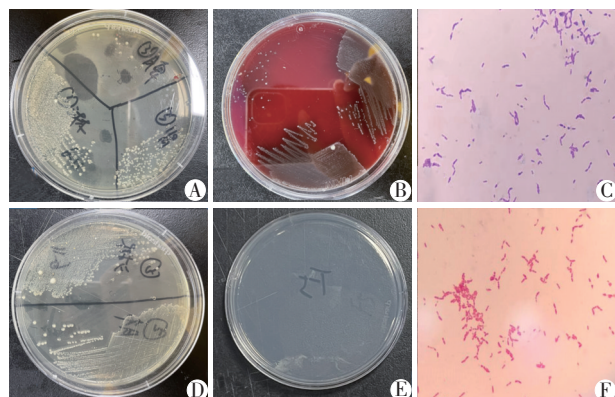


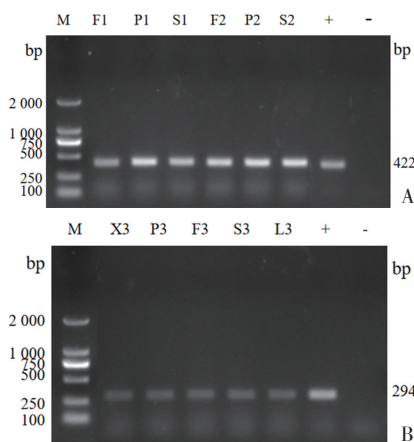
图3 病料细菌分离及镜检结果(1 000×)

2.3.2 细菌核酸检测

从1号、2号猪的肺脏、脾脏、肾脏中分离的菌落在412 bp处均出现特异性条带, 并于阳性对照相符, 见图4A, 检测到APP核酸; 从3号病料中的心脏、脾脏、肺脏、肾脏、淋巴结中分离的菌落在294 bp处出现特异性条带, 并于阳性对照相符, 说明检测到SS核酸, 见图4B。

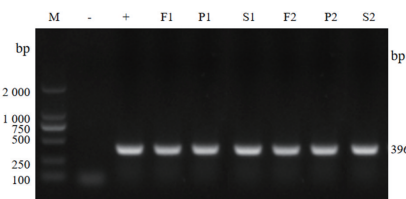
2.3.3 细菌分型

致病菌血清型的多重PCR鉴定结果显示: APP的血清型为7型(图5), SS的血清型为2型(图6)。



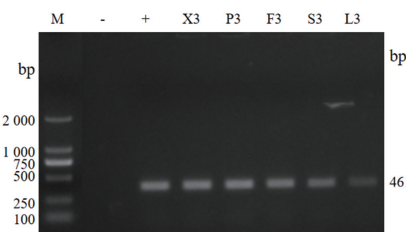
注: A: 1号、2号发病猪; B: 3号发病猪。M: DL-2000 Marker; F1、P1、S1: 1号猪肺、脾、肾; F2、P2、S2: 2号猪肺、脾、肾; X3、P3、F3、S3、L3: 3号猪心、脾、肺、肾、淋巴结; +: 阳性对照; -: 阴性对照

图4 发病猪分离菌株PCR鉴定结果



注: M: DL-2000 Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照; F1、P1、S1: 1号猪肺、脾、肾; F2、P2、S2: 2号猪肺、脾、肾

图5 APP菌株鉴定结果



注: M: DL-2000 Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照; X3、P3、F3、S3、L3: 3号猪心、脾、肺、肾、淋巴结

图6 培养的SS菌株鉴定结果

2.4 药敏试验

对病料中肺脏和脾脏中分离到的致病菌进行药敏试验, 结果(表4)显示, APP和SS对头孢氨苄、头孢噻肟和庆大霉素较为敏感, 而对阿莫西林等呈耐药。

3 讨论

经实地走访和了解, 该猪场由于母猪存栏数量的升高, 而栏舍的扩建设没有跟上, 导致部分保育舍和育肥舍栏舍不够, 猪只养殖的密度过大, 加之广东省夏季高温高湿天气环境条件下, 栏舍内的卫生状况较差, 容易诱发细菌滋生, 舍内刺激性气味较重, 通风不良易引发呼吸道疾病。另外广东5月份天气炎热且雨水较多, 猪只易受高温高湿的环境影响造成应激, 导致抵抗力下降。从检测的结果来看, 病毒性的疾病均为阴性, 分离的APP为7型, SS为2型, 均为强毒力株。经综合分析并推测, 由于猪只生存环境较差, 且高温高湿气候容易诱发病菌, 猪只在感染APP 7型的同时并发或继发SS 2型, 从而造成发病猪的高死亡率。

另外, 此次未在发病猪体内检测到PCV 2、CSFV、PRV及PRRSV等病毒核酸, 一方面可以部

表4 两种致病菌的药敏试验结果

抗生素	APP		SS	
	抑菌圈直径(mm)	耐药性	抑菌圈直径(mm)	耐药性
头孢氨苄	20	S	29	S
头孢噻吩	16	I	27	S
头孢唑啉	16	I	18	S
头孢拉定	16	I	31	S
头孢噻肟	32	S	33	S
头孢呋辛	9	R	22	I
恩诺沙星	17	R	23	S
诺氟沙星	11	R	18	I
氧氟沙星	13	R	19	I
阿莫西林	0	R	29	S
氨苄西林	0	R	32	S
复方磺胺	0	R	17	S
替米考星	0	R	0	R
泰乐菌素	8	R	12	R
泰万菌素	9	R	12	R
泰妙菌素	22	S	23	I
庆大霉素	16	S	15	S
林可霉素	17	I	25	I
强力霉素	15	I	14	I
氟苯尼考	12	R	25	S

注:S代表敏感;I代表中敏;R代表耐药

分说明该猪场对于病毒性疾病的防控措施切实有效,疫苗免疫程序合理;另一方面也说明一些较强毒力的细菌可原发致病,警戒我们在猪场疾病防控方面,不应忽视细菌病所带来的威胁。尤其是2020年饲料禁抗以后,对猪场细菌病的防控有了新的要求。近年来因抗生素的滥用,特别是此猪场在发病早期曾长期使用替米考星和泰乐菌素等药物,使得猪场内的致病菌对多数药物产生了耐药性。因此不应长期固定使用一种抗菌药物,容易导致细菌耐药性的产生。一旦猪群的抵抗力下降,爆发细菌传染病时,治疗难度加大,这也提示我们预防和治疗应合理交替用药,提高治愈率。

一般情况下,APP和SS在外界的存活能力低,常规的消毒药对其均具有良好的杀灭作用。但是在高温高湿的环境中,细菌表面有黏液性物质,其生存能力就会增强,所以广东长期的雨水和高温天气也是猪传染性胸膜肺炎和链球菌病两种病发生和流行的重要诱因^[9-10]。对猪传染性胸膜肺炎

和链球菌的临床治疗时应选用敏感药物控制细菌的继发感染。除了生物安全和定期环境消毒,猪舍要保持良好的通风和适宜的温度、湿度,养殖密度要科学合理,栋舍或者栏舍之间建立隔离区,对发病的猪只尽快隔离。同时坚持“养重于防,防重于治”的观念,借助实验室的优势资源,做好致病菌的分离鉴定及药物敏感试验,合理的接种疫苗和定期的抗体监测,可以大大加强防控效果,同时提高猪场的经济效益。

参考文献:

- [1] KASPERSEN H, URDAHL A M, GRONTVEDT C A, et al. Actinobacillus pleuropneumoniae eradication with enrofloxacin may lead to dissemination and long-term persistence of quinolone resistant Escherichia coli in pig herds [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(12):910.
- [2] JANINE T B, YANWEN L, MARCELO G, et al. A unique capsule locus in the newly designated Actinobacillus Pleuropneumoniae serovar 16 and development of a diagnostic PCR assay [J]. Journal of clinical microbiology, 2016, 55(3):902-903.
- [3] PEREIRA M F, ROSSI C C, SEIDE L E, et al. Antimicrobial resistance, biofilm formation and virulence reveal Actinobacillus pleuropneumoniae strains' pathogenicity complexity [J]. Research in Veterinary Science, 2018, 118:498-501.
- [4] WANG X M, SUN J J, BIAN C, et al. The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of Streptococcus suis cps31 [J]. Veterinary Microbiology, 2021(259):109-149.
- [5] 王海燕.猪链球菌病及其疫苗研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 34(6): 249.
- [6] ANGEN O, AHRENS P, JESSING S G. Development of a multiplex PCR test for identification of Actinobacillus pleuropneumoniae serovars 1, 7 and 12 [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 132(3-4): 312-318.
- [7] JESSING S G, ANGEN O, INZANA T J. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 2, 5 and 6 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9):4095-4100.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals-Second Edition; VET01. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.
- [9] 徐民生,柯海意,施科达,等.广东省猪传染性胸膜肺炎放线杆菌分离鉴定及耐药表型和耐药基因检测与分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2022(8):3212-3225.
- [10] 姜林林,宋帅,蔡汝健,等.一例猪传染性胸膜肺炎的诊断及防治 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2020, 45(6):26-29.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.04.06

犬口腔微生物研究进展

林琳, 龚丽微, 白志涛, 刘逸雷, 宋晨, 唐陆平, 刘玉清*, 李英
(佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东 佛山 528000)

摘要:近年来, 宠物犬的口腔健康已引起了宠物主人越来越多的关注。口腔健康不仅影响犬的美观以及进食, 而且影响全身健康。与肠道相似, 犬口腔中寄居着一个数量庞大、种类繁多的微生物群落。各种微生物群落在口腔不同部位保持动态平衡, 构成了复杂的口腔微生态系统, 口腔微生物群落的平衡或失调状况与犬的口腔健康和疾病密切相关。本文从犬口腔微生物组成、影响口腔微生物组成的因素以及犬口腔微生物与口腔疾病的关系等方面进行综述, 旨在促进对犬口腔微生物之间以及微生物与口腔环境之间复杂而紧密关系的理解, 并为犬口腔疾病诊断和防治提供重要理论基础。

关键词: 微生物群落; 口腔微生物失调; 口腔健康与疾病; 犬

中图分类号: S858.292 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)04-0030-06

Research Progress on the Oral Microbiota of Dogs

LIN Lin, GONG Liwei, BAI Zhitao, LIU Yilei, SONG Chen, TANG Luping, LIU Yuqing*, LI Ying
(College of Life Sciences and Engineering, Foshan University, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: The oral health of dogs has increasingly raised interest in recent years. The oral health not only influences dog's pleasing appearance and taking food, but also plays important roles in the general health. Similar to the intestine tracts, the oral cavities harbor complex assemblages of microorganisms in dogs. Various microbial communities maintain dynamic balance in different sites of the oral cavity, and constitute a complex oral micro-ecosystem, the balance or imbalance of oral microbial community is closely related to the oral health and disease of dogs. This article summarizes the recent progress in the research of oral microbiota in dogs, including composition and distribution of oral microbes, the factors influencing the oral microbiota assemble, and relationship between oral microbiota and canine oral diseases, this article aim to promote the understanding of the complex and close relationship between canine oral microbes and between microbiota and oral environment, and also to provide an important theoretical basis for the diagnosis and prevention of oral diseases of dogs.

Keywords: Microbial communities; Oral microbiome dysbiosis; Oral health and disease; Dogs

与人类一样, 作为犬消化道的起始部位, 口腔中寄居着大量的微生物, 以生物膜形式组成复杂的微生物群落, 定植于口腔的不同部位。口腔微生物群落主要以细菌为主, 也包含真菌、病毒、原核生物(古菌)等其它微生物体。各种微生物群落

在口腔不同部位保持动态平衡, 构成了复杂的口腔微生态系统。

口腔微生物参与口腔的正常代谢, 刺激机体的免疫反应, 增加机体抗病的免疫能力, 维护宿主口腔健康^[1]。众多研究表明, 犬口腔疾病(如牙周

收稿日期: 2021-11-01

作者简介: 林琳(1995-), 女, 河南邓州人, 硕士研究生, 主要从事小动物疾病防控研究。E-mail: 2669193174@qq.com

*通讯作者: 刘玉清(1969-), 男, 副教授, 研究方向营养代谢病与小动物疾病防控。E-mail: liuyq_0001@163.com

炎、牙龈炎及口臭等)的发生与口腔微生物组成改变有关^[2-3]。并且,作为最普通的伴侣动物,犬与主人间的密切身体的接触(如表示亲近的嗅闻、舔舐行为),引发了人们对犬口腔微生物(潜在的人畜共患病原菌和牙周致病菌)传播给人的担忧,成为一个重要公共卫生问题^[4]。可见,犬口腔微生物不仅与犬口腔健康有关,而且可能与人类的健康有关。因此,对犬口腔微生物结构组成的相关研究具有积极意义。

口腔微生物是继肠道微生物之后微生物组学的又一大研究热点。关于犬口腔微生物的研究,始于传统的微生物培养技术。已有基于传统培养技术的犬口腔微生物研究报道^[5]。由于传统微生物培养技术限制,只能鉴定少数易于分离培养的微生物,犬口腔内大多数微生物无法分离培养,尤其是犬口腔内大量存在的苛养微生物。

近年来,不依赖于传统培养技术的微生物测序技术取得了突破性进展,以 Roche454、Illumina Solexa 为代表的2代高通量测序技术以及 Pacbio 第三代单分子测序技术已发展成为当前宏基因组学研究的主流技术,这些微生物研究的新技术显著提升了新物种发现和微生物变异检测的能力,成为了解微生物群落与宿主之间相互作用的强大工具,为犬口腔微生物组学研究提供了大量的有用信息^[3, 6]。

本文从犬口腔微生物的分布组成特点、犬口腔微生物组成的影响因素以及口腔微生物与犬口腔疾病的关系方面综述了近年来国内外研究取得的进展。

1 犬口腔微生物组成

1.1 犬口腔微生物整体组成

1.1.1 犬口腔细菌组成

据报道,目前在种的水平,口腔发现超过350多种细菌,许多细菌在健康的犬口腔中的检出率和丰度都很低,其中几十种常见的细菌构成了犬口腔微生物的大部分^[3]。

多项研究表明,在门水平上犬口腔微生物组成主要由14个不同门的细菌所组成。其中,厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、梭杆

菌门(Fusobacteria)、螺旋体菌门(Spirochaetes)是最常在口腔中被检测到的细菌类型,且丰度在整个口腔菌群占优势地位。可以在口腔中检测到、丰度较低的菌门有互养菌门(Synergistes)、绿菌门(Chlorobi)、绿弯菌门(Chloroflexi)、SR1、TM7。此外,口腔中还偶尔能够检测到无壁菌门(Tenericutes)、WPS-2及GN02的存在^[6-10]。

犬口腔内普遍存在的细菌属类包括:卟啉菌属(*Porphyromonas*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)及巴氏杆菌科(Pasteurellaceae)和奈瑟菌科(Neisseriaceae families)菌种,且不同的研究结果存在一定差异^[9-13]。

由上可知,关于犬口腔微生物的多项研究中,研究结果并不完全一致。其原因可能与动物本身差异、动物饲养(饮水、日粮结构)、口腔护理、采样方法、样本加工处理过程(不同DNA萃取技术)、微生物分析方法等实验步骤某些环节不同造成检测结果差异所致。较早的研究通过PCR和凝胶电泳技术,而最近的研究采用了新一代高通量测序技术,所得结果更精确^[14-15]。

1.1.2 犬口腔其它微生物组成

(1)真菌

Santin R等研究了犬口腔真菌组成,结果为59只犬中30只犬分离得到真菌(分离率50.85%)^[16]。共分离得到61个真菌分离物,分别属于5个属:马拉色菌属(*Malassezia*)、念珠菌属(*Candida*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和隐球菌属(*Cryptococcus*)。共鉴定得到11种真菌类,厚皮病马拉色菌(*Malassezia pachydermatis*)、红酵母(*Rhodotorula spp*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、链状念珠菌(*C. catenulata*)、无名假丝酵母(*C. famata*)、吉利蒙氏念珠菌(*C. guilliermondii*)、近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)、中间假丝酵母(*C. intermedia*)、阿萨希丝孢酵母(*Trichosporon asahii*)、粘性丝孢酵母(*T. mucoides*)和白色隐球菌(*Cryptococcus albidus*);犬口腔内分离率最高的真菌是厚皮病马拉色菌。结果提示,真菌是犬口腔不同区域微生物组成部分。

(2)古细菌

人类口腔唾液中还含有一部分古细菌,目前

只有3种可以进行培养,分别是口腔甲烷短杆菌、史氏甲烷短杆菌、斯氏甲烷短杆菌。已有研究发现,口腔甲烷杆菌(*Methanobrevibacter oralis*)丰度增加与人类牙周病严重程度相关^[17]。之前关于犬口腔微生物组成的研究中未报道古菌的存在,而Radeerom等运用高通量测序技术进行犬猫牙结石内微生物组成的研究中首次报道了古菌群存在,犬牙结石内最优势古菌门类是广古菌门(phylum Euryarchaeota),优势属类是产甲烷短杆菌(*genus Methanobrevibacter*)^[18]。Oba等(2021)运用高通量测序技术于健康成年比格犬口腔中也检测到古菌,并且发现唾液(SAL)和龈下菌斑(SUB)样本中广古菌门相对丰度较龈上菌斑(SUP)高^[19]。

(3)其它微生物

目前,尚未有关于犬口腔病毒组成的系统研究报道。

1.2 犬口腔不同部位微生物组成

对犬口腔微生物的研究表明,犬口腔内不同区域也存在不同的微生物多样改变。Ruparell等基于细菌16S rRNA基因V3-V4区,运用Illumina MiSeq高通量测序技术对14只拉布拉多犬口腔内不同生态位(niches)(龈上菌斑、刺激性唾液、颊部和舌背部粘膜)微生物组成进行分析研究^[20]。结果发现,与口腔其它生态位比,龈上菌斑内微生物菌群多样性最高,并且在单个分类群存在最大量的显著差异。唾液内微生物组成在不同犬个体间的差异最高,并且菌群多样性最低,有最少微生物种类,舌背和颊侧微生物种类丰度介于两者之间。总体上,颊部和舌背粘膜的菌群组成相似度最高。结果提示,犬口腔内细菌谱存在三个独立的生态位:软组织表面、硬组织表面(龈上菌斑)和唾液。通过每个生态位微生物组成的鲜明特征来辨别生态位的能力为每个生态位内作为诊断用途的潜在微生物生物标志物的鉴别提供了可能。

运用高通量测序技术对26只健康成年比格犬唾液(SAL)、龈下菌斑(SUB)和龈上菌斑(SUP)三个不同口腔区域微生物组成的分析结果表明,犬唾液、龈下菌斑和龈上菌斑生境存在差异,口腔不同生境对犬口腔细菌门类和属类均有显著影响。唾液中细菌种类最丰富,其次龈下菌斑,龈上菌斑细菌种类最低,唾液和龈上菌斑中微生物组成差

异最明显^[19]。

这一研究结果与先前关于犬SUP和口腔棉拭子研究结果相一致,也与人类口腔不同区域中SUP和SAL样本微生物多样性参数最高的研究结果相似^[19,21]。

但与Ruparell等口腔其它区域相比,SUP样本的Shannon多样性指数更大,唾液微生物多样性最低研究结果不一致,这可能由于唾液采集前的刺激,造成唾液增加而使唾液微生物稀释所致^[20]。该研究中,唾液采集过程未进行刺激,因此唾液样本未被稀释。

2 犬口腔微生物组成的影响因素

研究表明,犬口腔微生物的组成随食物结构、口腔环境(温度、pH值等)、健康状况、年龄、体型大小变化等而发生改变,也可能与犬遗传因素及口腔卫生状况有关^[6]。

2.1 日粮结构

张宁宁等对16只食用商品犬粮(干粮)、12只食用商品犬粮+自家饭的犬和16只食用自家饭的犬的口腔微生物构成进行了研究^[22]。高蛋白、高脂肪、低碳水化合物和多肉类的食物可以导致犬口腔正常菌群比例的改变,特别是厌氧菌菌群失调,主要涉及的菌种为消化球菌和梭杆菌。相比实验中商品犬粮组的犬而言,长期食用自家饭的犬容易发生口腔菌群失调,而导致口腔疾病的发生,不利于犬的健康。但犬口腔的正常菌群的种类未发生明显变化。另外一项对集中饲养和饲喂不同日粮的犬口腔微生物分析结果发现,仅有不同年龄和不同品种的犬口腔微生物组成存在差异^[9]。Bell等研究发现,饲喂不同日粮蛋白前后,犬口腔微生物生态系统仍保持稳定^[12]。这一发现与人类口服抗生素后尽管肠道微生物发生明显变化,但口腔微生物谱稳定的研究结果相似。

以上研究结果提示,饲喂不同结构的日粮可能影响犬口腔微生物比例,但犬口腔核心微生物种类仍保持稳定。

2.2 pH

口腔的微生物组成受到口腔环境pH值的影响。大部分口腔微生物不适合在极端的酸性或碱性环境生长,需要在接近中性的条件下才能达到

最佳生长条件。研究表明,碱性的pH条件更适合许多牙周致病菌(如牙龈卟啉菌等)的生长。

唾液在口腔中的循环流动,可以对口腔表面的pH值进行调节。此外,年龄和食物结构变化也会对口腔pH值产生影响。唾液pH在犬和人类不同,犬唾液呈偏碱性(pH 8.5~8.65),而人类则偏中性(pH 6.5~7.5)。研究发现,人类和犬口腔微生物组成相似性较低,推测可能与两者间的口腔环境(唾液pH值等)存在生理学上的差异有关,导致犬口腔细菌难以在人类的口腔环境存活^[23]。

2.3 健康状况、年龄及体型

Wallis等对不同健康状况和年龄犬龈下菌斑微生物组成的研究发现,健康状况和年龄对龈下菌斑微生物组成的影响显示出明显的相似性,即随着年龄增加和牙龈炎的发展,犬口腔内龈下菌斑的微生物组成发生了明显改变^[13]。年轻犬和无牙龈炎犬龈下菌斑中拟杆菌门和变形菌门占优势,而老龄犬和中度牙龈炎犬龈下菌斑中厚壁菌门占优势。研究还发现,小型犬龈下菌斑微生物与中大型犬显著不同,厚壁菌门为优势菌门。

同时,研究者也探索了不同体型大小的犬口腔微生物的组成变化特征。结果发现,小型犬口腔菌斑菌群明显不同于中大型犬。与中大型犬相比,小型犬龈下菌斑包含更高水平的厚壁菌门类细菌,这些细菌成员包括韦荣球菌科(Erysipelotrichaceae)和梭菌目(Clostridiales)。此类细菌也与中度牙龈炎有关,并且小型犬龈下菌斑中与健康牙龈有关的许多属于变形菌门的细菌种类比例显著降低。这一研究发现也许能解释小型犬牙周炎发病率明显高于大型犬事实。此外,也有研究发现,犬不同个体间口腔微生物组成也存在差异^[12]。犬口腔内微生物组成是否具有品种特异性的特征,需要进一步研究证实。

2.4 地理位置

Wallis等运用454-焦磷酸测序技术对来自不同国家(英国、美国、中国和泰国)的587只犬龈下菌斑微生物组成进行了研究,探讨了不同地理位置与犬口腔微生物间的关系^[13]。结果发现,来自不同国家犬群龈下菌斑拥有相似的微生物组成,尽管其中有某些特定的菌类的丰度在不同国家间存在显著差异。然而,最重要的是,在不同地理位置

下,与犬健康、牙龈炎及牙周炎相关的细菌类群没有显著差异。这一结果提示,菌斑内细菌种类可能用于界定牙周病犬,而不受犬饲养地理位置的影响,有利于改进犬牙周病的检测效率。这与在人类的口腔微生物组成没有明显的环境(地理位置)差异的研究结果相一致^[24]。

2.5 口腔微生境

研究发现,不同的口腔部位(如唾液、龈上菌斑、龈下菌斑等)具有其特有的理化特性和生理条件(氧张力、pH和口腔粘膜表面特性),为不同微生物的黏附定植以及后续的生长增殖提供了条件^[15]。因此,每个口腔部位可能定植着各自不同的微生物群落。与此同时,不同口腔部位的菌群也时刻互相影响^[19, 25]。即使在一个口腔位点内,不同的环境条件也会产生不同的微生境,从而造成微生物的差异。牙冠上的氧气很丰富,但龈沟中的牙面处于缺氧环境中,浸泡在龈沟液中,龈沟液是一种从牙龈组织中渗出的富含蛋白质的物质。舌背表面有多重乳头,增加了微生物的多样性。口腔提供了一个结构复杂的环境,具有一系列不同的微生境^[26]。

3 口腔微生物与口腔疾病

近期的研究结果显示,口腔微生物群落改变是导致口腔多种疾病(口臭和牙周病等)的关键因素之一^[27]。

3.1 口腔微生物与犬牙周病

牙周病是犬常见的口腔疾病。据报道,犬牙周炎和牙龈炎发病率范围分别为50%~70%、95%~100%,发病率随年龄的增大而增高。高达80%犬在2岁龄时已经患有某种程度的牙周病,小型犬更易发生牙周病。牙龈炎能医治,而牙周炎则会导致牙周组织的稳定损害,这种损害对宠物来说常常是痛苦的。犬牙周病造成牙齿疼痛、咀嚼困难,从而严重影响犬的生活质量。如果得不到及时的治疗,结缔组织的附着丧失和牙槽骨吸收会使牙齿产生松动,并最终导致牙齿脱落^[28-29]。

研究发现,犬口腔疾病(尤其是牙周病)与口腔微生物比例失衡密切相关。当严重牙龈炎和轻度牙周炎时,属于厚壁菌门的细菌属类(产线菌属(*Filifactor*),梭菌目(Clostridiales)及韦荣球菌科

(*Erysipelotrichaceae*) 和消化链球菌科 (*Peptostreptococcaceae*) 相对丰度增加^[13]。放线菌属 (*Actinomyces*)、卟啉菌属 (*Porphyromonas*) 和梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 是犬口腔内最优势的细菌属类, 属于在犬口腔内后期定植的厌氧微生物群, 具有蛋白水解活性这一牙周病原菌的生物学特性。梭杆菌属亚种常能导致犬牙周炎, 消化链球菌科是牙周炎的病原体。卟啉单胞菌包括 *Porphyromonas gulae* 和 *Porphyromonas gingivicanis*, *Porphyromonas gulae* 是犬牙周炎的主要病原菌, 类似于人类的牙周主要病原菌牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)^[23]。

与牙龈炎和牙周炎患犬比, 健康犬更年轻化, 有更高比例的需氧菌; 相比健康犬和牙龈炎犬, 牙周炎患犬口腔内有更高比例的厌氧菌, 但健康犬比轻度牙周炎犬有更多兼性厌氧菌种类。革兰氏阴性厌氧活动的杆状和丝状菌是严重牙周病犬口腔优势菌种类^[8]。Oba 等研究也发现, 犬牙菌斑内的放线菌属 (*Actinomyces*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、二氧化碳噬纤维菌属 (*Capnocytophaga*)、纤毛菌属 (*Leptotrichia*) 和奈瑟菌属 (*Neisseria*) 与更高的口腔健康 (健康恶化) 评分相关^[19]。Wallis 等对犬龈下菌斑样本中微生物组成分析发现, 随着牙周炎的发展, 需氧革兰氏阴性菌群数量成比例下降, 牙菌斑菌群组成保持相对稳定, 而菌群各类细菌成员比例发生改变^[30]。结果提示, 犬牙周炎的发生是因口腔内微生物菌群发生演替, 特别是与口腔健康相关的优势菌群丰度降低所致, 强调了口腔微生物比例失衡在犬牙周病发生中的重要性。

3.2 口腔微生物与犬口臭

口臭来源于口腔内的一些挥发性物质, 其中最主要的一类是挥发性硫化物 (Volatile sulphur compounds, VSCs), 包括硫化氢 (H_2S)、甲硫醇 (CH_3SH) 和二甲硫醇 ($(CH_3)_2S$, CH_3SCH_3) 等。口腔中存在大量能够释放 VSCs 的细菌 (如牙龈卟啉单胞菌和舌乳头间隙内的微生物), 此类细菌通过产生大量 H_2S 等致口臭的化物质, 是产生口臭的独特原因。研究发现, 口臭在成年犬普遍存在, 牙龈炎和牙周炎是引起犬口臭的最主要的致病因素。牙周病患犬常伴有牙石、牙菌斑, 细菌对其进

行发酵产生口腔异味。VSCs 水平与牙周病存在正相关, 口臭可能是犬严重牙周疾病开始的唯一症状, 并且具有年龄依赖性^[29, 31]。对犬口腔真菌组成研究发现, 患口臭犬的口腔真菌分离率显著高于无口臭犬。这一结果提示, 真菌可能是诱发犬口臭的一大原因^[16]。

4 展望

随着高通量技术不断发展和改进, 促进了人们对犬口腔微生物的认识。目前, 对人类口腔微生物组成已进行了大量深入而透彻的研究, 取得了重要的进展, 而有关犬口腔微生物研究相对较少, 并且目前犬口腔微生物的研究主要聚焦于口腔菌群和口腔微生物组学研究, 犬口腔其它微生物的研究报道较为少见。研究中犬口腔样本数目普遍偏少, 研究方法多数基于普通 PCR 技术或二代测序技术, 对犬口腔微生物的认识多数停留在属的水平, 无法精确到种的水平, 不能真正了解犬口腔内微生物种类。今后需要采用更先进微生物分析技术 (如 Pacbio 第三代单分子测序技术) 从种的水平来研究犬口腔微生物组成, 加强对犬口腔其它微生物 (如古细菌、病毒及真菌) 的研究, 同时加大样本采集量, 选用不同品种的犬, 使研究结果更具代表性, 从而能更全面而准确地反映犬口腔微生物的组成, 为促进犬口腔和全身健康提供理论基础。

参考文献:

- [1] LU M, XUAN S, WANG Z. Oral microbiota: A new view of body health[J]. Food Science Human Wellness, 2019, 8(1):8-15.
- [2] 祁晶, 夏兆飞. 犬的口腔健康与营养[J]. 药学研究, 2015, 34(6):272-273.
- [3] PEREIRA A M, CLEMENTE A. Dogs' microbiome from tip to Toe[J]. Topics in Companion Animal Medicine, 2021, 100584.
- [4] PEREZ-SERRANO R M, DOMINGUEZ-PEREZ R A, AYALA-HERRERA J L, et al. Dental plaque microbiota of pet owners and their dogs as a shared source and reservoir of antimicrobial resistance genes [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 21: 285-290.
- [5] ELLIOTT D R, WILSON M, BUCKLEY C M, et al. Cultivable oral microbiota of domestic dogs [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(11):5470-476.
- [6] 韩磊, 周常喜, 赵一帆, 等. 宠物犬牙菌斑的微生物菌群结构分析[J]. 北京农学院学报, 2020, 35(4):73-76.

- [7] DEWHIRST F E, KLEIN E A, THOMPSON E C, et al. The canine oral microbiome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e36067.
- [8] DAVIS E M, DVM DIPL A V D C. Gene Sequence Analyses of the Healthy Oral Microbiome in Humans and Companion Animals: A Comparative Review [J]. *Journal of Veterinary Dentistry*, 2016, 33(2):97-107.
- [9] ISAIAH A, HOFFMANN A R, KELLEY R, et al. Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0184899.
- [10] RUPARELL A, WARREN M, STAUNTON R, et al. Effect of feeding a daily oral care chew on the composition of plaque microbiota in dogs [J]. *Reserach in Veterinary Science*, 2020, 132:133-141.
- [11] STURFEON A, STULL J W, COSTA M C, et al. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2):891-898.
- [12] BELL S E, NASH A K, ZANGHI B M, et al. An assessment of the stability of the canine oral microbiota after probiotic administration in healthy dogs over time [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7:616.
- [13] WALLIS C, MILELLA L, COLYER A, et al. 2021. Subgingival microbiota of dogs with healthy gingiva or early periodontal disease from different geographical locations [J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1):1-19.
- [14] TENG F, NAIR S, ZHU P, et al. Impact of DNA extraction method and targeted 16S -rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling[J]. *Natural Scientific Reports*, 2018, 8(1):16321.
- [15] FLANCMAN R, SINGH A, WEESE J S. Evaluation of the impact of dental prophylaxis on the oral microbiota of dogs [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6):e0199676.
- [16] SANTIN R, MATTEI A S, WALLER S B, et al. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(1):139-143.
- [17] WYLIE K M, MIHINDUKUIASURIYA K A, ZHOU Y, et al. Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults[J]. *BMC Biology*, 2014, 12(1):71-78.
- [18] RADEEROM T, THONGKORN K, BUDDHACHAT K, et al. Investigation of the Calculus Microbiome in Canines and Felines Using Next - Generation Sequencing [J]. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 2018, 24(4):589-598.
- [19] OBA P M, MEREDITH Q, CAEEOLL M Q, et al. Microbiota populations in supragingival plaque, subgingival plaque, and saliva habitats of adult dogs [J]. *Animal Microbiome*, 2021, 3(1):38.
- [20] RUPARELL A, INUI T, STAUNTON R, et al. The canine oral microbiome: variation in bacterial populations across different niches[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1):42.
- [21] YU G, PHILLIPS S, GAIL M H, et al. Evaluation of buccal cell samples for studies of oral microbiota [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2017, 26(2):249-253.
- [22] 张宁宁, 薛占永, 刘伟, 等. 不同日粮成分对犬口腔微生态的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(11):64-65.
- [23] OH C, LEE K, CHEONG Y, et al. Comparison of the Oral microbiomes of canines and their owners using next-generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0131468.
- [24] LI J, QUINQUE D, HORZ H P, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany and Africa [J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1):316.
- [25] LAMNT R J, KOO H, HAJISHENGALLIS G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(12):745 - 759.
- [26] MARK WELCH J L, RAMIEZ-PUEBLA S T, BORISY G G. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche [J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(2):160-168.
- [27] ZHAN Y H, WANG X, LI H X, et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2018, 99(1):883-893.
- [28] WALLIS C, HOLCOMBE L J. A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs [J]. *Journal of Small Animal Practice*. 2020, 61(9):529-540.
- [29] MAKINEN V M, MAYRA A, MNUUKKA E. Improving the health of teeth in cats and dogs with live probiotic bacteria [J]. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences Applications*, 2019, 9(4):275-283.
- [30] WALLIS C, MARSHALL M, COLYER A, et al. A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181(3-4):271-282.
- [31] IWASHITA N, SUGITA K, MURATA S, et al. Age-dependent aggravation of oral malodor and periodontal disease in dogs [J]. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2019, 6(3):75-79.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.04.07

猪营养研究与饲料科技创新促进我国养猪业发展

茅沈丽, 张赛*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 农业农村部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东广州 510640)

摘要:改革开放40多年以来,我国养猪业飞速发展,猪营养研究与饲料科技创新对养猪业和饲料工业的发展起着极为关键的推动作用,猪肉产量从1978年的856.3万吨升至2021年的5296万吨。同时,猪营养研究与饲料科技创新提高了猪肉安全性并改善了肉品质,提高了人们的生活品质。猪营养研究与饲料科技创新的不断发展,也促进了饲料资源的合理利用,缓解了人畜争粮的困局。

关键词:猪; 营养研究; 饲料科技创新

中图分类号:S815.4 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)04-0036-06

Swine nutrition research and feed technology innovation boost development of Chinese swine industry

MAO Shenli, ZHANG Sai *

(*Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou Guangdong 510640*)

Abstract: Past 40 years since Chinese economic reform, witnessed the skyrocketing development of our swine industry, which is largely due to nutrition research and feed technology innovation. Pork production increased from 8.56 billion tons in 1978 to 52.96 billion tons in 2021, and satisfied pork demand of the people. Moreover, nutrition research and feed technology innovation improved the safety and quality of the pork. Nutrition research and feed technology innovation also facilitates appropriate utilization of feed resources, alleviate predicament of food competition between human and farm animals.

Keywords: Swine; Nutrition research; Feed technology innovation

改革开放以来我国养猪业飞速发展,虽然受非洲猪瘟和新冠疫情等的多重影响,导致我国生猪产能大幅下降,但2021年全国生猪出栏6.7亿头,仍然比1978年全国出栏肉猪1.61亿头增加了

3.66亿头,增长率达316.15%;2021年末全国生猪存栏4.5亿头,比1978年3.19亿头增长41.07%;猪肉产量从1978年的856.3万吨到2021年的5296万吨,增长率高达518.47%^[1]。我国人均猪肉消费量

收稿日期:2022-04-06

基金项目:广东省农业科学院科技计划项目(202106TD);广东省农业科学院科技人才引进专项资金项目(R2021YJ-YB3012);广东省农业科学院青年科技人员指导协议(R2021QD-024)

作者简介:茅沈丽(1975-),女,江苏启东人,从事单胃动物营养与饲料研究。E-mail: 745596814@qq.com

*通讯作者:张赛(1990-),男,湖南益阳人,博士,副研究员。E-mail:zhangsai163@outlook.com

从1979年的10.3 kg到2021年的37.49 kg,增长了263.98%。我国养猪业飞速发展的40年也正是我国猪营养研究和饲料科技腾飞的40年,我国猪饲养标准的制定,猪饲料的营养价值评定与猪营养需要量研究的不断深入及各种饲料添加剂的广泛应用,使我国生猪生产水平迅速提高。

猪营养研究和饲料科技的不断创新完善了我国饲料工业体系,1980年全国饲料总产量仅为100万吨,2021年全国工业饲料总产量达2.93亿吨,年产值达12234.1亿元,成为世界第一大饲料生产国。2021年广东省工业饲料产量超过3573.3万吨,在全国各省的饲料产量排名中位居第二。猪营养的研究与饲料科技的创新对养猪业和饲料工业的发展起着极为关键的推动作用。

1 猪营养研究与饲料科技创新保障了人民的菜篮子

1.1 猪营养研究与饲料科技创新实现了生猪的充足供应

改革开放初期,猪肉于寻常百姓还是奢侈品,今天猪肉已成为国人的基本消费品。改革开放前,我国生猪养殖主要利用米糠、麸皮等农副加工产品作为主要饲料来源,养殖水平十分低下,不能按猪营养需要量及猪饲料营养价值来配制日粮,出栏的时间在一年以上,生猪料重比约为5~7:1,瘦肉率低于40%。1978年,由许振英教授牵头开始了我国猪饲养标准的制订工作,历经10年的不懈努力,终于完成了第一版“中国瘦肉型猪的饲养标准”,20~60 kg、60~90 kg两阶段猪日增重以550 g和700 g为标准,瘦肉率能达到46%,满足了市场对瘦肉需求量的增长。至2004年,由中国农业大学、广东省农业科学院畜牧研究所、四川农业大学等科研单位对国家猪饲养标准进行了修订。标准中增设了“能量蛋白比”和“赖氨酸能量比”两项指标,用钠与氯的需要量代替了“食盐”需要量;同时列出了镁、钾需要量,增加了吡哆醇、胆碱、脂肪酸营养参数,氨基酸需要采用“可消化氨基酸”。试验发现采用饲养标准,猪平均饲养期缩短25天,每头猪的日增重提高19.9%,瘦肉率提高21.7%,饲料利用率提高2.7%,每头商品猪平均纯收益增加5.4元,按照我国当前平均每年出栏6亿头计

算,每年可增加收益30亿元以上。此饲养标准涵盖了不同品种、性别、年龄、体重、生理状态、生产性能、不同环境条件下猪的各种营养物质的定额数值,符合我国饲料特点、饲养条件和市场要求,为我国养猪业起到巨大的推动作用,促进了我国饲料和饲养科学的发展。广东省农业科学院畜牧研究所和中国农业科学院北京畜牧兽医研究所等单位共同完成的与猪饲养标准制定有关的研究成果“猪、鸡营养参数及配方新技术研究”“瘦肉型猪营养需要与新型饲料添加剂开发应用技术研究”先后在1997年和2004年获得国家科技进步二等奖。为满足我国猪业快速发展的需求,中国农业大学、四川农业大学、广东省农业科学院动物科学研究所等科研单位对国家猪饲养标准进行了进一步全面修订,成为新版国家饲养标准,于2020年正式发布实施。

猪饲料的营养价值评定与营养需要量研究犹如一对孪生姐妹,互不可缺^[2]。80年代,在张子仪院士的组织协调下统一了猪饲料营养价值评定方法,完成了“中国饲料成分及营养价值表”。90年代以来,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、广东省农业科学院畜牧研究所、四川农业大学、中国科学院长沙农业现代化研究所、中国农业大学等开展了玉米、次粉、小麦麸、乳清粉、血浆蛋白粉、鱼粉、豆粕、菜籽粕、棉籽粕、玉米蛋白粉、花生粕等猪常用饲料原料氨基酸消化率测定。近年来饲料营养价值数据库的不断完善与更新对指导养猪生产和饲料配制起到重要的参考。以饲养标准为指导配制饲料,不仅使各种饲料原料得到优化配置,还提高饲料的利用率,从而提高饲料报酬,节约饲料资源,提高猪生长速度。8~90 kg生长猪全期日增重达到650 g/d,料重比2.62:1;20~90 kg生长肥育猪全期日增重达到700 g/d,料重比2.78:1^[3]。

上个世纪80年代起,仔猪早期断奶研究得到高度重视,仔猪断奶应激产生机理的研究报告逐渐增多,报告内容多涉及14日龄超早期断奶在体内电解质平衡、内分泌、免疫功能、食糜pH值和肠道微生物区系、消化酶活性、小肠粘膜形态结构等方面的应激反应机理,并建立了成熟的早期断奶应激调控技术,研制开发针对三周龄断奶和两周龄断奶的教槽料和抗应激产品。断奶应激的机理

研究与早期断奶饲料配制技术使早期断奶成为可能, 该技术能提高母猪繁殖率、减少疾病由母体向仔猪的传播、提高猪后期生产性能和改善胴体品质^[4]。早期断奶技术使仔猪断奶日龄从上世纪60年代的55~60天缩短到现在的14~21天, 使母猪年产胎数从1~1.5胎提高到2.0~2.5胎, 母猪年产仔数提高5~10头左右^[5]。仔猪出生一周后, 通过补充教槽料, 供给仔猪充足的营养, 生长速度比单纯哺乳的仔猪提高70%以上, 而且猪达到上市体重(110 kg)所需饲养时间可缩短10天以上。同时教槽料的应用使仔猪断奶前死亡率从40%降到10%左右。

1.2 猪营养研究与饲料科技创新促进了饲料资源的合理利用

70年代末, 我国对饲料添加剂的认识还十分肤浅, 随着猪营养研究与饲料科技的不断发展, 促生长、防疾病的饲料添加剂成为配制饲料过程中不可缺少的一环。使用单一饲料或营养未配合全价混合饲料与含添加剂的全价配合饲料相比, 每生产1 kg猪肉, 要多消耗155%的饲料。饲料添加剂逐渐成为配合饲料的科技核心, 随着饲料工业的高速发展与科学技术的进步, 添加剂的研究、开发与应用越来越受到重视。氨基酸、维生素、胆碱、微量元素等必需营养添加剂, 益生菌、复合酶制剂、有机酸、有机铁、有机硒、天然抗氧化剂等已在养猪生产中得到广泛应用, 弥补大宗原料的营养缺陷, 对提高猪生产性能发挥了积极的作用。在猪饲料中添加200~300 mg/kg富血铁可提高仔猪和小猪日增重3~7%, 降低料重比5~8%; 提高生长猪日增重11%, 降低料重比10.5%; 提高肥育猪日增重5.4%, 降低料重比5.6%, 改善肤色、毛况和肉质^[6-7]。在14日龄断奶仔猪饲料中添加0.15%酸肥灵可提高日增重31.9%, 降低料重比20.3%, 降低腹泻率40%, 提高成活率3.9%^[8]。添加甘露寡糖2 mg/kg及饲含乳酸菌和酵母微生物1 mg/kg, 猪的生长速度分别提高10%, 饲料利用率提高9%, 并明显降低腹泻率。异麦芽寡糖与益生菌合用可分别提高增重3%、4%和8%。仔猪在7~20日龄添加抗生素, 21~35日龄添加益生菌, 比7~35日龄一直添加益生菌的仔猪日增重可提高3.74%, 饲料利用率提高9.56%, 腹泻率降低2.27%, 死亡率降低

2.02%^[9]。在饲料中应用复合酶制剂, 可适当降低配方中能量和氨基酸含量而不影响饲养效果。对于35%小麦豆粕型日粮, 添加木聚糖酶可使生长猪日增重提高12.3%, 降低料重比8.8%。广东省农业科学院畜牧研究所全面系统地研究了9类60多种饲料添加剂在猪不同阶段的适宜品种和添加量、配伍组合, 并提出了上述添加剂在猪各生长阶段的应用参数40多个, 优化猪复合预混料配方, 配制瘦肉型猪饲料, 使15~35 kg阶段猪日增重达到643 g/d, 料重比2.45:1; 35~60 kg阶段日增重800 g/d, 料重比2.61:1; 60~90 kg阶段日增重887.7 g/d。添加剂的研发与应用效果不断提升, 使饲料的配制突破了玉米-豆粕型常规饲料的束缚, 大量非常规饲料原料DDGS、次粉等得到有效利用。饲料中使用防霉剂、抗氧化剂等饲料保藏剂, 可防止饲料养分的损失, 避免浪费; 各种形式粘结剂的使用减少了粉尘、改善了饲料加工性能, 从而提高了饲料生产能力。猪营养研究与饲料科技的不断创新最大程度发挥了饲料原料的营养效价, 在满足生猪有效供应的同时, 一定程度上缓解了人畜争粮的困局。

2 猪营养研究与饲料科技创新美化了消费者的餐桌

随着人们生活水平的提高, 猪营养研究与饲料科技满足人们对量的需求的同时, 还提高了群众对质的需求, 尤其在我国加入WTO后, 人们对猪肉的安全、营养、卫生、风味及花色等要求越来越高, 生产安全优质猪肉的呼声日益高涨。为规范猪肉生产、加工和销售, 确保猪肉的食用安全, 我国先后颁布了《猪肉卫生标准》《无公害食品猪肉》和《农产品安全质量无公害畜禽肉安全要求》等, 无公害肉、绿色肉、有机肉及安全肉的概念深入人心。2020年饲料禁抗之前, 饲用抗生素的应用已有50多年, 其对集约化养猪业的发展起了至关重要的作用, 但抗生素可在猪肉中残留并使病原菌产生耐药性。瘦肉精的使用可显著提高瘦肉率, 但瘦肉精的残留危害人体健康。砷制剂、高锌、高铜具有使猪皮红毛亮, 降低仔猪腹泻, 促进生长的效果, 但可使猪肉微量元素过度沉积、造成残留量超标, 同时污染环境。饲料中违禁使用激素和药

物、滥用饲用抗生素、超量添加微量元素等对猪肉的安全及环境的可持续利用提出严峻的考验。据分析,一个万头猪场,按中猪计,每年至少向猪场周围排污3万吨,为了促进猪的生长,实际生产中通常使用高铜、高锌等,若按每吨饲料中添加铜180 g、锌140 g计算,饲养每头猪约排放铜50.2 g、锌39.1 g。目前猪饲料中普遍使用有机砷制剂,若按每吨饲料添加有机砷23.4 g计算,饲养每头猪约排放砷5.24 g。进入21世纪,猪肉质量安全的营养调控成为最热门的研究。2001年我国颁布了《饲料药物添加剂使用规范》,详细规定了饲用抗生素的适用畜禽品种、用法用量、休药期等,为养猪生产提供了依据。另外,饲用抗生素联合使用能获得“协同”效果——抗菌谱更广、促生长作用增强、添加量减少、有效减少了其在猪肉中的残留。营养研究者还不断寻找抗生素替代产品,包括益生菌、有机酸、寡聚糖、中草药添加剂、植物提取物(大蒜素、糖萜素、异黄酮、茶多酚)等^[10]。广东省农业科学院畜牧研究所提出了猪肉中无抗生素残留的安全饲料配制技术,以益生菌、低聚寡糖等微生物制剂或植物提取物(黄酮)取代抗生素,保证生长全期不使用抗生素,可使日增重提高6%~20%,饲料利用率提高7%~10%,腹泻率降低50%以上,确保猪肉中无饲料来源的抗生素残留,且不会增加添加成本,对饲养的饲料成本还可降低,每头猪降低饲料成本约16元,提前为禁抗时代的到来做好了准备。在系统研究有机铜(赖氨酸铜)、铁(富血铁)、锌(蛋氨酸锌)取代饲料中无机铜(硫酸铜)、铁(硫酸铁)和锌(硫酸锌)对仔猪或生长肥育猪生产性能、血液指标、粪中重金属排放量及商品性状影响的基础上,提出一套猪肉产品中重金属低残留和重金属低排放安全、环保饲料配制技术:①仔猪、小猪阶段,富血铁(铁含量84 mg/kg)+蛋氨酸锌(锌含量80 mg/kg)+赖氨酸铜(铜含量150 mg/kg);生长猪阶段,富血铁(铁含量70 mg/kg)+蛋氨酸锌(锌含量80 mg/kg)+赖氨酸铜(铜含量100 mg/kg);肥育猪阶段,富血铁(铁含量56 mg/kg)+蛋氨酸锌(锌含量60 mg/kg)+赖氨酸铜(铜含量50 mg/kg)。全期不加砷制剂,比传统使用普通高铜、锌、铁饲料提高猪生产性能、饲养经济效益,改善肉猪外观经济性状,使肝脏中铜、锌、铁含量降低30%~

50%,砷含量降低75%~85%,铅含量降低50%以上;肌肉中铜、锌、铁含量无影响(综合各研究结果,肌肉中铜、锌、铁含量受饲料铜、锌、铁浓度影响的幅度低于肝脏),砷含量降低50%~80%,铅含量降低50%~70%,镉含量降低70%~75%,同时铜、锌、铁的排放降低40%~50%,砷的排放降低80%~90%。②在60~90 kg肥育猪阶段,联合应用赖氨酸铜(铜含量4 mg/kg)和硫酸铜(铜含量2 mg/kg)、蛋氨酸锌(锌含量60 mg/kg)和硫酸锌(锌含量30 mg/kg)、蛋氨酸铁(铁含量60 mg/kg)和硫酸亚铁(铁含量30 mg/kg),比传统使用普通高铜、锌、铁饲料降低铜、锌、铁的排放30%~40%,且不会降低猪的生产性能,但降低猪肉产品中重金属的残留^[11]。

在实现猪肉安全生产的同时,改善猪肉的品质研究也取得了进展,通常说的猪肉品质主要包括pH、肉色、嫩度、肌肉系水力、肌肉脂肪含量、脂肪酸组成和风味等方面,这些受遗传、环境、营养、运输和屠宰处理等因素的影响。遗传方面氟烷基因(HAL)导致PSE肉产生,酸肉基因(RN)导致酸肉产生,心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)基因和脂肪组织脂肪酸结合蛋白(A-FABP)基因影响肌肉脂肪含量,肌细胞生成素(MyoG)基因、钙蛋白酶抑制蛋白(CAST)基因、钙蛋白酶I(CAPN1)基因和钙蛋白酶II(CAPN2)基因对肌肉纤维组成和嫩度有影响。由于多数与猪肉品质密切相关的基因遗传力很低,完全依赖遗传育种方法改良猪肉品质并不可行。通过营养学方法进行调控既经济又有效,饲料中能量、蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素、矿物质、电解质水平等营养物质都能影响猪肉品质。宰前饲料能量过高,降低肌肉pH值;日粮中多不饱和脂肪酸含量过多会导致产出的猪肉不耐储存,易氧化酸败,产生异味,不利于肉品的深加工;日粮中缺乏生物素时,体脂中不饱和脂肪酸量明显增加,导致体脂硬度下降,储藏期缩短。维生素E作为主要的保护性抗氧化剂对肉质具有显著的改善作用,维生素C具有抗应激和减缓猪宰后肌肉pH值下降速度的功效,适当的维生素D3可使猪肉的滴水损失降低。通过添加适宜的饲料添加剂可起到改善肉质的作用^[12]。甜菜碱可以降低背膘厚、增大眼肌面积和改善肉色;日粮中添加β-胡萝

卜素可被猪采食吸收后沉积于脂肪组织,改善肉质;半胱胺和大豆黄素可以提高背最长肌大理石纹评分、降低脂肪沉积与滴水损失,一些中草药添加剂可以改善猪肉风味。因此通过调整饲料配方中能量和蛋白质水平、氨基酸和脂肪酸组成比例、添加甜菜碱、大豆黄素、氧化三甲胺和适量添加铬、硒、维生素E和C、碳酸氢钠、天冬氨酸镁等,可以有效提高瘦肉率,降低脂肪沉积、改善猪肉的pH值、系水力、肉色、使肉质保存期延长,减少PSE肉的发生,防止脂肪的氧化,从而提高猪肉的品质^[3]。广大消费者应放弃对配合饲料的偏见,认识到依托猪营养研究与饲料科技创新的合理饲料配比才是生产优质猪肉有效措施,美化人民餐桌的有效途径。

3 猪营养研究与饲料科技创新有效实现了对原料价格上涨的缓冲

3.1 猪价波动是多方合力的结果

由于人们的生活水平不断提高,居民食用猪肉比重上升和通货膨胀的影响,猪价的总体趋势是上行的。但我国猪肉价格的波动又存在着周期性和季节性。猪肉价格周期一般为3年,呈现两头高中间低的特点。在我国,因为风俗习惯的原因,人们春季与冬季对猪肉需求较大,故而价格相对会高。

我国生猪价格长期波动现象,是多种因素影响的结果。首先,受到养猪产业布局的影响。我国养猪业的组织化程度低,市场集中度不高,众多中小生产者获取市场信息滞后,补栏、出栏随意性大,抗风险能力差^[13]。生猪养殖缺少统筹规划,使得生猪出栏量与市场需求相脱节,价格上下波动。其次,是突发事件的影响。如,2004年的禽流感,一定程度上弱化生猪市场供大于求的局面,从而推动了猪价的上涨。2007年,一些省份出现蓝耳病疫情,大量生猪被扑杀,猪肉数量锐减,从而供不应求。2008年春节期间的雨雪灾害死亡大量猪苗,导致猪苗价格偏高和下半年生猪市场供应量减少。2018年9月开始的非洲猪瘟迅速席卷全国,初期中小养殖户在恐慌中纷纷加快出栏速度,猪价快速下跌。之后存栏下降,补栏谨慎,猪价快速触底反弹。2020年春节后新冠疫情的影响,生

猪价格又是一波大涨大跌。再者,国家政策也对生猪价格有着很大的影响。但国家对生猪市场的宏观调控能力还相当薄弱,风险基金制度的建立和完善还需要时间,我国猪肉的储备能力也极为有限,还远不足以稳定市场。最后,饲料原料价格也对生猪价格有影响,除设备固定成本外,生猪成本主要构成:猪仔+饲料+人工费。猪仔价与猪肉价相关,人工费变化不大。因此,饲料原料价格在诸多影响因素中,也有着重要的位置。

3.2 猪营养研究与饲料科技创新缓冲了原料价格的上涨

养猪生产中,饲料成本占养殖成本的70%左右,所以饲料原料价格变动对养殖成本的影响非常大。近年来,饲料原料供应紧张和价格上涨把研究者的注意力吸引到研发高效低成本饲料上,充分发挥饲料营养潜力。一方面积极寻找玉米豆粕常规原料以外的饲料原料资源,研究棉粕、菜粕、DDGS、发酵豆粕等的应用技术,降低豆粕、鱼粉的使用,配制低成本饲料^[14]。另外面对日益紧缺的蛋白原料,根据理想蛋白模式,添加合成氨基酸产品(赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸等)配制饲料,使饲料蛋白水平比传统饲料降低2%~4%,不会影响生长性能,而且降低了蛋白原料的使用,并降低了氮的排放,缓解环境污染。广东省农科院畜牧研究所发现,无抗日粮中降低蛋白质水平(由NRC推荐的23%降低至17%)可改善21日龄断奶仔猪生长性能、缓解腹泻;而在低蛋白日粮基础上,无论通过增加动物蛋白还是植物蛋白来提高日粮蛋白质水平,均会降低仔猪肠道的消化吸收功能,导致仔猪生产性能下降,并通过破坏肠道屏障功能促进氯离子分泌关键蛋白CFTR的表达,导致仔猪腹泻^[15-16]。证实了无抗低蛋白日粮更有利于仔猪的肠道健康。针对我国饲料资源长期短缺,特别是蛋白饲料原料的进口依存度高达80%,严重制约了我国饲料工业和养殖业发展,中国农业大学和中国饲料工业协会牵头组织制订了国家标准《仔猪、生长育肥猪配合饲料》,此标准聚焦降低配合饲料蛋白含量,倡导高效低蛋白日粮体系应用,对我国养猪生产中有效减少豆粕等蛋白饲料原料用量,减少我国对外大豆的依赖具有里程碑式意义^[17]。据测算,猪配合饲料平均蛋白水平下调1.5%,有

望将生产 1 kg 猪肉的蛋白质消耗从 0.45 kg 降至 0.39 kg, 降幅达 13%; 新标准在全行业全面推行后, 养殖业豆粕年消耗量有望降低约 1100 万吨, 带动减少大豆需求约 1400 万吨, 对于保障我国蛋白饲料供给和提高其利用效率, 将有利于提升我国饲料工业技术水平, 促进畜禽产业高质量发展。

应用先进的生物学与基因工程技术开发各种酶制剂、益生寡糖、新型生长因子、活性酵母、免疫调节肽、有机酸、蛋白质类生长促进剂、天然活性成分提取物等提高饲料能量、蛋白质、矿物质营养潜力, 提高饲料转化效率, 降低饲料养分的排出量, 即可降低养殖饲料成本, 也可缓解养殖污染。例如应用植酸酶提高饲料中磷的利用率, 降低磷酸氢钙的使用, 使用有机微量元素如氨基酸螯合形式的铜、锌和硒制剂, 减少(如磷、铜、锌、砷等)等矿物元素的使用量, 降低这些成分在猪粪中的排泄量。另一方面在原料的采购、贮存、加工、包装和储运等各个环节寻找更安全、高效的方法, 例如, 在仔猪饲料生产中普遍使用的大豆膨化技术, 可以有效控制抗胰蛋白酶; 制粒技术可以达到杀菌、提高饲料消化率等诸多功能; 饲料粉碎技术直接影响饲料生产的质量、产量、电耗等综合成本, 同时也影响饲料的内在品质和饲养效果。2007 年以来, 大部分饲料原料价格上涨的幅度超过 50%, 而猪配合饲料的价格上涨幅度不到 30%, 缓解养殖成本的上涨速度, 这要归功于猪营养研究的进步与饲料科技的不断创新。

目前, 受国际市场饲料原料涨价、企业生产经营成本增加及疫病等因素影响, 养殖成本上涨。作为动物营养研究与饲料科技从业者, 希望能够进一步加强猪营养与饲料科学基础研究, 寻找和开发廉价且高效的饲料原料与功能性添加剂, 同时根据市场行情配制优质饲料以稳定饲料价格, 缓解养殖成本上涨导致养殖户利润的大幅波动。

参考文献:

- [1] 王丽, 肖昊, 胡胜兰, 等. 2020 年度生猪产业营养与饲料领域特点及 2021 年发展趋势[J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(2):6-9.
- [2] 王丽, 叶翔杨, 温晓鹿, 等. 猪营养调控技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(11):114-124.
- [3] 石宝明, 孟祥宇, 蔡建成, 等. 复合微生物制剂对猪生产性能、免疫功能和肉质影响[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(3):58-64.
- [4] 蒋宗勇, 杨雪芬. 2011 年度中国猪营养研究进展[C]. 动物营养研究进展(2012 年版), 2012:42-67.
- [5] 帅起义, 陈顺友. 仔猪早期断奶的综合经济效益[J]. 中国饲料, 2001(24):28-29.
- [6] 林映才, 郑黎, 蒋宗勇, 等. 不同铁制剂对小猪生产性能、肤色和血液生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2001(15):10-12.
- [7] 林映才, 郑黎, 蒋宗勇, 等. 复方富力铁对生长猪的生产性能、肤色和部分血液指标的影响[J]. 养猪, 2001(2):26-27.
- [8] 林映才, 陈建新, 蒋宗勇, 等. 复合酸化剂对早期断奶仔猪生产性能、血清生化指标、肠道形态和微生物区系的影响[J]. 养猪, 2001(1):13-16.
- [9] 刘学剑. 猪的饲料配方设计中应注意的几个问题[J]. 畜禽业, 2004(3):8-11.
- [10] 易宏波, 王丽, 侯磊, 等. 商品猪全程绿色高效无抗饲料配制技术体系[J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(3):1-2.
- [11] 蒋宗勇, 周桂莲, 林映才, 等. 提高肉品质量安全的营养调控技术[C]// 饲料营养研究进展——第五届全国饲料营养学术研讨会论文集, 2006:173-186.
- [12] 王丽, 杨雪芬, 李平, 等. 2018 年度我国生猪产业营养与饲料技术研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(6):3-6.
- [13] 王丽, 肖昊, 温晓鹿, 等. 2018 年度生猪产业营养与饲料领域发展趋势与建议[J]. 广东畜牧兽医科技, 2018, 43(4):4-7.
- [14] 吴绮雯, 李平, 熊云霞, 等. 猪饲料原料营养价值评定及研究进展[J/OL]. 中国畜牧杂志:1-13[2022-03-22].
- [15] WU Y P, JIANG Z Y, ZHENG C T, et al. Effects of protein sources and levels in antibiotic-free diets on diarrhea, intestinal morphology, and expression of tight junctions in weaned piglets [J]. *Animal Nutrition*, 2015, 1(3):170-176.
- [16] WEN X L, WANG L, ZHENG C, et al. Fecal scores and microbial metabolites in weaned piglets fed different protein sources and levels[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(1):31-36.
- [17] 全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76). “仔猪、生长育肥猪配合饲料”. GB/T 5915-2020. 2020-09-29.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.04.08

重要黄酮类物质药理作用及在畜禽养殖应用的研究进展

吴琪¹, 张晓琳³, 刘朝霞³, 刘光辉³, 田志娟⁴, 高欣召⁴, 陈芳艳², 王林川^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

3. 石家庄皓普动物保健科技有限公司, 河北 石家庄 050022;

4. 石家庄市畜牧兽医技术开发中心, 河北 石家庄 050094)

摘要:黄酮类化合物是一类重要的天然产物, 广泛分布于高等植物的花、种子、坚果、根和树皮等部位, 具有抗病毒、抗菌、抗氧化、降压、降脂、抗炎等广泛的药理活性。本文主要就植物中含量较高的芦丁、槲皮素及染料木素等黄酮类化合物的药理作用及其对改善畜禽生长、繁殖、产蛋性能, 提高动物免疫力和肉蛋品质等多方面的功能及应用研究情况进行综述, 旨在为芦丁、槲皮素及染料木素等黄酮类化合物在畜禽养殖中的应用提供理论支撑。

关键词:芦丁; 槲皮素; 染料木素; 药理作用; 畜禽养殖

中图分类号:S816.7 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)04-0042-05

Research progress on pharmacological effects of major flavonoids compounds and their application in livestock and poultry industry

WU Qi¹, ZHANG Xiaolin³, LIU Chaoxia³, LIU Guanghui³, TIAN Zhijuan⁴, GAO Xinzha⁴,
CHEN Fangyan², WANG Linchuan^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642;

2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642;

3. Shijiazhuang Hope Animal Health Technology Co., Ltd., Shijiazhuang Hebei 050022;

4. Shijiazhuang Animal Husbandry and Veterinary Technology Development Center, Shijiazhuang Hebei 050094)

Abstract: Flavonoids are important natural plant compounds widely distributed in flowers, seeds, nuts, roots and bark of higher plants. They have a wide range of pharmacological activities such as antiviral, antibacterial, antioxidant, antihypertensive, lipid-lowering and anti-inflammatory. This paper mainly reviews the pharmacological effects of flavonoids such as rutin, quercetin and genistein, etc. Their applications in improving the growth, reproductive performance, and immunity as well as the quality of meat and eggs for livestock and poultry. This research provides theoretical support for the application of flavonoids (rutin, quercetin, genistein, etc.) in livestock and poultry breeding.

Keywords: Flavonoids compounds; Rutin; Quercetin; Genistein; Pharmacological effects; Livestock and poultry breeding

收稿日期:2021-08-08

基金项目:石家庄市重点研发计划项目(211500292A)

作者简介:吴琪(1998-),女,河北唐山人,硕士研究生,主要从事预防兽医研究。E-mail:2810516256@qq.com

*通讯作者:王林川(1965-),男,教授,研究方向为预防兽医。E-mail:lcwang@scau.edu.cn

黄酮类化合物(flavonoids)泛指由两个芳环通过三个碳链相互连接的一系列化合物,由于其母核上常有-OH、-OCH₃等助色基团,大多显黄色。它是一类重要的天然物质,广泛分布在植物的花、种子、坚果、根和树皮等部位。几乎每种植物体内都有,尤其在槐花、桑树、银杏、红花等植物中分布较多^[1]。黄酮类化合物因具有抗病毒、抗菌、抗氧化、降脂、抗炎等广泛的药理活性而受到关注^[2-6]。黄酮类化合物种类繁多,其中芦丁、槲皮素及染料木素等化合物在植物中的含量较高,易获得,在生产上有应用前景。本文就芦丁、槲皮素及染料木素的药理价值及其在畜牧养殖业中的初步应用情况进行综述,为其在畜牧业的开发应用提供理论参考和研究思路。

1 黄酮类化合物药理作用

1.1 芦丁药理作用

芦丁有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎等广泛的药理作用,在治疗痛风、心血管疾病、肥胖、糖尿病、高血压等方面有较为显著效果。芦丁抑菌效果显著,王亚男研究表明当芦丁浓度为128.64 μg/mL时,对金黄色葡萄球菌 Sortase A 的抑制率可达63.58%^[7]。祖晓宁的研究也证实槐米芦丁提取物对金黄色葡萄球菌有抑菌效果,还发现芦丁对大肠埃希氏杆菌、白色念珠菌和枯草杆菌等3种菌亦有明显的抑菌作用,其中抑菌效果最好的是对枯草杆菌(MIC为0.125 g/mL),其次是对金黄色葡萄球菌(MIC为0.25 g/mL)^[3]。芦丁能抑制神经氨酸酶(流感病毒表面的糖蛋白)的活性,进而阻断流感病毒的复制过程,对A/PuertoRico/8/1934(H1N1)、A/FM1/1/47(H1N1)、A/Human/Hubei/3/2005(H3N2)和A/Beijing/32/92(H3N2)等多种流感病毒均有明显的抑制作用^[2]。除抗菌、抑制病毒外,芦丁对一些肿瘤细胞也发挥着作用,沈钦海等研究表明当芦丁浓度为50~250 μmol/L时,能抑制人肝癌HepG2细胞的生长和增殖^[8]。金芳多等在培养液中添加一定浓度的芦丁培养人肝癌HepG2细胞和人肝HepG2细胞,人肝癌HepG2细胞丙二醛(MAD)含量明显增高,还原型谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性显著下降,而人肝HepG2细胞检测结果则相反,说明其有抑制癌细胞的作用^[9]。芦丁对细胞氧化应激损伤起到良好的保护作用,孙秀娥等研究表明芦丁可降低受到

氧化应激损伤的心肌细胞活性氧和丙二醛的含量,提高超氧化物歧化酶的活性,对受氧化应激损伤的心肌细胞起保护作用^[10]。芦丁亦表现出良好的抗炎作用,早在1974年,Kalashnikova等发现芦丁可抑制大鼠因植入羊毛球而导致的炎症^[11]。刘欣用脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤小鼠模型研究芦丁的抗炎作用,按200 mg/kg/d的剂量连续灌胃给药5 d后,检测到炎症介质NO的含量和炎症信号通路TLR4、TRAF6、IκB、P-IκB蛋白表达水平量下降,说明芦丁有较好的抗炎作用^[12]。芦丁对小鼠结肠炎、耳廓炎、皮肤、关节过敏性炎症等均有一定的治疗作用^[13-14]。芦丁在治疗肥胖症方面发挥良好的作用,它可调节脂肪新成代谢相关基因的表达及相关不饱和脂肪酸的生物合成,减少脂肪的富集,同时能抑制前脂肪细胞的分化,减少前脂肪细胞脂滴的生成,促进米色脂肪细胞的形成,米色脂肪细胞有促进机体能量“燃烧”的作用^[5, 15]。芦丁还可调节血脂、改善胰岛素抵抗、预防糖尿病,对神经系统也有较好的保护作用^[16-17]。

1.2 槲皮素

槲皮素功效同芦丁类似,也有较好的抗氧化、抗炎、护肝、抗癌、降糖、抗菌等功效。槲皮素是细胞色素C的一种很强的还原剂,在细胞凋亡通路中发挥重要作用,比没食子酸的抗氧化能力强^[18]。体外实验表明槲皮素能降低细胞NO浓度,降低细胞吞噬功能,其抗炎和抗氧化能力高于木犀草素、山柰酚、芹黄素等抗氧化剂,对炎症引起的疾病和氧化应激有良好的辅助治疗作用^[19]。动物实验发现槲皮素对链脲佐菌素糖尿病大鼠牙髓组织中抗氧化基因表达改变和组织病变有保护作用^[20]。槲皮素可改善高脂饮食诱导引起的肥胖小鼠结肠炎的症状^[21]。槲皮素还对非酒精性脂肪肝病有保护作用,特别是对脂肪病变和肝炎效果更好;可调节胆汁酸,促进脂肪酸的新陈代谢^[22-23]。槲皮素也有抗癌作用,例如可抑制食管癌细胞、肺癌细胞的生长和增殖^[24-25]。槲皮素通过调节NF-κB, PARP, STAT3, Bax, Bcl-2, COX2等蛋白和细胞因子,在神经退行性疾病和糖尿病的治疗中发挥作用^[26]。此外槲皮素可调节肠道微生物菌群和抑制肠道内有害微生物的生长繁殖^[23, 27]。

1.3 染料木素

染料木素(4, 5, 7-三羟基异黄酮)具有预防骨质

疏松、保护心血管系统、抗肿瘤、调节新陈代谢等作用。其结构与雌激素相似,能够与雌激素受体结合,产生雌激素样效应,因而这方面的作用倍受关注^[28]。研究证实,通过小鼠皮下连续4周注射0.4 mg/d染料木素可以防止雌激素缺乏造成的小鼠骨质疏松,再结合适当的运动,则可显著提高骨密度水平、股骨远端骨面积和小梁骨厚度等指标^[29]。染料木素在保护心血管系统方面亦发挥作用,它是抗动脉粥样硬化酶-氧磷酯酶1(PON1)的诱导剂,可显著提高PON1的活性,进而防止低密度脂蛋白(LDL)的氧化,而LDL是心血管系统的保护剂^[30]。与芦丁和槲皮素具有相类似功能,染料木素对多种癌细胞亦发挥作用,例如抑制前列腺癌细胞的入侵和转移、人类乳腺癌细胞肿瘤的发生,还可抑制乳腺癌、胃肠癌、前列腺癌、鼻咽癌干细胞的活性^[31-32]。染料木素直接作用于脂肪细胞或脂肪祖细胞,代谢编程米色脂肪细胞,可预防肥胖及相关代谢性疾病^[33]。

2 黄酮类物质在畜禽养殖上的应用研究进展

由于黄酮类化合物广泛的药理作用,探索其在畜禽生产中应用也受到广泛的关注,研究表明,其对畜禽的生长性能、繁殖与产蛋性能、免疫力提高等均有良好的效果。

2.1 在家禽养殖中的应用研究进展

黄酮类化合物可改善家禽的生长性能、增强免疫力、提高产蛋性能和肉质。黄酮类化合物有雌激素样生物活性,因而可不同程度作用于畜禽的性腺轴或生长轴,进而影响相关激素水平及其基因表达,例如黄酮类化合物通过促进动物肝脏GH受体发育和增加IGF-1分泌等激素水平来调节生长^[34]。研究表明,在1~42日龄AA肉鸡饲料中添加0.8%芦丁,可显著提高肉鸡平均日增重、平均日采食量,降低料重比和肉鸡腹水综合征的发生率^[35]。芦丁对改善蛋品质有帮助,饲料中添加芦丁可显著增加蛋壳厚度,提高蛋清凝胶的回复性、硬度、胶性和蛋清的起泡性,对产蛋后期蛋鸡的生产性能不会产生不利影响^[36]。在AA肉鸡日粮中添加0.02%~0.06%的槲皮素可以降低腹脂率;显著增加胸肌和腿肌的pH_{45 min}值、肌肉颜色以及嫩度,对改善肉质有显著效果;对肉鸡的平均日采食量、平均日增重、料重比等生长性能等指标则不会产生影响,但胸肌率会略微降低^[37]。饲料中添加0.02%的槲皮素可以显著降低AA肉鸡盲肠有害

微生物的数量,提高消化道蛋白酶的活性,显著增加蛋白质代谢率和血清白蛋白含量^[38]。在蛋鸡饲料中添加0.02%~0.04%的槲皮素可以调节蛋鸡营养物质代谢和相关内分泌激素水平,使产蛋率提高5%~8%,料蛋比降低;同时增加蛋壳厚度,提高蛋黄磷脂的含量,降低蛋黄胆固醇含量^[39]。易先国评估了染料木素对肉鸡生产性能的影响,1~21 d和22~42 d肉鸡日粮添加20~80 mg/kg染料木素,可使采食量和日增重显著增加,胴体氧化稳定性提高,沙门氏菌等有害菌数量下降^[40]。染料木素可以促进雄性肉鸭的脂肪代谢,提高瘦肉率,降低肉鸭腹脂率、血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)与总胆固醇(T-CHO)水平;但对母鸭屠宰性能和血清生化指标无显著影响^[41]。

2.2 在猪养殖中的应用研究进展

黄酮类物质有抗氧化和抗菌作用,在猪精子的保存、猪肠道的保护上均效果良好。在猪精子常温稀释液中添加0.4 mmol/L芦丁,可提升精子的存活率、质膜完整性和对顶体完整性;而在精子冷冻稀释液中添加0.4 mmol/L芦丁,可提高精子的抗氧化能力,并能显著提高受精率^[42]。2型猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是人兽共患病原菌,耐热性极强,可引起猪的急性败血症、脑膜炎、心内膜炎等疾病;芦丁可干预猪链球菌生物被膜形成的黏附阶段,有良好的抑菌作用^[43]。将0.01~1 mg/L槲皮素添加到猪肠上皮细胞培养液中,可促进细胞增殖和肠上皮细胞对蛋白质的吸收^[44]。Zou等研究表明饲料中添加槲皮素可以降低处于运输应激状态下猪血清内毒素含量,增加空肠绒毛高度,保护肠道完整性、降低肠道ROS水平,减少运输过程猪肠道炎症的发生^[45]。猪肉在加工和贮藏过程中,肌原纤维蛋白易发生氧化,导致猪肌原纤维蛋白的凝胶强度和保水性下降,槲皮素可以抑制猪肉蛋白质羰基的产生,减缓蛋白氧化的过程,改善蛋白的胶凝强度和保水性^[46]。Kang等研究表明,在培养液中添加槲皮素虽然不会加速经孤雌激活处理过的猪卵母细胞的成熟,但是可以减少细胞成熟过程中活性氧自由基(ROS)的水平,提高囊胚率,并且分裂率和胚泡细胞数量不会受影响^[47]。吴国云采用血清饥饿法构建了猪卵巢颗粒细胞凋亡模型,然后用含有染料木素的血清体外培养猪卵巢颗粒细胞,结果发现添加染料木素的培养液能显著降低细胞的凋亡率,抑制猪卵巢颗粒细胞的凋亡^[48]。给妊娠后期母猪注射染料木素可以提高小母猪血清

IGF1浓度和初生仔猪的体脂率,对初生小猪肌肉的发育和泌乳母猪及其仔猪生产的性能几乎没有影响^[49]。

2.3 在反刍动物养殖中的应用研究进展

黄酮类物质可提高反刍动物日增重、产奶量和机体的免疫力。奶牛容易出现代谢不平衡和健康问题,芦丁影响葡萄糖代谢,有利于奶牛的肝脏健康;体外实验检测到添加芦丁可以减少瘤胃甲烷的产生,提高瘤胃内容物 β -葡萄糖苷酶、羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶的活性;在初乳中添加芦丁还可提高乳过氧化物酶和 γ -谷氨酰转肽酶的活性。在日粮中添加3~4.5 mg/kg的芦丁则可显著提高产奶量^[50-51]。对湖羊的研究发现,在饲料中添加芦丁可以使湖羊血清甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸、瘦素、胰岛素以及皮质醇水平显著增高,血清葡萄糖含量降低,平均日增重显著增加^[52]。Guemra等评价了槲皮素、半胱胺两种抗氧化剂对牛卵母细胞体外成熟度的影响,发现与不添加抗氧化剂的对照组相比,两种抗氧化剂均可以提高细胞囊胚率,但相比半胱胺,添加槲皮素使胚胎的繁殖率更高^[53]。臧长江等的研究表明,每天给母马补饲0.7 g的染料木素可以显著提高母马血液中球蛋白和尿素氮含量,降低丙二醛含量,改善哺乳期母马的生理状态,提高生产性能^[54]。刘春龙等通过体外细胞培养方式比较大豆黄酮和染料木素对奶牛乳腺上皮细胞增殖及抗氧化水平的影响,结果发现大豆黄酮(100、1000 ng/mL)和染料木素(10、100 ng/mL)可以显著促进奶牛乳腺上皮细胞增殖,而染料木素的添加量仅是大豆黄酮的十分之一;添加100~1000 ng/mL的大豆黄酮和染料木素均可以显著提高血清NO含量和T-SOD活性,降低丙二醛含量^[55]。甘麦邻等研究染料木素诱导舍饲哈萨克羊乏情期发情的调理作用,每天饲喂40 mg和20 mg的染料木素,连续给药24 d,可以显著提高绵羊体内雌激素水平,增加血清总蛋白、白蛋白和血清钙含量,促进羊的发情,其中高剂量组发情羊占比为50.00%,低剂量组为16.67%,而对照组为0^[56]。

3 小结与展望

芦丁、槲皮素、染料木素3种黄酮类化合物均有抗氧化、抗病毒、抗菌、抗炎等多种相类似的活性功能,体内体外实验也显示这3种黄酮类物质对畜禽的生长性能、繁殖与产蛋性能、免疫力提高、肉蛋

品质改善等方面均有良好的效果;但其在规模化的养殖中的添加比例不同,发挥出的作用并不完全相同;因此,还需深入地开展和探索这3种黄酮类化合物配合使用的比例、添加量及其潜在的作用机理等研究,可为黄酮类化合物在畜禽养殖中的广泛应用提供更科学实用的理论依据。

参考文献:

- [1] 刘湘,汪秋安.天然产物的化学[M].北京:化学工业出版社,2014:71.
- [2] 丁玥,曹泽或,柯志鹏,等.芦丁对流感病毒的体外抑制作用及其机制研究[J].现代药物与临床,2015,30(12):1431-1436.
- [3] 祖晓宁,王金宏,于宛鑫.槐米中芦丁的提取及抑菌活性研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2018,34(6):648-652.
- [4] VINCENT SG, JOSEPOSEPH J.Evaluation of antioxidant activity and antimalarial activity of flavone based tetradentate ligand and its metal complexes[J].Materials Today: Proceedings, 2021, 45:2159-2165.
- [5] QIN XJ, WANG WQ, CHU WH. Antioxidant and reducing lipid accumulation effects of rutin in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biofactors, 2021, 474(4):686-693.
- [6] KALASHNIKOVA NA, GERASHCHENKO GI. Antiphlogistic activity of several flavonoids Aktual Vopr[J].Farm, 1974, (2):352.
- [7] 王亚男,柳秉润,邓旭明,等.芦丁对金黄色葡萄球菌Sortase A的抑制作用[J].吉林农业大学学报,2013,35(3):303-307.
- [8] 沈钦海,马臻,陈国民.芦丁对HepG2细胞生长的影响[J].第三军医大学学报,2006,18(9):1885.
- [9] 金芳多,张天,张钊,等.芦丁对肝细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2020,46(6):1117-1123.
- [10] 孙秀娥,张桐,王健鑫,等.芦丁和曲克芦丁对吡柔比星诱导大鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].营养学报,2021,43(1):92-96.
- [11] Kalashnikova NA, Gerashchenko GI. Antiphlogistic activity of several flavonoids Aktual Vopr[J]. Farm, 1974, (2):352.
- [12] 刘欣.芦丁在脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠体内抗炎作用的PK-PD模型研究[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [13] 江苏医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977:448.
- [14] 褚旭芳,王笑楠,范秋灵,等.芦丁在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠急性结肠炎中的作用及其机制[J].中国医科大学学报,2020,49(9):788-792.
- [15] 徐红敏,吴惠文.芦丁抑制3T3-L1前脂肪细胞分化并促进米色脂肪细胞形成[J].中国公共卫生,2021,37(5):845-848.
- [16] 高晚霞,华端仪,雷丽云,等.芦丁在糖尿病中的作用及其机制[J].湖北科技学院学报(医学版),2021,35(1):87-89.

- [17] 韩晶晶, 吴俊丽, 张峰. 芦丁神经保护作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(7):922-924.
- [18] ZAXERI G, RIBEIRO Povinelli AP, PAVAN NM, et al. Experimental studies and computational modeling on cytochrome C reduction by quercetin: the role of oxidability and binding affinity[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1244:130995.
- [19] TIAN CL, LIU X, CHANG Y, et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin [J]. South African Journal of Botany, 2021, 137:257-264.
- [20] BAGHERI A, EBRAHIMPOUR S, NOURBAKHSH N, et al. Protective effect of quercetin on alteration of antioxidant genes expression and histological changes in the dental pulp of the streptozotocin-diabetic rats [J]. Archives of Oral Biology, 2021, 125:105088.
- [21] 曾钰鹏, 卢晓丹, 李国坤, 等. 槲皮素对高脂饮食诱导肥胖小鼠结肠炎症的改善作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9):25-30.
- [22] CHEN L, LIU JJ, MEI GB, et al. Quercetin and non-alcoholic fatty liver disease: A review based on experimental data and bioinformatic analysis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 154:112314.
- [23] FUKAYA M, SATO Y, KONDO S, et al. Quercetin enhances fatty acid β - oxidation by inducing lipophagy in AML12 hepatocytes[J]. Heliyon, 2021, 7:e07324.
- [24] LIU Y, LI CL, XU QQ, et al. Quercetin inhibits invasion and angiogenesis of esophageal cancer cells [J]. Pathology - Research and Practice, 2021, 222 :153455.
- [25] RIAZ M K, ZHANG X, WONG K H, et al. Pulmonary delivery of transferrin receptors targeting peptide surface-functionalized liposomes augments the chemotherapeutic effect of quercetin in lung cancer therapy [J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14:2879-2902.
- [26] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, SASI A K, et al. The impact of the phytotherapeutic agent quercetin on expression of genes and activity of signaling pathways [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 141:111847.
- [27] LIA F, JIAN HM, XIAO J, et al. The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent [J]. Food Research International, 2018, 111:351-360.
- [28] 余增丽, 张立实, 吴德生. 植物雌激素对乳腺癌细胞 MCF-T 增殖的影响[J]. 营养学报, 2002, 24(4):401-404.
- [29] WU J, WANG XX, TAKASAKI M, et al. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2001, 16(10):1829-1836.
- [30] SCHRADER C, ERNST IMA, Sinnecker H, et al. Genistein as a potential inducer of the anti-atherogenic enzyme paraoxonase-1: studies in cultured hepatocytes in vitro and in rat liver in vivo [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012, 16(10):2331-2341.
- [31] ZHANG Q, CAO WS, WANG XQ, et al. Genistein inhibits nasopharyngeal cancer stem cells through sonic hedgehog signaling [J]. Phytotherapy Research, 2019, 33:2783-2791.
- [32] SEKASR V, ANANDASADAGOPAN SK, GANAPASAM S. Genistein regulates tumor microenvironment and exhibits anticancer effect in dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis [J]. Biofactors, 2016, 42(6):623-637.
- [33] AZIZ SA, WAKELING LA, MIWA S, et al. Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(2):1600574.
- [34] 韩正康. 异黄酮植物雌激素-大豆黄酮对雄性动物生长及其有关内分泌的研究[J]. 畜牧与兽医, 1999, 31(1):1-2.
- [35] 李颖平, 庞全海, 秦红, 等. 芦丁对 AA 肉鸡生长性能肉鸡生长性能、血清生化指标和肉鸡腹水综合征的影响[J]. 中国家禽, 2019, 41(17):30-33.
- [36] 朱安南, 张克英, 王建萍, 等. 饲料中添加不同水平芦丁对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质及蛋清凝胶特性的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(3):1451-1460.
- [37] 王密. 槲皮素调节肉鸡脂质代谢的信号转导机制[D]. 博士学位论文. 哈尔滨:东北农业大学, 2020.
- [38] 王盛楠. 槲皮素对 AA 肉鸡蛋白质消化利用的作用及机制 [D]. 硕士学位论文. 哈尔滨:东北农业大学, 2018.
- [39] 刘莹. 槲皮素对蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[D]. 硕士学位论文. 哈尔滨:东北农业大学, 2013.
- [40] 易先国. 染料木素与抗生素对肉鸡生产性能、肌肉氧化稳定性和空肠形态的影响[J]. 中国饲料, 2020, 4(14):36-40.
- [41] 孟婷, 左伟勇, 王健, 等. 染料木素对肉鸭屠宰性能及脂肪代谢的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(12):207-209.
- [42] 吴琳. 三种抗氧化剂对猪精子保存效果的研究[D]. 硕士学位论文. 咸阳市:西北农林科技大学, 2019.
- [43] 王畅. 芦丁干预猪链球菌生物被膜形成对荚膜多糖含量和结构的影响[D]. 硕士学位论文. 哈尔滨:东北农业大学, 2017.
- [44] 姚佳颖, 毛彦军, 王杉杉, 等. 槲皮素对猪肠上皮细胞利用蛋白质的作用机制[J]. 动物营养学报, 2021, 33(1):553-562.
- [45] ZOU Y, WEI K, XIANG Q H, et al. Protective effect of quercetin on pig intestinal integrity after transport stress is associated with regulation oxidative status and inflammation [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(9):1487-1494.
- [46] 贾娜, 孙嘉, 刘丹, 等. 槲皮素对氧化条件下猪肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(10):45-51.
- [47] KANG JT, KWON DK, PARK SJ, et al. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels [J]. Journal of Veterinary Science, 2013, 14(1):15-20.
- [48] 吴国云. 染料木素和双酚 A 对雌性动物生殖的影响[D]. 博士学位论文. 南京:南京农业大学, 2019.
- [49] FARMER C, ROBERTSON P, XIAO CW, et al. Exogenous genistein in late gestation: effects on fetal development and sow and piglet performance [J]. Animal, 2016, 10(9):1423-1430.

胆汁酸受体介导胆汁酸调控肠道屏障功能的机制

杨亚慧^{1,2}, 覃丽梅^{1*}, 朱晓萍¹, 杨雪芬^{2*}

(1. 佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东 佛山 528000;

2. 广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 农业农村部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东省畜禽育种与营养重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:肠道屏障是动物维持机体稳态的重要基础, 许多因素均可破坏其完整性, 进而导致细菌、病毒侵袭, 引发全身性疾病。胆汁酸作为胆汁的重要成分, 由肝以胆固醇为原料进行合成, 能在外源食物及相关激素的刺激下与胆汁一同被排入消化道内。胆汁酸不仅具有脂肪乳化、促进肠道吸收脂质、调节肝脏功能、增加能量消耗等功能, 还对维持肠道稳态具有重要作用。胆汁酸受体在动物体内各个脏器均有分布, 经胆汁酸或胆汁酸类似物激活后发挥其生理作用, 而且在不同的脏器中发挥作用的机制有所不同, 在肠道内, 主要是通过胆汁酸与胆汁酸受体以及肠道菌群来共同调节肠道稳态, 三者相互作用, 又相互制衡。本文主要综述了胆汁酸及其受体在动物肠道屏障功能稳态中的作用及其内在机制。

关键词: 胆汁酸; 胆汁酸受体; 肠道稳态

中图分类号: S815.1 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)04-0047-08

The mechanism of bile acid receptors mediate the bile acid regulation of intestinal barrier function

YANG Yahui^{1,2}, QIN Limei^{1*}, ZHU Xiaoping¹, YANG Xuefen^{2*}

(1. School of Life Science and Engineering, Foshan University of Science and Technology, Foshan 528000, China;

2. State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Intestinal barrier is an important basis for animals to maintain homeostasis. Many factors can destroy the integrity of intestinal barrier, leading to bacterial and viral invasion and systemic diseases. Bile acid, as an important component of bile, is synthesized from the liver with cholesterol as raw material and can be discharged into the digestive tract together with bile under the stimulation of exogenous food and related hormones. Bile acids not only emulsify fat, promote intestinal absorption of lipid, regulate liver function, increase energy consumption and other functions, but also play an important role in maintaining intestinal homeostasis. Bile acid receptor are distribution in

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 广东省农业科学院中青年学科带头人培养项目(R2020PY-JX007); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系, 广州市科技计划项目(201906010021); 广东省省级乡村振兴战略专项(饲料添加剂退出技术研究)

作者简介: 杨亚慧(1996-), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 主要研究方向: 猪营养与饲料。E-mail: 1369353049@qq.com

*通讯作者: 覃丽梅, 女, 副教授, 主要从事畜禽动物疫病防控研究。E-mail: 20039416@qq.com; 杨雪芬(1984-), 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: yangxuefen@gdaas.cn

the animal internal organs in the body, after bile acid or bile acid analogues activation play a physiological role, and play a role in different organs of mechanism is different, in the intestinal tract, mainly through the bile acid and bile acid receptor and intestinal flora in regulating intestinal steady state, the three interactions, and checks and balances. This review focuses on the roles and mechanisms of bile acids and their receptors in intestinal barrier homeostasis.

Keywords: Bile acid; Bile acid receptor; The intestinal steady-state

肠道是动物对食物进行消化吸收的主要场所,也是天然的屏障体系。胆汁酸在食物脂肪消化吸收过程中发挥重要作用,同时也通过激活其受体调控肠道屏障功能。

胆汁酸是胆汁的活性成分,是两亲性分子,既具有亲水性、也具有亲脂性,胆汁酸能够乳化脂肪形成胶束,从而促进脂质和脂溶性维生素的消化和吸收^[1]。此外,胆汁酸可以抑制肠道菌群的过度生长,防止其他有害菌入侵,对维持肠道菌群平衡和肠道屏障功能具有一定作用^[2]。

1 胆汁酸的合成代谢

胆汁酸是由肝细胞利用胆固醇合成的,是肝脏清除固醇类物质的主要途径^[3]。胆汁酸的主要生成方式包括经典途径和替代途径(图1)。经典途径是胆固醇在肝脏中经初级限速酶7 α -羟化酶(7YP7A1)作用转化为7 α -羟胆固醇,然后被特定的甾体脱氢酶转化为7 α -羟基-4-胆甾-3-酮(C4)。固醇12 α -羟化酶(CYP8B1)可羟基化C4并产生胆酸(CA)。在无CYP8B1的情况下,C4将会转化成鹅脱氧胆酸(CDCA)。在替代途径中,固醇27-羟化酶(CYP27A1)对胆固醇C27进行羟基化,将胆固醇转化为27-羟化胆固醇和3 β -羟化-5-胆甾酸,再由羟化胆固醇-7 α -羟化酶(CYP7B1)在7 α 位置进行羟基化,并产生各种甾醇,转运到肝脏,转化为鹅脱氧胆酸(CDCA)和胆酸(CA)^[6-7]。通过上述2种途径合成的胆汁酸均被称为初级胆汁酸。替代途径主要将胆固醇转化为CDCA(但也产生CA),并被认为仅在特定环境下起作用。鹅脱氧胆酸、胆酸与甘氨酸、牛磺酸结合生成结合型胆汁酸盐,然后分泌到胆汁之后运到小肠。人体内游离的胆汁酸与结合胆汁酸的比例约为3:1,而啮齿动物体内95%的胆汁酸是结合型胆汁酸。胆汁酸盐随胆汁经胆小管排到肠道,后经肠道菌水解、脱羟转化为

去氧胆酸和石胆酸^[4]。

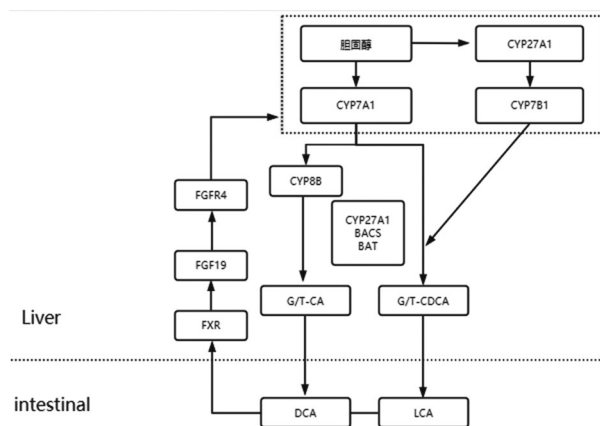


图1 胆汁酸肝肠循环

排入肠道的胆汁酸(包括初级、次级、结合型、游离型)95%以上被重吸收利用,胆汁酸的肠肝循环是由肝脏和肠道内的几种胆汁酸转运蛋白共同完成的,并受到FXR-SHP(FXR, Small Heterodimer Partner, SHP:小异二聚体配体,属于核受体超家族成员)和FGF15-FGFR4通路的调控。肠道激素成纤维细胞生长因子19(FGF19)是维持胆汁酸稳态的肠-肝轴的核心组成部分^[5]。FGF19是由肠道中FXR的激活诱导的,然后到达肝脏,在肝脏中激活肝细胞上的FGFR4- β Klotho受体复合物,以抑制胆汁酸的合成^[6]。在肝脏中,初级胆汁酸合成后,主要通过胆盐出口泵(Bile Salt Export Pump: BSEP)转运蛋白排出到胆小管。在回肠被顶端钠依赖性胆盐转运体(Apical Sodium dependent Bile salt Transporter: ASBT)主动重新吸收后,这些类固醇中的大部分通过门静脉血液转运回肝脏。各种胆汁酸通过异二聚体有机溶质转运体 α 和 β (OST α/β)从基底外侧膜的肠上皮细胞排出,它们在肝脏的再摄取由Na⁺牛磺胆盐共转运体(Na⁺ taurocholate

cotransporting polypeptide, NTCP)介导,完成一个肠-肝循环的循环。逃出回肠重吸收的胆汁酸到达结肠,被肠道微生物代谢为次级胆汁酸,次级胆汁酸仍可在结肠中被动吸收。最后胆汁酸被肾小球过滤,然后在肾小管中被重新吸收,再次限制了损失。在回肠末端,FXR激活后可以通过回肠上皮细胞诱导SHP的表达和FGF19的产生,在肝细胞中,FXR负调控CYP7A1的表达。肝细胞中FXR的激活促进了SHP的转录。SHP是CYP7A1启动子上胆汁酸反应元件BARE-I和BARE-II转录因子的负调控因子。PXR、VDR和PAR α 通过竞争HNF4 α 与BARE-II结合抑制CYP7A1基因的转录。

2 胆汁酸受体介导胆汁酸调控肠道免疫屏障功能

胆汁酸由肝脏分泌到胆汁中,长期以来一直被简单地认为仅仅是脂肪的乳化剂^[7]。然而越来越多的证据表明,胆汁酸是一种复杂的信号分子,可激活各种核和膜结合受体^[8]。有两种主要的胆汁酸受体—核受体和G蛋白偶联受体,它们均能被胆汁酸特异性激活,核受体包括:FXR、VDR(NR1H1)、PXR(NR1H2)、CAR(NR1H3)、LXRs(NR1H3)、ROR γ T;G蛋白偶联受体:TGR5、毒蕈碱受体M2/M3、S1PR2等(表1)。在肠道中,FXR和TGR5的激活促进了FGF15/19和GLP1(Glucagon-like peptide 1:胰高血糖素样肽-1)的释放,这些信

表1 胆汁酸受体及其表达规律和作用靶向

胆汁酸受体	表达组织/细胞	识别的胆汁酸类型	作用靶向	参考文献
核受体				
FXR (NR1H4)	肝脏:肝细胞、肝星状细胞、枯否氏细胞、肝窦细胞	CDCA>CA > LCA > DCA	1.炎症状态下,通过FXR-FGF19-FGFR4-Erk1/2+JNK轴调控胆汁酸代谢。	郑伟莉等 ^[9] , Cariou等 ^[10] , jiang等 ^[11]
	小肠:肠上皮细胞		2.通过抑制FXR-NF- κ B以及FXR-STAT3通路来抑制肝内炎症的发生。	
	髓细胞:单核细胞/巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK)		3.FXR通过诱导SHP的表达抑制肝X受体和肝X受体诱导的SREBP-1c的激活,进而抑制了造脂酶的表,从而减轻肝的脂肪变性。	
	脂肪细胞 骨骼肌			
VDR (NR1H1)	小肠:小肠上皮细胞	LCA>DCA>CA	1.VDR可以通过激活SIRT1/Nrf2和抑制NF- κ B信号通路维持肠黏膜屏障功能的完整。	麦合木提等 ^[12] ,
	髓细胞:巨噬细胞 T细胞内分泌组织、肾脏、皮肤		2.VDR通过与HNF4 α 的相互作用,增加肝细胞中甘油三酯的转运从而改善非酒精性脂肪肝肝病	姚柏宇等 ^[13] , 张虹等 ^[14]
	胰腺:胰腺 β 细胞 肾小管:肾小管上皮细胞			
PXR (NR1H2)	肝脏:肝细胞	LCA、CDCA、DCA、CA	1.PXR激活可抑制NF- κ B炎症通路来缓解肠上皮屏障功能障碍	GARG等 ^[15] Zhang等 ^[16]
	肠:肠上皮细胞 肝脏:肝细胞			
CAR (NR1H3)	小肠	CA、LCA	1.CAR可能通过Yes相关蛋白以及Wnt- β -catenin等途径诱导肝细胞癌的发生。	Yoshinari等 ^[17] SHIN等 ^[18] DONG等 ^[19]
LXR α / β (NR1H3)	肝脏:肝细胞	LCA	(1)LXRs可诱导CYP7A1基因表达,促进初级胆汁酸的产生。	Song等 ^[20] , 陈莹等 ^[21]
	髓细胞:单核细胞/巨噬细胞。 脂肪细胞:卵母细胞		(2)LXR α 可以抑制炎症因子的表达和抑制细胞增殖。	
ROR γ T	淋巴样细胞:Th17,先天淋巴样细胞3(ILC3)	3-,12-oxo-LCA	(1)ROR γ T协调CD4 ⁺ T细胞的发育和功能。 (2)Th17细胞分化以及3型淋巴细胞(ILC3)产生和产生Th17A所必需的	Eberl等 ^[22] Lochner等 ^[23]

续表

胆汁酸受体	表达组织/细胞	识别的胆汁酸类型	作用靶向	参考文献
G蛋白偶联受体				
GPBAR1(TGR5)	小肠:肠细胞、内分泌细胞(L细胞)、Paneth细胞、肌间神经元、平滑肌		1.在巨噬细胞中通过激活	
	髓细胞:单核细胞/巨噬细胞 NKT细胞和树突细胞	LCA > DCA > CDCA>UDCA>CA	TGR5-AKT-mTOR通路抑制炎症反应	徐静娴等 ^[24] , 刘哲睿等 ^[25] POLs等 ^[26]
	肝脏:肝窦细胞、枯否氏细胞、 肝星状细胞 脂肪细胞		2.TGR5负调控NF-KB及STAT3通路从而抑制 肝脏炎症反应	
毒蕈碱的受体 M2 / M3	胆道:胆管细胞,胆囊 肝脏:肝细胞			
	心脏:细胞 中枢神经:神经元、平滑肌细胞	TLCA>TDCA>TCA	1.M3R可通过激活AMPK防止肝脂肪变性	刘等 ^[27] Jadeja等 ^[28]
S1PR2	胆道:胆管细胞		1.S1PR2可以通过激活ERK1/2和AKT信号通路 导致胆管癌细胞生长	Burg等 ^[29] , Cartier等 ^[30]
	肝脏:肝细胞	GCA、TCA、 GCDCA、TCDC GDCA、TDCA	2.在啮齿动物肝细胞中TCA可通过S1PR2激活 ERK1/2和AKT信号通路,AKT细胞通路的激活 对FXR的激活至关重要。	Studer等 ^[31]

注:CDCA:鹅脱氧胆酸;CA:胆酸;LCA:石胆酸;DCA:脱氧胆酸;3-,12-oxo-LCA:3,12-氧石胆酸;UDCA:熊去氧胆酸;TLCA:牛磺石胆酸;TDCA:牛磺脱氧胆酸;TCA:牛磺胆酸;GCA:甘氨胆酸;GCDCA:甘氨鹅脱氧胆酸;TCDC:牛磺鹅脱氧胆酸;GDCA:甘氨脱氧胆酸;TDCA:牛磺脱氧胆酸

号分子与组织中其他受体直接结合发挥作用,胆汁酸及其受体以及受体激活后刺激释放的各种信号分子形成复杂的网络调节结构,对细胞自噬、脂质和糖代谢、能量平衡和免疫反应等代谢过程的调节起至关重要的作用。

2.1 FXR

FXR于1995年由Forman等人鉴定,能被初级胆汁酸直接激活,且鹅脱氧胆酸(CDCA)被鉴定为人FXR的生理配体^[32]。VERBEKE等研究发现使用FXR激动剂INT-747可以通过上调紧密连接蛋白claudin-1、occludin、ZO-1的表达,来修复损伤的回肠黏膜上皮。用INT-747处理肝硬化小鼠发现,INT-747激活FXR受体后,回肠中促炎因子IL-10、INF- γ 显著减少^[33]。Wildenberg等发现巨噬细胞中的FXR信号被激活后促炎因子IL-1 β 、TNF α 的产生减弱^[34]。Gadaleta等发现在肠上皮细胞中也有类似的机制,FXR的激活几乎完全抑制TNF α 诱导的NF-kB转录活性^[35]。FXR在肠上皮细胞上也具有免疫调节特性,并响应非TLR介导的炎症信

号,在肠道炎症DSS(dextran sodium sulfate)模型中,INT-747在体内外均可降低肠道上皮细胞的通透性,并使促炎因子的表达下降。许等研究发现,FXR可通过上调细胞因子信号转导抑制蛋白SOCS(suppressor of cytokine signaling)家族中的CISH(cytokine inducible SH2-containing protein)和SOCS3的表达而抑制肝细胞炎症反应,SOCS分子可抑制活化蛋白1(activation protein 1, API)和核转录因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)等促炎信号通路。综上所述可知,FXR受体的激活,不仅可以上调紧密连接蛋白的表达,还可以抑制炎症的发生,对肠道屏障的保护具有重大意义^[36]。

2.2 VDR

维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)是配体激活的核转录因子,广泛分布于人类的小肠及结肠的肠黏膜上皮细胞内。Kong等实验研究发现,VDR通过维持连接复合体的完整性和结肠上皮细胞的愈合能力,在粘膜屏障稳态中发挥了关键作用,VDR基因敲除小鼠结肠粘膜出现严重的

溃疡,肠道的通透性增加,紧密连接蛋白(ZO-1)、咬合蛋白(Occludin)、水闸蛋白-1(Claudin-1)的表达均下降^[37-38]。Cantorna 等报导称VDR可能通过抑制结肠中的T细胞介导的免疫反应来降低IBD的风险^[39]。Liu 等研究发现上皮性VDR抗结肠炎的机制部分是通过下调促凋亡的关键调控因子p53上调凋亡调制物PUMA(P53up-regulated modulator of apoptosis; PUMA)来抑制上皮细胞凋亡,保护结肠黏膜屏障从而减少结肠炎症反应^[40]。BA还可以通过肠上皮细胞的维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)增加钙吸收^[41]。VDR通过哪种机制来调节紧密蛋白的表达,目前研究尚不清楚。

2.3 PXR

PXR属于核受体家族的一员。PXR可抑制CYP7A1基因的转录,从而影响初级胆汁酸的形成。PXR还能感知和响应各种化学刺激,包括肠道微生物代谢产物,是肠道上皮细胞的重要感受器,参与调节炎症反应,促进伤口愈合,维持正常及炎症条件下的屏障功能^[42-45]。Garg等研究发现,PXR活化可抑制NF- κ B信号通路,减轻炎症,从而缓解肠上皮屏障功能障碍;MENCARELLI等研究表明,PXR依赖性途径可抑制NF- κ B通路从而调节利福昔明对肠上皮细胞先天免疫反应^[26, 46]。在动物实验中发现PXR的激活可以阻止toll样受体4(TLR4)活化引起的屏障破坏。刺激Caco-2、IECs中的PXR可以防止TNF α /IFN γ 诱导的屏障破坏,这一效应与保护紧密连接有关。PXR刺激可减弱NF- κ B信号通路,降低TNF α /IFN γ 诱导的肌球蛋白轻链激酶(MLCK)表达和JNK1/2的激活,减轻葡聚糖硫酸钠盐诱导的肠上皮屏障功能的破坏^[13, 47]。PXR还通过诱导细胞色素氧化酶P450多药耐药相关蛋白2和3(MRP2, MRP3)表达促进胆汁酸的代谢,减轻由于胆汁酸蓄积导致的对细胞的毒性作用^[15]。PXR还可调节核受体过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators activated receptor, PPAR),通过直接或者间接的影响去调节PPARa的下游基因,从而影响肝脏脂变^[48]。

2.4 CAR

CAR是1994年发现的一种孤儿核受体,由NR NRI13基因编码,是核受体超家族中的一员,主要存在于肝脏和小肠。研究表明CAR可以直接活化PPARa的下游基因,从而影响肝脏脂变^[48]。Yoshinari等研究表明,在肝细胞中激活CAR可能

通过Yes相关蛋白以及Wnt- β -catenin等途径诱导肝细胞癌的发生^[17]。

2.5 LXR

LXRs是一种胆固醇传感器,在调节脂肪酸、胆固醇和葡萄糖代谢以及控制炎症中发挥关键作用。LXRs包括LXR- α 和LXR- β 2种同源亚型^[21]。LXRs可诱导CYP7A1基因表达,促进初级胆汁酸的产生^[49]。尼曼-匹克c1样蛋白(Niemann-Pick C1-like 1 protein; NCP1L1)是主要位于小肠刷状细胞边缘的一种蛋白,主要介导从管腔摄取胆固醇,NCP1L1敲除小鼠表现出明显的脂质吸收减少,同时对饮食诱导的高脂血症有相应的保护作用,Duva等发现LXRs的激活负调控NCP1L1的表达,从而减少胆固醇的吸收^[50-51]。B类清道夫受体I型(scavenger receptor class B type I; SR-BI)也参与胆固醇和甘油三酯的肠道吸收^[52]。Briand等在肠道细胞和小鼠中获得的结果表明,LXRs降低了SR-BI的活性^[53]。在多种细胞中,LXR激动剂都可以激活LXR- α ,并表现出对细胞增殖的抑制^[54]。

2.6 ROR γ T

ROR γ T属于核受体家族,在多种免疫细胞中选择性表达,从胸腺发育到包括肠道在内的外周淋巴组织成熟,ROR γ T在协调CD4⁺T细胞的发育和功能中起着中心作用^[55]。更重要的是ROR γ T是Th17细胞分化以及3型淋巴细胞(ILC3)产生和产生Th17A所必需的^[56]。Hang和Song研究表明氧胆酸,特别是3-oxo-LCA,可通过反向激动剂与ROR γ T结合^[57-58]。两组研究均表明,3-oxo-LCA与ROR γ T的结合降低了IL-17的生成和Th17细胞数量,并减轻了小鼠结肠炎模型中的肠道炎症^[59]。这些发现突出了ROR γ T逆激动剂或拮抗剂在调节炎症和脂肪组织和肝脏中的胰岛素敏感性方面的潜在作用,作用于肠道微生物和宿主免疫系统的界面。

2.7 TGR5

胆汁酸的受体中的G蛋白偶联受体5(TGR5),也被称为G蛋白偶联胆汁酸受体1,在2002年被发现,是一种免疫调节受体,影响先天免疫功能,并已被证实在肠道免疫耐受中发挥重要介导作用^[60-61]。Kawamata等发现胆汁酸能抑制肺泡巨噬细胞的吞噬功能及促炎细胞因子分泌^[62]。Keitel等的研究表明,胆汁酸或TGR5激动剂激活肝脏Kupffer细胞TGR5后,由LPS诱导

的TNF- α 、白介素-6(intedeukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)等促炎细胞因子表达水平明显下降^[63]。Hogenuer等研究发现,用TGR5激动剂激活人单核细胞TGR5后,炎症反应中TNF- α 、白介素-12(interleukin-12, IL-12)等促炎细胞因子分泌明显减少^[64]。配体与TGR5结合后引起G蛋白构象改变,激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA),PKA可通过促进c-Fos基因表达而减弱NF- κ B活性,抑制促炎细胞因子表达^[65]。由上可知TGR受体主要是通过抑制或减弱炎症的反应来保护机体。

2.8 毒蕈碱的受体M2/M3

M受体属于G蛋白偶联受体,通过与不同的G蛋白结合发挥不同的生理生化作用。胆汁酸可通过M2型毒蕈碱受体抑制心肌细胞的收缩^[66]。有研究发现,牛磺胆酸(taurocholate, TC)与乳鼠心肌细胞上M2型毒蕈碱受体结合并相互作用,使细胞内CAMP数量减少,并产生心律失常。胆汁酸可通过M2受体途径诱导心肌细胞内钙离子浓度的瞬时性变化。M3毒蕈碱受体激活可通过CaMKK β /AMPK途径减少肝细胞脂质积聚^[67]。由上可知,M2受体的激活,可导致机体发生异常,作用通路有待进一步验证,而M3受体的激活则可以减少肝细胞脂质积聚。

2.9 S1PR2

S1PR2属于G蛋白偶联受体家族的一员,研究发现S1PR2激活可促进胆管细胞增殖,缺乏S1PR2可显著减少胆管细胞增殖、炎症和肝纤维化^[68]。另有研究发现,TCA可以通过S1PR2激活啮齿动物肝细胞中ERK1/2和AKT信号通路,AKT通路的激活对于共轭胆汁酸对核受体FXR的最佳激活至关重要。使用特异性慢病毒shRNA下调S1PR2表达,可显著抑制结合胆汁酸激活ERK1/2和AKT信号通路。

3 小结

胆汁酸受体在几种先天性免疫细胞中表达,免疫、遗传和药理学研究表明,它们参与调节这些细胞对细菌和内源性抗原的反应。FXR在胆汁酸合成和体内平衡的调节中起着关键作用,TGR5已被认为介导肠道免疫耐受,PXR可减轻葡聚糖硫酸钠盐诱导的肠上皮屏障功能的破坏,促进次级毒性胆汁酸的代谢,减轻胆汁酸对细胞的毒性作

用,VDR通过维持连接复合体的完整性和结肠上皮细胞的愈合能力,在粘膜屏障稳态中发挥了关键作用,LXR、ROR γ T、S1PR2等在多种免疫细胞中选择性表达,在调节胆汁酸代谢控制炎症方面起着不可替代的作用。胆汁酸作为饲料添加剂在生产应用比较少,因为胆汁酸的最佳作用浓度、不同单体间的相互作用以及不同受体之间的相互联系等研究尚不明确,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] BARRASA J I, OLMO N, LIZARBE M A, et al. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27:964-977.
- [2] FERRELL J M, CHIANG J Y L. Understanding bile acid signaling in diabetes: from pathophysiology to therapeutic targets *Diabetes Metab*[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2019, 43 :257-272.
- [3] CHIANG J Y L. Bile acids: regulation of synthesis[J]. *Journal of Lipid Research*, 50 (2009):1955-1966.
- [4] SHIFFKA S J, KANE M A, SWAAN P W, et al. bile acids in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859:2269-2276.
- [5] KLEWER S A, MANGELSDORF D J. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway Digestive diseases[J]. *Digestive Diseases* 2015, 33:327-331.
- [6] STEFANO F, ELEONORA D, ADRIANA C, et al. Bile acids and their receptors in metabolic disorders [J]. *Progress In LipidResearch*, 2021, 82.
- [7] RAO A, HAYWOOD J, CRADDOCK A, et al. The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. [J]. *Proceedings Of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(10):3891-3896.
- [8] COPPLE B L, Li T G. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules[J]. *Pharmacological Research*, 2016, 104:9-21.
- [9] 郑伟莉. 基于天然产物配体核受体FXR调控的分子机制和结构机理研究[D]. 厦门:厦门大学, 2016.
- [10] CARIOU B, HARMELEN K V, DURAN S D, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice [J]. *Journal Of Biological Chemistry*, 2006, 281: 11039-11049.
- [11] JIANG T, WANG X X, SCHERZER P, et al. Farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism, fibrosis and diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2485-2493.
- [12] 苏丽坦古丽·麦合木提, 周辛欣, 季峰. 维生素D及其受体在炎症性肠病相关肠纤维化中的作用研究进展[J]. *浙江学报*, 2021, 43(1):102-106, 111.
- [13] 姚柏宇. 石胆酸对肠黏膜屏障功能的影响及其机制研究[D].

- 沈阳:中国医科大学, 2020.
- [14] 张虹. 维生素D在非酒精性脂肪性肝病中的作用及其机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2020.
- [15] GARG A, ZHAO A, ERICKSON S L, et al. Pregnane X receptor activation attenuates inflammation-associated intestinal epithelial barrier dysfunction by inhibiting cytokine induced myosin light-chain kinase expression and c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2016, 359(1):91-101.
- [16] ZHANG B, XIE W, KRASOWSKI M D. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. [J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(11): 1695-1709.
- [17] YOSHINARI K. Role of Nuclear Receptors PXR and CAR in Xenobiotic Induced Hepatocyte Proliferation and Chemical Carcinogenesis [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 42(8):1243-1252.
- [18] SHIN D J, WANG L. Bile acid-activated receptors: A review on FXR and other nuclear receptors [J]. *Handbook of experimental pharmacology*, 2019, 256: 51-72.
- [19] DONG B, LEE J S, PARK Y Y, et al. Activating CAR and β -catenin induces uncontrolled liver growth and tumorigenesis [J]. *Nature Communications*, 2015, 6:5944.
- [20] BI X, SONG J, GAO J, et al. Activation of liver X receptor attenuates lysophosphatidylcholine-induced IL-8 expression in endothelial cells via the NF- κ B pathway and SUMOylation [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, 20:2249-2258.
- [21] 陈莹, 张益, 李聪. 不同浓度 ox-LDL 对大鼠原代卵磷脂膜细胞增殖及激素合成相关基因 LXR- α 和 StAR 表达的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(3):318-324.
- [22] EBERL G, MARMON S, SUNSHINE M J, et al. An essential function for the nuclear receptor ROR γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer [J]. *Nature Immunology*, 5 (2004):64-73.
- [23] LOCHNER M, OHNMACHT C, PRESLEY L, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LTi cells [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(2011):125-134.
- [24] 徐静娴, 陆伦根, 周慧. 胆汁酸受体在胃肠道炎症和肿瘤发生中的作用 [J]. *胃肠病学*, 2020, 25(9):556-559.
- [25] 刘哲睿, 贾晓东, 陆荫英. 肝细胞癌相关胆汁酸代谢失衡及调控机制的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(3): 690-694.
- [26] POLS T W, NOMURA M, HARACH T, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 14(6):747-757.
- [27] 刘俊杰, 邵勇, 何芳. 胆汁酸对哺乳动物心脏功能的影响及调节机制研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2014, 18(2):167-172.
- [28] JADEJA R N, CHU X, WOOD C, et al. M3 muscarinic receptor activation reduces hepatocyte lipid accumulation via CaMKK β /AMPK pathway [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2019, 169:113613.
- [29] BURG N, SWENDEMAN S, WORGALL S, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Signaling Maintains Endothelial Cell Barrier Function and Protects Against Immune Complex-Induced Vascular Injury [J]. *Arthritis & rheumatology*, 2018, 70(11): 1879-1889.
- [30] ANDREANE C, LIU L T, CATHERINE H, et al. Endothelial sphingosine 1-phosphate receptors promote vascular normalization and antitumor therapy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(6):3157-3166.
- [31] STUDER E, ZHOU X Q, ZHAO R P, et al. Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2012, 55(1):267-276.
- [32] CHAWLA A, REPA J J, EVANS R M, et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files [J]. *Science*, 2001, 294(5548):1866-1870.
- [33] VERBEKE L, FARRE R, VERBINNEN B, et al. The FXR Agonist Obeticholic Acid Prevents Gut Barrier Dysfunction and Bacterial Translocation in Cholestatic Rats [J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(2):409-419.
- [34] WILDENBERG M E, VAN D B G R. FXR activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in IBD [J]. *Gut*, 2011, 60(4):432-433.
- [35] GADALETTA R M, VAN E K J, OLDENBURG B, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2011, 60(4):463-472.
- [36] 许志臻. 核受体 FXR 通过上调 CISH 和 SOCS3 表达而抑制肝细胞炎症反应的研究 [D]. 博士学位论文. 重庆:第三军医大学, 2012.
- [37] WANG Y, ZHU J, DELUCA H F. Where is the vitamin D receptor? [J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2012, 523(1):123-133.
- [38] KONG J, MUSCH M W, ZHANG Z. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier [J]. *American Journal of Physiology*, 2008, 294:G208-G216.
- [39] CANTORNA M T, MUNSICK C, BEMISS C, et al. 25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease [J]. *The Journal of nutrition*, 2000, 130(11):2648-2652.
- [40] LIU W, CHEN Y, GOLAN M A, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(9):3983-3996.
- [41] HASHIMOTO N, MATSUI I, ISHIZUKA S, et al. Lithocholic acid increases intestinal phosphate and calcium absorption in a vitamin D receptor dependent but transcellular pathway independent manner [J]. *Kidney International*, 2020, 97(6): 1164-1180.
- [42] VENKATESH M, MUKHERJEE S, WANG H, et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4 [J]. *Immunity*, 2014, 41(2):296-310.

- [43] MA X, SHAH Y M, GUO G L, et al. Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator [J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 322(1):391-398.
- [44] MENCARELLI A, RENGA B, PALLADINO G, et al. Inhibition of NF- κ B by a PXR-dependent pathway mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 668(1-2):317-324.
- [45] TERC J, HANSEN A, ALSTON L, et al. Pregnane X receptor agonists enhance intestinal epithelial wound healing and repair of the intestinal barrier following the induction of experimental colitis [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 55:12-19.
- [46] MENCARELLI A, RENGA B, PALLADINO G, et al. Inhibition of NF- κ B by a PXR-dependent pathway mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 668(1-2):317-324.
- [47] SHAH Y M, MA X, MORIMURA K, et al. Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF- κ B target gene expression [J]. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 292(4):G1114-G1122.
- [48] 肖梦宇. 胆汁酸代谢及相关核受体研究进展 [J]. *中国城乡企业卫生*, 2014, 29(3):13-14.
- [49] COSTET P, LUO Y, WANG N, et al. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(36):28240-28245.
- [50] DAVIES J P, SCOTT C, OISHI K, et al. Inactivation of NPC1L1 Causes Multiple Lipid Transport Defects and Protects against Diet-induced Hypercholesterolemia [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(13):12710-12720.
- [51] DUVAL C, TOUCHE V, TAILLEUX A, et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(4):1259-1263.
- [52] BIETRIX F, YAN D, NAUZE M, et al. Accelerated Lipid Absorption in Mice Overexpressing Intestinal SR-BI [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(11):7214-7219.
- [53] BRIAND O, TOUCHE V, COLIN S, et al. Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1 [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(3):650-658.
- [54] FUKUCHI J, KOKONTIS J M, HIPAKKA R A, et al. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(21):7686-7689.
- [55] JETTEN A M, TAKEDA Y, SLOMINSKI A, et al. Retinoic acid-related orphan receptor γ (ROR γ): Connecting sterol metabolism to regulation of the immune system and autoimmune disease [J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2018, 8:66-80.
- [56] LOCHNER M, OHNMACHT C, PRESLEY L, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LTI cells [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2011, 208(1):125-134.
- [57] HANG S, PAIK D, YAO L, et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation [J]. *Nature*, 2019, 579(7798):E7-E7.
- [58] SONG X, SUN X, OH S F, et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ + regulatory T cell homeostasis [J]. *Nature*, 2020, (577):410-415.
- [59] RAYMOND H E, LABADIA M, WAHLE J, et al. An ROR γ t oral inhibitor modulates IL-17 responses in peripheral blood and intestinal mucosa of Crohn's disease patients [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:2307.
- [60] MARUYAMA T, MIYAMOTO Y, NAKAMURA T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 298(5):714-719.
- [61] SIPE L M, CHAIB M, PINGILI A K, et al. Microbiome, bile acids, and obesity: How microbially modified metabolites shape anti-tumor immunity [J]. *Immunological Reviews*, 2020, 295(1):220-239.
- [62] KAWAMATA Y, FUJII R, HOSOYA M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11):9435-9440.
- [63] KEITEL V, DONNER M, WINANDY S, et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(1):78-84.
- [64] HOGENAUER K, ARISTA L, SCHMIEDEBERG N, et al. G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 (GPBAR1, TGR5) Agonists Reduce the Production of Proinflammatory Cytokines and Stabilize the Alternative Macrophage Phenotype [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(24):10343-10354.
- [65] YONENO K, HISAMATSU T, SHIMANURA K, et al. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease [J]. *Immunology*, 2013, 139(1):19-29.
- [66] 刘俊杰, 邵勇, 何芳. 胆汁酸对哺乳动物心脏功能的影响及调节机制研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2014, 18(2):167-172.
- [67] JADEJA R N, CHU X, WOOD C, et al. M3 muscarinic receptor activation reduces hepatocyte lipid accumulation via CaMKK β /AMPK pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 169:113613.
- [68] WANG Y, AOKI H, YANG J, et al. The role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in bile acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2017, 65(6):2005-2018.

轮状病毒感染及其免疫逃逸与疫苗研究进展

许汪^{1,2}, 王贵平^{1,2,3}, 瞿孝云⁴, 贾爱卿^{1,2,3*}

- (1. 广东海大畜牧兽医研究院有限公司, 广东 广州 511400;
2. 广东省养猪与猪病防控技术研究企业重点实验室, 广东 广州 511400;
3. 广东海大集团股份有限公司, 广东 广州 511400;
4. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:轮状病毒感染可使感染者(人或动物)出现严重的腹泻, 年龄较小、较大或免疫系统功能障碍的感染者都可能出现严重脱水等症状, 严重者可导致死亡。全球每年约20万婴幼儿因轮状病毒感染而死亡, 给世界公共卫生事业带来巨大挑战。同时, 在农业生产方面, 猪、牛、羊等关乎民生的经济动物的幼仔, 也会因感染轮状病毒而死亡, 对养殖业造成一定的经济损失。本文从轮状病毒的基因组特征、感染与增殖特点、诱导机体的免疫应答以及疫苗现状进行了总结, 为开发轮状病毒相关疫苗或治疗药物提供借鉴。

关键词:轮状病毒; 免疫逃逸; 感染与增殖; 疫苗

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2022)04-0055-04

Research progress of rotavirus infection, immune escape and relevant vaccine development

XU Wang^{1,2,3}, WANG Guiping^{1,2,3}, QU Xiaoyun⁴, JIA Aiqing^{1,2,3}

- (1. Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou Guangdong 511400;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research on the Technology of Pig-breeding and Pig-disease prevention, Guangzhou Guangdong 511400;
3. Guangdong Haid Group Co., Ltd, Guangzhou Guangdong 511400;
4. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Rotavirus infection can cause severe diarrhea in infected individuals (humans or animals), and young individuals or those who are old or with compromised immune system can develop symptoms such as severe dehydration or even death in severe cases. In the world, approximately 200,000 youngest died from rotavirus infection each year, posing a substantial challenge to the world public health. In addition, cubs of production animal of our interests such as piglet, beef calf, sheep lamb may also die from rotavirus, causing economic losses to the production animal industry to a certain extend. In this review, we summarized the genomic characteristics of rotavirus, characteristics of infection and proliferation, the immune response induced in the organism, and the current state of the vaccine research, providing reference on the development of rotavirus vaccines or therapeutics.

Keywords: Rotavirus; Immune evasion; Infection and proliferation; Vaccine

收稿日期:2021-03-24

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2019B020218004);广州市科学研究计划重点项目(201804020006);番禺区创新创业领军团队项目(2017-R02-4);广东省科技计划项目(2020B1212070023);韶关市生猪优势产业园

作者简介:许汪(1991-),男,博士研究生,研究方向:动物病毒学。E-mail: xushanwang@yeah.net

*通讯作者:贾爱卿(1979-),女,高级兽医师,研究方向:预防兽医学。E-mail: 59492815@qq.com;瞿孝云(1982-),女,实验师,研究方向:动物传染病学。E-mail: qxy0926@126.com

轮状病毒(Rotavirus, RV)是呼肠孤病毒科(Reoviridae)、轮状病毒属成员,可以感染各年龄段的人或动物,对于5岁以内儿童或动物幼仔的致病性最强,可导致严重的急性腹泻,甚至脱水死亡,医疗卫生条件较差的地区尤为严重。轮状病毒的流行与暴发给世界公共卫生以及社会经济发展带来巨大的影响。轮状病毒的流行一般具有显著的地域性和季节性,在温带地区一般会在冬季发生,而在热带地区则全年均可发生。

1 轮状病毒基因组结构与分类

轮状病毒属于dsRNA病毒,基因组包含11段长度不一的dsRNA,共编码6个结构蛋白和6个非结构蛋白。其中,除了第11段编码NSP5和NSP6的dsRNA为双顺反子结构外,其余均为单顺反子结构。

根据VP6蛋白的免疫原性将轮状病毒分为8个公认血清型(RVA-RVH)和2个待定血清型(RVI、RVJ),其中RVA又分为4个亚血清型(SG I、SG II、SG+ II、SG nonI/nonII)和两个亚基因型。根据不同毒株的VP4和VP7蛋白的差异又可分为35个G基因型,50个P基因型,其中G1P^[8]型RVA在全球流行最广。而目前最为流行的轮状病毒分类方法是Matthijnsens和他的同事建立的基于全基因组的分类和命名方法,将11段dsRNA分别命名为G、P、I、R、C、M、A、N、T、E、H,对应蛋白分别为VP7、VP4、VP6、VP1、VP2、VP3、NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5、NSP6,共分为35 G(VP7)、50 P(VP4)、24 I(VP6)、14 R(VP1)、18 C(VP2)、17 M(VP3)、28 A(NSP1)、17 N(NSP2)、19 T(NSP3)、24 E(NSP4)、19 H(NSP5)基因型。全基因组命名系统为研究不同毒株之间的遗传多样性带来了极大的便利。WHO的监测数据显示G1型RV在全球的分布范围最广,几乎在各个地区均为优势毒株,G9型和G8型RV在全球的分布次之,G12型RV主要分布在地中海东部、东南亚地区,G3型RV在西太平洋地区分布较广^[1]。

2 轮状病毒的感染与复制

一般来讲轮状病毒主要在肠道黏膜上皮细胞中定殖,但也有报道称轮状病毒可以在肝脏、胆

囊、胰腺、肾脏、心脏、肺、甚至中枢神经系统等肠道外定殖和传播,并引起病毒血症等症状^[2,3]。由于轮状病毒分型比较多,不同亚型之间的差异也比较大,导致不同亚型的病毒进入宿主细胞的途径也就有所差异,因此具体的轮状病毒进入宿主细胞的机制还不是非常明确。根据毒株的不同,目前被认可的进入途径大致可分为三种:网格蛋白介导的内吞途径、小窝蛋白介导的内吞途径或胞饮途径^[4-6]。

当轮状病毒进入小肠后,轮状病毒表面的VP8*蛋白与肠上皮细胞或小肠分泌细胞表面的糖脂类受体(如唾液酸、HBGAs等)结合,使细胞发生极化反应,随后在胰蛋白酶或糜蛋白酶的作用下,VP8*蛋白脱离刺突,暴露出VP5*蛋白的疏水区,并与细胞膜脂筏上的一些受体(如HSC70, Integrins等)结合,并使这些受体发生聚集;在网格蛋白等受体的作用下细胞膜内陷,形成囊泡包裹病毒颗粒并向胞内转移^[7];由于VP5*蛋白的作用,导致囊泡上各种组分分布不均匀,囊泡膜通透性增大,囊泡内的Ca²⁺向胞浆内渗透,随着囊泡内Ca²⁺浓度的降低,由VP7蛋白组成的病毒外层壳开始松散崩解^[9];紧接着,由于囊泡内的pH不断降低,导致VP5*蛋白结构发生重组,与囊泡膜接触的疏水区垂直旋转180°形成轴对称的三聚体结构,从而使囊泡膜被破坏,释放出双层壳颗粒(Double-layered particle, DLP)进入细胞质中。在轮状病毒颗粒的吸附与内化过程中,不同的病毒粒子具体与哪种受体结合具有较大的差异,但大部分毒株均可以与HSC70受体相互作用^[8]。

进入细胞质中的DLP作为病毒RNA转录的机器,在VP1和VP3的指挥下转录形成病毒的11种5'末端含有Cap结构的不同RNA(+),这些正链RNA的5'端通过DLP表面的五倍体轴对称结构区域的中心孔被释放到细胞质中,招募胞质中的翻译起始因子和核糖体亚基与之结合,开始蛋白质的翻译过程^[9-11]。此外,这些被释放到细胞质中的RNA(+)也要作为模板,去合成子代病毒的基因组,这一过程通常发生在内质网附近的高密度病毒胞浆(viroplasm)结构中^[12]。在病毒胞浆结构中还存在大量的VP1、VP2、VP3、VP6以及NSP2等蛋白,新合成的RNA(+)与VP1和VP3相互作用形成

复合物,并被归类聚集,随后VP2蛋白十聚体复合物与该复合物作用,初步形成单层壳颗粒(STP),RNA(+)在内壳中继续形成dsRNA。新形成的STP与VP6蛋白相互作用,形成DLP,并在内质网跨蛋白NSP4的作用下向内质网(endoplasmic reticulum, ER)内转移。在DLP向内质网转移的过程中或进入内质网后,VP4和VP7蛋白与DLP相互作用,形成TLP。TLPs在内质网囊泡中积聚,通过极化的细胞以胞吐的方式释放,或通过细胞裂解释放,而积聚在囊泡中被释放的病毒颗粒具有更强的感染力^[13]。至此,一个具有感染性的轮状病毒颗粒形成。

3 轮状病毒逃逸与机体的免疫应答

一般来讲,轮状病毒感染宿主是一个急性过程,会迅速引起宿主发生严重脱水,这一过程往往会持续数天。通过之前的研究发现,虽然RV能够有效的诱导IFN反应,但是一些复制效率高、感染性强的RV毒株对于干扰素效应并不敏感。此外,一些RV毒株在感染非易感物种时,比如用猴源RV去感染小鼠,由于种间隔离或宿主范围限制(Host range restriction, HRR)等因素的存在,RV的复制增殖效率也会大大降低,这种差异的存在主要与非同源RV毒株对于IFN等免疫应答反应的敏感性较强有关,也与非同源RV株VP4蛋白介导的病毒进入效率低有一定的关系^[14-15]。RRV(鼠轮状病毒)感染IFNAR1^{-/-}(I型IFN受体缺失)、IFNGR^{-/-}(II型干扰素受体缺失)、IFNAGR^{-/-}(I型和II型干扰素受体缺失)、STAT^{-/-}(STAT基因缺失)的小鼠模型,RRV的肠道内的复制增殖效率显著上升,并出现一些系统性疾病,尤其是在IFNAGR^{-/-}或STAT^{-/-}小鼠模型中尤为显著,在IFNAR1^{-/-}的小鼠模型中系统性疾病症状比较温和,而在IFNGR^{-/-}小鼠模型中没有观察到系统性疾病症状,这与肠道上皮细胞感染RV后I型IFN大量分泌,而II型IFN分泌相对较少的现象一致。研究发现,在IFNAR1^{-/-}、IFNAGR^{-/-}小鼠模型中STAT1介导的IFN- γ 应答反应受损,而STAT1介导的IFN- α 应答反应没有影响,这表明RRV感染的小鼠模型发生系统性疾病可能与I型IFN的大量分泌有关^[16-18]。

通常来讲,轮状病毒逃避干扰素抗病毒途径的4种机制:(1)病毒的NSP1能够发挥E3连接酶的作用,能够诱导蛋白酶体降解转录因子IRF3、IRF5、IRF7,阻止IFN的激活;(2)NSP1诱导蛋白酶体降解泛素化连接酶复合物蛋白 β -TrCP,导致I κ B复合物的稳定性变差,导致病毒激活的NF- κ B诱导IFN反应失败;(3)轮状病毒在增殖的过程中形成病毒胞质,阻断NF- κ B信号通路;(4)轮状病毒能够阻断STAT1和STAT2的核转运。轮状病毒抑制干扰素反应的具体途径取决于不同的毒株以及所感染的宿主细胞。

4 轮状病毒疫苗与免疫接种

目前所使用的RV疫苗大部分是活疫苗,主要包括异源性动物易感RV毒株、人-动物易感RV重组毒株、减毒人易感RV毒株。免疫途径多为口服,使其在肠道内能够模拟天然的RV感染,产生免疫应答反应。

牛轮状病毒RIT4237(G6P)是第一个用于人类轮状病毒感染的疫苗株,通过体外细胞传代至154代得到^[5]。通过对RIT4237疫苗的多年研究,人们也总结出一些适合于轮状病毒疫苗应用的原则:(1)口服疫苗,毒株的滴度越高越容易被吸收;(2)轮状病毒对于胃酸敏感,因此在使用的时候需要添加一些缓冲成分,以提高疫苗的摄取效率;(3)母乳喂养并不会减弱轮状病毒疫苗的效果,尤其是滴度较高的减毒活疫苗。该疫苗逐渐退出了市场,主要原因有:(1)该疫苗在发展中国家应用所能提供的保护效果并不好;(2)口服轮状病毒疫苗会影响脊髓灰质炎疫苗的效果,为了优先完成根除脊髓灰质炎的计划,而终止口服轮状病毒疫苗计划。牛轮状病毒WC-3(G6P^[7])株疫苗,虽然在英国地区的临床试验结果显示,保护效果仅有20%左右,但该疫苗的成功研发具有重要意义,他是第一个以人-牛轮状病毒重组毒株为主要成分研制并应用的疫苗。恒河猴RV(G3P^[5])毒株在猴肾细胞上进行9次传代后在猴胚肺细胞上经历7次传代后制成人用RV疫苗。该疫苗应用于人后可以提供有效的保护力,但接种者可能会出现发热等症状。随着进一步的研发,以RRV为主的RRV-TV四价疫苗,在1998年成为第一个被批准使用的用

于预防人轮状病毒疫苗。中国兰州疫苗研究所利用羊羔轮状病毒 LLR-37(G10P)制备的减毒活疫苗,在前期临床实验中并未表现出太大的优势,但该研究所目前仍继续对该疫苗进行研究^[5]。

在防治动物轮状病毒时多使用多联疫苗,如哈尔滨兽医研究所研发的猪 TGEV-PEDV-PRV 三联活疫苗,可同时预防猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻以及猪轮状病毒感染;美国 Ambico 公司的猪轮状病毒与猪传染性胃肠炎病毒二联弱毒苗等。牛 NCDV-lincoln(G6)型减毒疫苗是目前世界范围内唯一用于预防犊牛轮状病毒感染的商品化疫苗。

5 结论

动物感染轮状病毒往往会给消化系统带来严重的病理损伤,这种损伤甚至是不可逆转,从而影响动物的生长发育、饲料转化率等,导致饲养成本上升,经济效益降低。虽然目前的轮状病毒疫苗可以有效的降低轮状病毒感染导致的死亡,但是轮状病毒的致病机理目前并不完全清楚。如同源性和异源性病毒株对于宿主的选择性具体取决于什么;轮状病毒感染肠道上皮细胞,会优先表达 III 型 IFN,而 I 型 IFN 的表达与分泌会发生滞后现象,这一现象的原因与作用是什么;等等诸如此类的问题都需要进一步研究。因此,充分了解轮状病毒的基本特性,病毒逃避宿主免疫反应机制以及机体的防御与清除病毒策略,对于深入了解轮状病毒至关重要,对于研发更加安全高效的疫苗具有重要指导意义。

参考文献:

- [1] Banyai K, Laszlo B, Duque J, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs [J]. *Vaccine*, 2012, 30, Suppl 1: A122-A130.
- [2] Medici M C, Abelli L A, Guerra P, et al. Case report: detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism [J]. *Journal of Medical Virology*, 2011, 83(9): 1637-1640.
- [3] Blutt S E, Matson D O, Crawford S E, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia [J]. *PLoS Medicine*, 2007, 4(4): e121.
- [4] Crawford S E, Ramani S, Tate J E, et al. Rotavirus infection [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17083.
- [5] Diaz-Salinas M A, Romero P, Espinosa R, et al. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(3): 1658-1663.
- [6] Yamauchi Y, Helenius A. Virus entry at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(Pt 6): 1289-1295.
- [7] Nava P, Lopez S, Arias C F, et al. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells [J]. *Journal of Cell Scienc*, 2004, 117(Pt 23): 5509-5519.
- [8] Gutierrez M, Isa P, Sanchez - San Martin C, et al. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(18): 9161-9169.
- [9] Periz J, Celma C, Jing B, et al. Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid [J]. *PNAS*, 2013, 110(29): 12042-12047.
- [10] Ogden K M, Snyder M J, Dennis A F, et al. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3 [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(16): 9072-9085.
- [11] Richards J E, Desselberger U, Lever A M. Experimental pathways towards developing a rotavirus reverse genetics system: synthetic full length rotavirus ssRNAs are neither infectious nor translated in permissive cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74328.
- [12] Long C P, Mcdonald S M. Rotavirus genome replication: Some assembly required [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13 (4) : e1006242.
- [13] Santiana M, Ghosh S, Ho B A, et al. Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission [J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(2): 208-220.
- [14] Arnold M M, Sen A, Greenberg H B, et al. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(1): e1003064.
- [15] Feng N, Yasukawa L L, Sen A, et al. Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1 [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87 (15): 8307-8316.
- [16] Sen A, Rott L, Phan N, et al. Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(1): 41.
- [17] Feng N, Kim B, Fenaux M, et al. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(15): 7578-7590.
- [18] Takaoka A, Mitani Y, Suemori H, et al. Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains [J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2357-2360.

发酵木薯渣在畜禽生产中的应用研究进展

马旭东¹, 左清清¹, 孙海彦², 郑永清¹, 李伯松^{1*}

(1. 中国热带农业科学院广州实验站, 广东 广州 510140;

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省热带微生物资源重点实验室,
海南 海口 571011)

摘要:木薯渣是木薯加工淀粉或酒精过程中产生的副产物, 富含淀粉和纤维素等营养成分, 易产生霉变, 高纤维适口性差, 存在抗营养因子等限制了其在饲料中的应用。通过发酵手段, 可以改善木薯渣营养成分和适口性, 作为饲料原料应用在畜禽养殖中即可促进动物生产, 降低养殖成本, 又可实现资源利用减少环境污染。本文就发酵对木薯渣营养价值的改善及其在畜禽生产中的应用展开综述, 以期对发酵木薯渣的深入研究和开发利用提供参考。

关键词:木薯渣; 发酵; 营养价值; 畜禽; 生产应用

中图分类号:S816.6 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)04-0059-07

Research progress in the application of fermented cassava residue in livestock and poultry production

MA Xudong¹, ZUO Qingqing¹, SUN Haiyan², ZHENG Yongqing¹, LI Bosong^{1*}

(1. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Guangzhou Experimental Station, Guangzhou Guangdong 510140;

2. Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou Hainan 571101)

Abstract: Cassava residue is a by-product produced in the process of cassava processing starch or alcohol, which rich in nutritional ingredients, such as starch and cellulose. The cassava residue is easy to produce mildew and cause waste and pollution of resources. The poor palatability of high fiber and the existence of anti-nutritional factors limit its application in feed. Fermentation can increase the nutritional composition and palatability of cassava residue. Fermented cassava residue can be used as a feed material in livestock and poultry production to animal production, reduce breeding costs, and realize resource utilization and reduce environmental pollution. In this paper, the improvement of nutritional value of cassava residue by fermentation and its application in livestock and poultry production were reviewed, providing theoretical basis for further research and utilization of fermented cassava residue.

Keywords: Cassava residue; Fermentation; Nutritional value; Livestock and poultry production

木薯是大戟科木薯属植物, 一种淀粉类块根作物, 耐旱抗贫瘠, 广泛种植于非洲、美洲和亚洲

等 100 余个国家或地区, 是三大薯类作物之一, 被称为“淀粉之王”^[1]。木薯渣是木薯加工淀粉或酒

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 广州市科技计划项目(201904010201); 海南省自然科学基金青年基金项目(320QN304); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-11-GDLBS); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630112020001)

作者简介: 马旭东(1984-), 男, 助理研究员, 研究方向: 畜禽健康养殖、热带作物及副产物饲料化利用。E-mail: mxduanliao@163.com

*通信作者: 李伯松(1982-), 男, 副研究员, 研究方向: 木薯及农业废弃物综合利用。E-mail: 84490477@qq.com

精后的副产物。据统计,我国每年木薯经过加工产生的木薯渣可达150万吨。然而对木薯渣的利用相对较少,造成大量木薯渣被丢弃,既浪费资源又造成环境污染。木薯渣含有丰富的营养成分,主要以碳水化合物为主,其中无氮浸出物含量>60%,粗蛋白和粗脂肪含量较低^[2]。新鲜木薯渣含水量高达80%,不耐存储,不易运输而且容易霉变腐败。木薯渣作为饲料原料,因其粗灰分和粗纤维含量高,严重影响动物适口性和采食量,制约了木薯渣的饲料化利用^[3-4]。木薯渣营养成分见表1^[5]。

近年来,国家提出了“加大本土可利用饲料资源和非粮饲料原料开发力度,加快生物饲料开发应用,调整优化饲料配方结构”的要求,并制定了《饲料中玉米豆粕减量替代工作方案》。同时,随着微生物发酵技术的快速发展,发酵木薯渣也作为新型饲料原料被诸多研究学者所关注。经过微生物发酵,木薯渣中的纤维素、半纤维素和木质素被有效降解,氢氰酸显著降低,蛋白含量有所提升,还能产生消化酶和益生菌,大大提高了木薯渣的营养价值和适口性^[6]。畜禽饲料中添加适量的发酵木薯渣,既提高了木薯渣利用率,缓解饲料资源不足,还可改善畜禽生产性能,降低养殖成本^[7]。

1 发酵对改善木薯渣营养价值的研究

发酵木薯渣是指以木薯渣为主要原料,利用微生物发酵技术降低木薯渣中的粗纤维及抗营养因子的含量,在发酵过程中产生大量的消化酶、蛋白质、小肽、氨基酸、有机酸、维生素、微量元素等营养与激素类物质而形成的饲料原料。木薯渣经过微生物发酵后产生的代谢产物,不但对动物生长有一定的促进作用,还可延长饲料的保质期^[8]。

木薯渣蛋白质含量较低,粗纤维含量较高,营养成分及适口性问题限制了其在动物饲料中的应用。微生物发酵能改善木薯渣营养成分和品质,一定程度上降解木薯渣粗纤维含量,提高饲料蛋

白质含量(见表2)。鉴于木薯渣蛋白质含量较低,在微生物发酵过程中一般会补充一定比例的尿素或者硝酸铵、豆粕等作为微生物生长的氮源,以取得更好的发酵效果。木薯渣发酵过程中微生物生长不断消耗底物大量增殖并产生酶等,提高了发酵后木薯渣的粗蛋白含量。

发酵菌种多为霉菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌等,一方面分解纤维素,另一方面产生有益畜禽肠道健康的益生元,改善木薯渣风味和营养成分。在发酵方式上,有单菌发酵和混合菌发酵,目前多采用混合菌发酵,搭配得宜混合菌发酵可以充分复合各种酶的协同作用,弥补菌种间的缺陷,发酵效果优于单一菌种发酵,科研人员对发酵的菌种选择、发酵条件、发酵效果也做了大量研究工作(见表2)。

木薯渣发酵还能增加乳酸、乙酸、丙酸等有机酸含量,降低木薯渣pH,抑制有害菌生长,延长木薯渣贮藏期。同时也产生酸甜气味,改善饲料风味,提高木薯渣的适口性(见表3)。通常认为,发酵后的木薯渣pH在4.2以下较佳。

木薯渣中含有一定含量的氰化物、植酸、单宁、硝酸盐等多种抗营养因子,影响营养成分的吸收,对畜禽的生长发育有不利影响,过量摄入还会引起器官机能损坏甚至死亡^[18-20]。研究表明,通过微生物发酵,可以有效降低木薯相关产品中的抗营养因子的毒性(见表4)。发酵后的木薯相关产品,抗营养因子显著降低,氰化物含量远低于我国《饲料卫生标准》(GB 13078-2017)规定的木薯及其加工产品中氰化物含量(≤ 100 mg/kg),鉴于在单胃畜禽的配合饲料中发酵木薯渣比例一般在20%以下,氰化物含量对发酵木薯渣在畜禽中的应用限制影响不大。

综上,木薯渣经过发酵处理,营养价值和品质都得到了有效提升,并降低了抗营养因子含量,提高了发酵木薯渣在畜禽饲料中适宜添加量,有效促进了木薯渣在畜禽生产中的应用。

表1 木薯渣营养成分含量(干物质基础)

成分	粗蛋白(%)	粗脂肪(%)	粗纤维(%)	粗灰分(%)	无氮浸出物(%)	干物质(%)	消化能(MJ/kg)	代谢能(MJ/kg)
含量	4.92	1.96	14.46	23.36	47.72	92.42	8.3	6.08

表2 木薯渣发酵前后营养成分含量(干物质基础)

发酵方式	发酵菌种	粗蛋白含量	粗纤维含量	粗脂肪含量	参考文献	备注
单菌发酵	拟康氏木霉菌	由 8.4% 提升至 12.5%	-	-	BAYITSE R ^[10]	发酵过程添加了 1% 尿素
单菌发酵	米曲霉	提升至 22.9%	-	-	徐高饶 ^[11]	发酵过程添加了 3% 硝酸铵
单菌发酵	鼠李糖乳杆菌	由 3.43% 提升至 3.68%	-	-	NAPASIRTH V ^[16]	
单菌发酵	黑曲霉	由 4.4% 提升到了 12.2%	由 3.8% 下降至 3.0%	由 2.6% 提升至 5.7%	OBOH G ^[21]	
混合菌发酵	发酵菌种来源于一种名为 dadih 的印尼传统发酵食物, 以植物乳杆菌为主	由 2.28% 提升至 7.48%	由 20.23% 下降至 17.59%	由 0.68% 提升至 2.64%	GINTING N ^[9]	
混合菌发酵	植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母(接种比例 5:1:1)	由 3.3% 提升至 5.71%	-	由 8.29% 提升至 12.09%	蒋慧娇 ^[12]	
混合菌发酵	布氏乳杆菌、黑曲霉、植物乳杆菌	由 4.63% 提升至 4.76%	中性洗涤纤维由 23.66% 下降至 19.42%; 酸性洗涤纤维由 19.79% 下降至 15.66%	-	唐庆凤 ^[13]	发酵过程添加了 1% 尿素、0.6% 红糖
混合菌发酵	黑曲霉、米曲霉、酿酒酵母、益生菌(接种比例 1:1:1:1)(益生菌由地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、植物乳杆菌按 1:1:1:2 比例混合而成)	由 9.16% 提升至 11.29%	由 32.05% 下降至 20.29%	-	黄金华 ^[14]	发酵过程添加 5% 豆粕作为氮源
混合菌发酵	黑曲霉、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母(接种比例 3:2:1)	由 10.77% 提升至 17.92%	由 21.5% 降低至 16.54%	-	赵华 ^[15]	
混合菌发酵	芽孢杆菌、乳酸菌(接种比例 3:2)	-	-	-	李洁 ^[17]	

表3 木薯渣发酵后 pH 及有机酸变化情况

发酵方式	发酵菌种	有机酸含量	pH	参考文献
单菌发酵	鼠李糖乳杆菌	乳酸含量由湿重的 1.16% 提升至 1.25%; 乙酸由 0.44% 下降至 0.39%, 丁酸由 0.33% 下降到 0.26%	3.1	NAPASIRTH V ^[16]
单菌发酵	黑曲霉	-	-	OBOH G ^[21]
混合菌发酵	发酵菌种来源于一种名为 dadih 的印尼传统发酵食物, 以植物乳杆菌为主	-	3.4	GINTING N ^[9]
混合菌发酵	布氏乳杆菌、黑曲霉、植物乳杆菌	乙酸由 17.57 nmol/kg 增加至 20.27 nmol/kg; 丙酸由未检测到增加至 3.92 nmol/kg; 丁酸由 4.42 nmol/kg 增加至 4.80 nmol/kg	3.14	唐庆凤 ^[13]
混合菌发酵	黑曲霉、米曲霉、酿酒酵母、益生菌(接种比例 1:1:1:1)(益生菌由地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、植物乳杆菌按 1:1:1:2 比例混合而成)	-	3.73	黄金华 ^[14]
混合菌发酵	黑曲霉、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母(接种比例 3:2:1)	-	发酵前初始 pH 调至 4	赵华 ^[15]
混合菌发酵	芽孢杆菌、乳酸菌(接种比例 3:2)	乳酸含量增加至 2.0%	4.02	李洁 ^[17]

表4 发酵对木薯相关产品的抗营养因子降解情况

发酵底物	发酵菌种	氰化物含量	其他抗营养因子含量	参考文献
木薯块根打碎成浆状	黑曲霉	从 14.6 mg/kg 降低到 4.1 mg/kg	-	OBOH G ^[21]
木薯皮	黑曲霉 鼠李糖乳杆菌	从 40.33 mg/kg 降低到 7.35 mg/kg	-	OKPAKO C E ^[22]
木薯淀粉渣	黄曲霉、德氏乳杆菌和棒状乳杆菌	-	植酸盐含量从 9.89 mg/kg 降低到 2.75 mg/kg	ARO S O ^[23]
木薯淀粉渣	烟曲霉、德氏乳杆菌和棒状乳杆菌	-	草酸盐含量从 270.10 mg/kg 降低到 56.32 mg/kg	ARO S O ^[23]
木薯淀粉渣	黑曲霉、德氏乳杆菌和棒状乳杆菌	-	单宁含量从 0.09% 降低到 0.04%	ARO S O ^[23]
木薯淀粉渣	酿酒酵母、德氏乳杆菌和棒状乳杆菌	由 17.88 mg/kg 降低到 9.40 mg/kg	-	ARO S O ^[23]
木薯酒精渣	哈茨木霉菌	从 62.3 mg/kg 降低到 24.3 mg/kg	-	VUONG M D ^[24]
木薯粉	植物乳酸杆菌	从 197.19 mg/g 降低到 4.09 mg/g	-	TEFERA T ^[55]

2 发酵木薯渣在畜禽养殖中的应用

2.1 发酵木薯渣在生猪生产中的应用

在生猪饲料中添加适量的发酵木薯渣,可提升生猪的生产性能,改善猪舍环境,增加养殖效益。王志文等在哺乳母猪饲料中使用4%的发酵木薯渣替代麸皮,能提高哺乳母猪的采食量、仔猪平均日增重和断奶窝增重^[25]。白秀梅等在育肥猪饲料中添加5%的木薯渣发酵饲料,提高了生产性能和饲料转化率,同时降低了猪舍氨气浓度^[26]。欧肇林探索了本地木薯渣作为隆林黑猪饲养过程中的饲料来源的可行性,结果显示用6%发酵木薯渣等量替代饲料中的玉米对猪的生长性能、血糖水平、血脂水平、胴体性状和肉质等均无不良影响^[27-28]。

但发酵木薯渣在生猪不同生长阶段的添加比例值得探讨和注意。TRAN等用发酵木薯渣在生长期和育肥期饲喂生猪,在生长期对平均日增重影响无差异,但在育肥期和整个饲养周期内,添加发酵料的试验组平均日增重和日采食量均低于对照组^[29]。李晓平等在陆川猪饲料中分别添加10%、20%、30%的发酵木薯渣,添加量为10%时,料重比最低;随着发酵木薯渣饲料添加量的增加,试验猪平均日增重、日采食量有下降趋势,且料重比升高^[30]。梁珠民等在生长育肥期特种野猪日粮中,分别添加10%、15%、20%和25%发酵木薯渣,发现发酵木薯渣添加量为20%时,日增重最明显,经济效益最显著,但当添加量为25%时,日增重又呈下降趋势^[31]。

综上,发酵木薯渣粗纤维含量较高,添加量过

高时,会引起成长性能的下降,建议在生猪饲料中发酵木薯渣添加比例不超过15%,若为耐粗饲地方品种猪添加比例可适当调高,但仍以不超过20%为宜,不同品种猪不同生长阶段的添加比例仍需结合实际进一步优化饲料配方。

2.2 发酵木薯渣在反刍动物生产中的应用

反刍动物与单胃动物相比,可以更好地消化发酵木薯渣中的粗纤维,且发酵木薯渣淀粉含量丰富,可作为反刍动物的能量饲料来源,因此在反刍动物上的应用更为广泛。大量研究表明,发酵木薯渣可促进反刍动物的瘤胃代谢,改善生产性能,提高饲料利用率降低养殖成本。在牛生产应用中通常发酵木薯渣添加比例适宜控制在牛体重比例1%~1.5%,不会对牛生长性能和健康状况产生不利影响^[32-38]。在羊生产应用中,发酵木薯渣替代玉米或粗饲料在其饲料中的占比控制在20%为宜^[39-47]。过量添加,会因发酵木薯渣的高含水量、低粗蛋白含量等因素造成动物生产性能下降。

2.3 发酵木薯渣在家禽生产中的应用

LEI L等用5%、10%、15%的发酵木薯乙醇渣替代部分玉米、豆粕、麦麸等原料饲喂樱桃谷鸭,5%添加比例的试验组对生长性能和和肉质无影响,在一定程度上改善了屠宰率,但随着饲料中发酵木薯渣替代比例的提高,营养物质消化率会有所降低,建议发酵木薯渣在肉鸭饲料中的替代比例不宜超过15%^[48]。而本团队前期用5%、10%、15%、20%发酵木薯渣分别替代部分全价料饲喂黄羽肉鸡,结果表明,

添加发酵木薯渣在一定生长阶段可显著提高黄羽肉鸡的采食量和日增重, 20%添加比例在黄羽肉鸡的生长后期提高了黄羽肉鸡料重比, 但对黄羽肉鸡发育和健康情况未造成显著差异影响, 鉴于木薯渣价格低廉, 添加发酵木薯渣仍有效降低肉鸡养殖成本。水禽相比于鸡, 对粗纤维的消化利用较强。艾必燕等在生长鹅饲料中添加20%的发酵木薯渣, 对生长鹅血液生化指标的影响与常规饲料组相比差异不显著, 说明添加剂量为20%的发酵木薯渣可用于生长鹅的饲料^[49]。综上, 在家禽生产应用中, 发酵木薯渣建议添加比例在10%~15%, 耐粗饲的地方鸡品种或鸭、鹅可适当提高添加比例, 但仍需谨慎观察家禽生长状况, 建议发酵木薯渣添加比例不超过20%比例为宜。

有研究显示, 饲喂发酵木薯渣可改善对肉鸡肠道健康从而预防疾病, 并改善养殖场所环境。SUGIHARTO等研究发现, 肉鸡饲料中添加发酵木薯渣, 肉鸡回肠食糜大肠菌群数量显著低于对照组, 盲肠中丁酸含量高于其他组, 血液中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞比率、血清总蛋白和球蛋白显著降低, 血清胆固醇有效降低, 证明了肉鸡饲料中添加发酵木薯渣, 有改善肠道健康和预防急性感染的效果^[50]。蒋建生等发现在樱桃谷鸭育雏期饲料中添加发酵木薯渣有利于降低养殖场H₂S、NH₃浓度^[51]。

2.4 发酵木薯渣的加工形式对畜禽应用的影响探讨

发酵饲料可改善畜禽肠道健康, 减少排泄物中有害和臭味物质排放进而改善环境, 农产品副产物资源化利用降低畜禽养殖成本等诸多优势特点, 但在应用上仍存在一些限制因素。以发酵木薯渣为例, 木薯渣密度低、比重小, 单位体积的干物质重量及能量值小, 在畜禽快速生长需要大量能量供给, 而消化器官体积相对有限的因素下, 对畜禽生长可能产生限制影响。唐德富等对木薯粒、木薯渣、木薯干三种不同物理形式的木薯产品的营养成分进行了分析, 发现经过压缩制粒调制的木薯粒比重大、干物质和淀粉的消化率也更高, 在对肉鸡的饲喂过程中发现木薯粒也取得了更好的饲喂效果^[52-53]。冀凤杰研究指出, 制粒可以使木薯饲料的体积减少约1/3, 增加密度, 也增加了干物质摄入量^[54]。在本团队前期试验工作中发现, 添

加20%比例的发酵木薯渣在饲喂黄羽肉鸡过程中, 在肉鸡生长36~49日龄期间对肉鸡生长有助益作用, 而在后期尤其是57~63日龄对肉鸡采食量、日增重、料重比产生了不利影响。实际应用中可以考虑对发酵木薯渣进行挤压制粒增加其比重, 但要考虑制粒对益生菌和益生元的影响, 参考动物饲喂评价进行。我国畜禽养殖目前大多采用颗粒料、粉料等固态饲料饲喂, 但发酵木薯渣饲料加工形式, 下游畜禽养殖饲养方式, 养殖自动化机械设备的配套衔接, 发酵木薯渣的耐储藏和易运输等问题尚需要进一步探索。

3 小结

在饲料原料紧缺的当下, 发酵木薯渣作为一种新型的非常规饲料原料, 同时也是一种绿色环保的生物饲料, 具有非常广阔的应用前景。将发酵木薯渣作为饲料原料应用的畜禽生产中, 不仅可以作为饲料原料中玉米的有效替代品, 有效解决了人畜争粮的现状, 而且可缓解木薯渣处理不当对环境的污染, 具有良好的经济效益和社会效益。但是, 针对发酵饲料, 我国目前尚未建立发酵菌种以及发酵饲料评价的标准, 产品参差不齐, 很大程度上限制了发酵木薯渣在饲料及养殖行业的应用, 因此, 建立木薯渣发酵菌种的选择标准、评价规程、发酵工艺标准等已成为亟待解决的问题。另外, 不同畜禽在不同生长阶段, 对发酵木薯渣的利用效率不同, 需要根据营养需求, 合理调整饲料配方, 精准评价发酵木薯渣在畜禽生产中的应用效果, 从而更加科学的指导生产。

参考文献:

- [1] 项轩, 倪姮佳, 黄兴国, 等. 发酵木薯渣的营养价值及其在畜禽生产中的应用进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, (19): 45-50.
- [2] 崔艺燕, 田志梅, 李贞明, 等. 木薯及其副产品的营养价值及在动物生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(8): 2135-2146.
- [3] FERRARO V, PICCIRILLO C, TOMLINS K, et al. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and yam (*Dioscorea* spp) crops and their derived foodstuffs: safety, security and nutritional value[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(16): 2714-2727.
- [4] VILARIM F L, ADRIANA G, LIBERAL V R M, et al.

- Cassava dreg as replacement of corn in goat kid diet[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2018, 50(2):309-315.
- [5] 张爱华, 邓雪娟, 李婷婷, 等. 木薯渣饲料资源在畜禽生产中的应用研究进展[J]. *饲料与畜牧*, 2015(9):45-48.
- [6] SADH P K, DUHAN S, DUHAN J S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1):1-15.
- [7] 冀凤杰, 王定发, 侯冠彧, 等. 木薯渣饲用价值分析[J]. *中国饲料*, 2016(6):37-40.
- [8] 李娟娟, 曹洪战, 芦春莲, 等. 木薯渣在畜禽生产上的应用研究[J]. *饲料广角*, 2016(7):45-47.
- [9] GINTING N. Comparison of isolate dadih with yeast dadih in improving nutrition quality of Cassava Waste (CW) [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2018, 141(1):1755-1761.
- [10] BAYITSE R, HOU X R, LARYEA G, et al. Protein enrichment of cassava residue using *Trichoderma pseudokoningii* (ATCC 26801)[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1):1-6.
- [11] 徐高饶, 王士长, 裴亚玲, 等. 米曲霉固态发酵对木薯渣蛋白质含量的影响研究[J]. *中国饲料*, 2018, 9(19):86-88.
- [12] 蒋慧姣, 李净, 彭辉平, 等. 微生物发酵对木薯渣营养成分的影响[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2):407-413.
- [13] 唐庆凤, 彭开屏, 韦升菊, 等. 布氏乳杆菌、黑曲霉、热带假丝酵母、枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌3菌组合对木薯渣发酵品质的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(7):1729-1736.
- [14] 黄金华, 王士长, 梁珠民. 多菌种混合发酵木薯渣饲料的工艺条件研究[J]. *饲料工业*, 2014, 35(11):22-25.
- [15] 赵华, 汤小朋, 汤加勇, 等. 复合生态菌固态发酵木薯渣工艺参数优化及混菌发酵对木薯渣营养品质的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(5):55-59.
- [16] NAPASIRTH V, NAPASIRTH P, SULINTHON T, et al. Microbial population, chemical composition and silage fermentation of cassava residues[J]. *Animal Science Journal*, 2015, 86(9):842-848.
- [17] 李洁, 李昆, 张孟阳, 等. 固态发酵木薯酒精渣生产生物饲料的研究[J]. *饲料工业*, 2018, 39(22):44-49.
- [18] ROSALES-SOTO M U, GRAY P M, FELLMAN J K, et al. Microbiological and physico-chemical analysis of fermented protein-fortified cassava (*Manihot esculenta* Crantz) flour [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 66:355-360.
- [19] BAYITSE R, HOU X, BJERRE A B, et al. Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1):60-67.
- [20] SUDARMAN A, HAYASHIDA M, PUSPITANING I R, et al. The use of cassava leaf silage as a substitute for concentrate feed in sheep [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2016, 48(7):1509-1512.
- [21] OBOH G, AKINDAHUNSI A A, OSHODI A A. Nutrient and Anti-nutrient Contents of *Aspergillus niger*-Fermented Cassava Products (Flour and Gari) [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2002, 15(5):617-622.
- [22] OKPAKO C E, NTUI V O, OSUAGWU A N, et al. Proximate composition and cyanide content of cassava peels fermented with *Aspergillus niger* and *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2008, 6(2):251-255.
- [23] ARO S O, ALETOR V A, TEWE O O, et al. Preliminary investigation on the nutrients, antinutrients and mineral composition of microbially fermented cassava starch residues [C]. *Proceedings of 33rd Annual Conference of Nigerian Society for animal production*. Nigeria: Nigerian Society for Animal Production, 2008:248-251.
- [24] VUONG M D, THANH N T, SON C K, et al. Protein Enrichment of Cassava-Based Dried Distiller's Grain by Solid State Fermentation Using *Trichoderma Harzianum* and *Yarrowia Lipolytica* for Feed Ingredients [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2021(12):3875-3888.
- [25] 王志文, 王海辉, 郑斌, 等. 日粮中添加发酵木薯渣对哺乳母猪的影响[J]. *广东饲料*, 2019, 28(2):36-38.
- [26] 白秀梅, 范彧, 王丹玉, 等. 木薯渣发酵饲料及其发酵工艺与应用[J]. *猪业科学*, 2021, 38(5):86-89.
- [27] 欧肇林, 谢炳坤, 陈宝剑, 等. 发酵木薯渣对隆林黑猪屠宰性能和胴体品质的影响[J]. *现代农业科技*, 2016(14):250-251.
- [28] 欧肇林. 发酵木薯渣对隆林黑猪生长性能、血液生化指标、胴体品质及肉质的影响[D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2016.
- [29] TRAN T T H, LE V A, PHAN T B, et al. Effect of Fermented Rice Bran and Cassava Waste on Growth Performance and Meat Quality of Crossbred Pigs [J]. *World Journal of Agricultural Research*, 2016, 4(5):132-138.
- [30] 李晓平, 文愈, 陶卿, 等. 发酵木薯渣蛋白饲料对陆川猪生长性能的影响[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2016, 46(13):84-86.
- [31] 梁珠民, 卓潮, 李福锋, 等. 日粮中添加发酵木薯渣饲养特种野猪试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(22):106-107.
- [32] CHERDTHONG A, SUPAPONG C. Improving the nutritive value of cassava bioethanol waste using fermented yeast as a partial replacement of protein source in dairy calf ration[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2019, 51(8):2139-2144.
- [33] PILAJUN R, INTHESEANG W, KAEWLUAN W, et al. Nutritional status of grazing Lowline Angus crossbred supplemented with fermented cassava starch residue[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2020, 52(5):2417-2423.
- [34] RUANGYOTE P, METHA W. Growth performance and carcass characteristics of feedlot Thai native × Lowline Angus crossbred steer fed with fermented cassava starch residue [J]. *Tropical animal health and production*, 2016, 48(4):719-26.
- [35] CHERDTHONG A, SUPAONG C. Improving the nutritive value of cassava bioethanol waste using fermented yeast as a partial replacement of protein source in dairy calf ration [J]. *Tropical*

- Animal Health and Production, 2019, 51(8):2139-2144.
- [36] 李胜开. 南方农副产品混合青贮饲料的营养价值评定及对肉牛生长性能和血液生化指标的影响[D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2017.
- [37] 黄雅莉, 邹彩霞, 夏中生, 等. 发酵木薯渣替代不同比例象草对水牛体外瘤胃发酵特性的影响[C]. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十一次全国动物营养学术研讨会, 2012.
- [38] 黄雅莉, 邹彩霞, 夏中生, 等. 发酵木薯渣替代不同比例玉米秸秆对水牛瘤胃发酵特性的影响[C]. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十一次全国动物营养学术研讨会, 2012.
- [39] GINTING N, WAHYUNI T H. Palatability test of fermented cassava waste biscuit; enriched with kelor leaf (*Moringa oliefera*) on dombos sheep [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2018, 1116(5):6.
- [40] 卢珍兰, 李致宝, 兰宗宝, 等. 发酵木薯渣对黑山羊生产、血清生化及经济效益影响[J]. 中国畜禽种业, 2017, 13(7):84-87.
- [41] 周璐丽, 周汉林, 王定发, 等. 日粮添加发酵木薯副产物饲喂海南黑山羊的试验效果[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(3):65-68.
- [42] 吴灵丽, 施力光, 刘强, 等. 发酵木薯渣替代不同比例王草对海南黑山羊生长性能、屠宰性能及肉品质的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(6):102-105.
- [43] 高俊峰. 发酵木薯渣对本地黑山羊生长性能、血液生化指标和养分消化代谢的影响[D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2013.
- [44] 樊懿萱, 王锋, 王强, 等. 发酵木薯渣替代部分玉米对湖羊生长性能、血清生化指标、屠宰性能和肉品质的影响[J]. 草业学报, 2017, 26(3):91-99.
- [45] 王智博, 王洁, 王强, 等. 发酵木薯渣替代部分玉米对湖羊消化代谢的影响[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(11):83-86.
- [46] 王强. 发酵木薯渣及不同营养水平日粮对湖羊育肥效果的影响[D]. 硕士学位论文. 南京农业大学, 2015.
- [47] 王强, 樊懿萱, 王锋, 等. 发酵木薯渣对湖羊的饲喂效果研究[C]. 中国畜牧兽医学会养羊学分会2015年全国养羊生产与学术研讨会, 2015.
- [48] LEI L, FENG Z, LI Q, et al. Fermented cassava bioethanol waste as substitute of protein in diet for growth performance and carcass evaluation on meat ducks [J]. Tropical Animal Health and Production, 2019, 51(5):1049-1056.
- [49] 艾必燕, 樵星芳, 陈建康, 等. 发酵木薯渣对生长鹅血液生化指标的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012(1):19-20.
- [50] SUGIHARTO S, TURRINI Y, IEROLI I, et al. Intestinal microbial ecology and hematological parameters of broiler fed cassava waste pulp fermented with *Acremonium charticola* [J]. Veterinary world, 2017, 10(3):324-330.
- [51] 蒋建生, 庞继达, 蒋爱国, 等. 发酵木薯渣饲料替代部分全价饲料养殖肉鸭的效果研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(11):16-20.
- [52] TANG D F, RU Y J, SONG SY, et al. The Effect of Cassava Chips, Pellets, Pulp and Maize Based Diets on Performance, Digestion and Metabolism of Nutrients for Broilers [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 11(9):1332-1337.
- [53] 唐德富, IJI P, CHOCT M, 等. 木薯产品营养成分的分析与比较研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9):74-80.
- [54] 冀凤杰, 曹婷, 刘胜敏, 等. 木薯作为能量饲料的营养特性及其在单胃动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2021, 33(2):622-636.
- [55] TEFERA T, AMEHA K, BIRUHTESEFA A. Cassava based foods: microbial fermentation by single starter culture towards cyanide reduction, protein enhancement and palatability [J]. International Food Research Journal, 2014, 1751-1756.

上接第46页

- [50] STOLDT AK, DERNO M, DA G, et al. Effects of rutin and buckwheat seeds on energy metabolism and methane production in dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 99:2161-2168.
- [51] 郭旭东. 芦丁对奶牛泌乳性能、瘤胃消化代谢和对大鼠乳腺发育的影响[D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [52] 占今舜, 霍俊宏, 钟小军, 等. 饲料中添加芦丁对湖羊生长性能、血清生化指标和激素水平及瘤胃发酵的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(5):2717-2726.
- [53] GUEMRA S, MONZANI PS, SANTOS ES, et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetinae seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário [J]. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, 2013, 65(6):1616-1624.
- [54] 臧长江, 赵芳, 李晓斌, 等. 补饲植物雌激素对泌乳期伊犁母马血液生化指标及抗氧化力的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12):3226-3230.
- [55] 刘春龙, 李忠秋, 张帆, 等. 大豆黄酮和染料木素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞增殖及抗氧化水平的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, (11):1517-1522.
- [56] 甘麦邻, 努尔力·阿不利孜, 田占伟, 等. 染料木素对舍饲哈萨克羊乏情期诱导发情的作用[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(2):61-64.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.04.12

沙门氏菌的检测与分离鉴定技术研究进展

温珍玉, 张红霞, 李美霞, 张建民, 廖明, 瞿孝云*
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:沙门氏菌是重要的人畜共患病病原, 不仅造成畜禽养殖业的重大经济损失, 其感染后的动物产品也会威胁人类健康, 如何有效对其监测和防控具有重大的公共卫生意义。本文通过对当前沙门氏菌的传统培养方法、免疫学方法、分子生物学方法、光谱质谱法、生物传感器等检测方法与分离鉴定技术进行概述和综合比较。每种方法都有其优势与不足, 将不同方法联合运用是一个可行的思路。展望未来, 检测设备的小型化和自动化是一大趋势, 如何开发集预处理和检测于一体的筛选和鉴定方法是未来沙门氏菌检测方法的热门话题。

关键词:沙门氏菌; 分离鉴定; 快速检测; 血清型; 生物传感器

中图分类号:S852.61 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2022)04-0066-05

Research Progress in Detection, Isolation and Identification of Salmonella

WEN Zhenyu, ZHANG Hongxia, LI Meixia, ZHANG Jianmin, LIAO Ming, QU Xiaoyun*
(South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract: Salmonella is an important zoonotic pathogen, which not only causes great economic losses in livestock and poultry breeding industry, but also its infected animal products will threaten human health. How to effectively monitor and prevent Salmonella has great public health significance. By summarizing the current detection methods of Salmonella, this paper summarizes the following methods: traditional culture methods, immunological methods, molecular biology methods, spectral mass spectrometry, biosensors and so on. Each method has its advantages and disadvantages. It is a feasible idea to combine different methods. Looking forward to the future, the miniaturization and automation of detection equipment is a major trend. How to develop screening and identification methods integrating pretreatment and detection is a hot topic of Salmonella detection methods in the future.

Keywords: Salmonella; Isolation; Identification; Rapid Detection; Serotype; Biosensor

沙门氏菌病, 又称副伤寒, 是由沙门氏菌属细菌引起的人畜共患性疾病, 我国农业部将其列为二类动物疫病。沙门氏菌具有菌体(O)、鞭毛(H)、菌毛、K四种抗原, 其中O抗原和K抗原是其主要抗原, 根据O、K抗原差异可将沙门氏菌分为不同的血清型, 根据Kauffman-White标准, 可将沙门氏

菌属分为2500个以上血清型^[1]。沙门氏菌可引发多种动物各种各样的疾病, 人类通过摄食受污染的动物产品可导致食物中毒和相应的食源性疾病。如何在畜牧业产品进出口及消费市场做好沙门氏菌的监测工作, 如何使食品污染物监测网络更加合理全面, 是未来沙门氏菌检测发展的方向。

收稿日期:2022-01-03

基金项目:国家肉鸡产业技术体系(CARS-41-G16);沃尔玛基金会(61626817);沃尔玛基金会项目(52514289)

作者简介:温珍玉(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向:预防兽医学。E-mail:1773038308@qq.com

*通讯作者:瞿孝云(1982-), 女, 实验师, 研究方向:动物传染病。E-mail:qx0926@126.com

1 传统方法

目前国内实验室对于沙门氏菌的检测多采用国家标准。分离过程包括以下几个步骤:缓冲蛋白胨水的预富集、四硫磺酸钠煌绿培养液的选择性增菌、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂培养基的分离、生化鉴定和血清分型,整个流程大致需要4~7 d^[2]。传统方法可靠性强、准确性好,且能够分离纯化出单菌落,一直是行业内检测沙门氏菌的“金标准”,但其耗时长、操作过程复杂,结果的判定大多依赖于肉眼观察。因此,该方法不适合高通量样本的快速检测。随着行业的发展,开发快速、准确的沙门氏菌检测方法已成为该领域的发展方向。

2 免疫学方法

2.1 酶联免疫吸附实验(ELISA)

ELISA是利用抗原-抗体反应和酶标技术,通过颜色变化来测量沙门氏菌的浓度。Rastawicki等人使用ELISA三种不同的抗原:肠炎链球菌LPS、鼠伤寒链球菌LPS和两种血清型LPS的1:1混合物,从采集的血清样本中吸收带有肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌悬浮液的非特异性抗体^[3]。ELISA方法被认为是检测食品中沙门氏菌污染快速有效的方法,可以通过间接ELISA利用单克隆抗体特异性结合肠道沙门氏菌亚种的体细胞或鞭毛抗原,再通过免疫印迹和质谱分析进一步鉴定^[4]。

2.2 侧向流动免疫分析(LFIA)

基于LFIA的方法如免疫试纸或免疫色谱条,当固定在硝酸纤维素膜上的特异性抗体与沿着膜移动的相应抗原结合时,用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色。LFIA可以获得实时结果,适合食品污染现场测试。纳米金颗粒在免疫层析技术中应用广泛,也被用作沙门氏菌的检测。随着行业的不断发展,更加快速、灵敏的免疫层析试纸条也在不断被开发,如选择金磁性双功能纳米珠(GMBN)作为一种新型标记物、制备的单克隆抗体(mAb)1B4用胶体金标记用作捕获抗体等,在降低检测限、缩短检测时间、提高敏感性方面都取得了很大的进展^[5-6]。

2.3 免疫磁分离技术(IMS)

免疫磁分离技术是近年来新发展起来的一项

技术,可高效、可逆性富集目标微生物,可用于高通量筛选沙门氏菌。通过对目标微生物的富集培养和免疫磁珠制作工艺上的优化,可大大提高磁珠的捕获率^[7]。通常在利用IMS方法检测前,我们需要事先对微生物进行富集,将LAMP发与IMS结合可解决这一问题^[8]。IMS也可与传感器联用,Wang等人对免疫磁性分离靶细菌的同轴毛细管进行了改进,再与阻抗生物传感器结合,取得了较好的分离效果^[9]。

3 分子生物学方法

3.1 聚合酶链反应(PCR)

PCR法有着较高的特异性和灵敏度,是替代传统分离培养的一种较好的方法。其中,应用最为广泛的是荧光定量PCR(qPCR),能在极低的浓度下检测到目标样品,且无须富集、无须凝胶电泳,有着较高的灵敏度和准确性,且检测速度快。Mustak等人验证了一种用于快速检测肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的qPCR试剂盒,qPCR结果与常规血清分型结果100%一致,而特异性和敏感性值为100%^[10]。

数字PCR(dPCR)改变了qPCR的局限性,是一种新型PCR法,不同之处在于dPCR在终点收集数据时绝对量化,可在不使用标准曲线的情况下敏感定量目标序列^[11]。对qPCR与dPCR进行比较之后发现,dPCR具有更高的灵敏度和更短的预培养时间^[12]。Du等人^[13]开发了一种经原位富集培养和IMS预处理结合dPCR技术的方法,可检测低至10-1 CFU/mL的沙门氏菌水平,该预处理方法可作为多种检测技术的集成平台,用于微量沙门氏菌的快速检测。然而,qPCR和dPCR都无法区分活细胞和死细胞。活性PCR(vPCR)是基于PCR唯一能够扩增活细胞的方法。然而,假阳性问题是vPCR的一个很大的缺点。综合比较,相对于vPCR法,应首选qPCR、dPCR方法。

3.2 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP通过分析沙门氏菌入侵基因*invA*来实现其特异性,扩增效率高,但假阳性问题严重。通过浓缩和纯化微生物培养物,可提高LAMP的特异性和敏感性,可作为筛选和鉴定沙门氏菌的一种方法。另外一种克服假阳性问题的思路可以从改

变LAMP的靶基因入手,有研究表明选择SSAQ基因作为LAMP检测沙门氏菌的靶基因对常见的沙门氏菌血清型进行检测,可产生100%的阳性结果^[14]。LAMP技术在引物设计方面是重要的突破点,想要筛选出合适的引物还需要大量的工作来验证引物的可靠性。与LAMP法类似,重组聚合酶扩增法(RPA)是一种新的等温核酸体外扩增技术,RPA法检测前无须进行DNA提取和纯化,且引物设计方面要比LAMP法简单很多。

3.3 多位点序列分型(MLST)和CRISPR分型

近年来MLST发展较快,主要用于病原微生物的进化和流行病学分析,鉴定毒力菌株种群等。Yan等使用血清分型、MLST和cgMLST分析,整理了2004~2019年中国肠道沙门氏菌分离株的表型和基因分型多样性,并阐明了近16年来中国不同宿主沙门氏菌的时空分布特征^[15]。然而,MLST分辨率较低,对遗传关系相近的不同血清型菌株不能有效鉴别。CRISPR是细菌遗传基因组中进化最快的一种遗传原件,其中间隔区与血清型相关。CRISPR法分辨率高、实用性好、自动化程度高。通过对来自同一地区的采集样本经MLST分型和CRISPR分型比较,发现CRISPR分型相对于MLST分型在同一血清型中具有较好的识别能力,对沙门氏菌的溯源和沙门氏菌病的防治具有积极作用^[16]。

4 基于质谱分析的方法

4.1 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS是通过检测病原菌蛋白质指纹图谱(PMF)与已知数据库中质谱图特征性谱图进行对比,快速鉴定分离菌^[17]。MALDI-TOF MS是一种灵敏、准确的微生物属和种水平研究方法,Mangmee等开发了一种基于MALDI-TOF-MS的方法,以改进从肉鸡样本中分离的非伤寒沙门氏菌(NTS)物种、亚种和血清型的同时鉴定,该方法有助于NTS血清型的大规模筛选^[18]。

4.2 液相色谱-质谱(LC-MS)

LC-MS是MALDI-TOF-MS的一种替代质谱方法,通过色谱分离完整的细菌蛋白质裂解物,并用MS检测。虽然MALDI-TOF-MS可以在属和种水平上鉴定沙门氏菌,但很少有研究报告超出种水平

的亚型,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法能够在更大的动态范围内分析更多的蛋白质,检测密切相关菌株之间微小差异^[19]。Chen等人提出了一种LC-MS/MS管道法,对*S. Typhimurium*以及邻近四个血清型*S. Saintpaul*、*S. Heidelberg*、*S. Paratyphi B*以及*S. Muenchen*进行了评估,在沙门氏菌血清型鉴定特异性方面有了较大的改进^[20]。

5 基于光谱分析的方法

基于光谱分析的方法主要有近红外光谱法(NIR)、表面增强光谱法(SERS)等。NIR法能够非破坏性、快速准确地检测复杂样品中的目标微生物。Pereira等提供了一种基于NIRs的筛选办法来鉴别牛奶中是否存在沙门氏菌^[21]。SERS法能够以高灵敏度检测低浓度分析物中的样品,已被用于快速检测沙门氏菌工作中,如SERS法结合过滤技术可用于检测水中的肠炎沙门氏菌^[22-23]。SERS还可与LAMP法结合使用,Draz等开发的LAMP-SERS分析具有高度的特异性和敏感性,可对肠炎链球菌目标DNA进行高度特异性检测,将其与密切相关的细菌种类或非特异性污染的DNA区分开来^[24]。

6 基于生物传感器的方法

生物传感器由三个主要部件组成,即生物识别元件、传感器部件和电子系统。其中生物识别元件含有生物活性物质如抗体、适配子、噬菌体、核酸等。

6.1 免疫传感器和适配子传感器

免疫传感器也称为抗原-抗体生物传感器。该反应的原理是将特定的抗沙门氏菌抗体固定在传感器表面,抗原与抗体的耦合将触发免疫化学反应,该反应将用作检测信号。Melo等在金表面用电沉积羧甲基腰果胶(CMCG)膜固定多克隆抗沙门氏菌抗体,通过计时电流法获得免疫传感器响应,所构建的免疫传感器能有效检测复杂食品基质中的细菌^[25]。免疫传感器是一种快速、高灵敏度、易于操作的检测方法,有着非常好的应用前景。然而,其电极重复使用次数通常有限,若投入市场,实际应用可能不具有成本效益。适配子是一种寡核苷酸,被认为是抗体的良好替代品,并已被用作检测食品污染物的生物传感器^[26]。Chen等开发了一种比色适配子传感器,成功检测鸡蛋样品中的

鼠伤寒沙门氏菌,回收率在92.4%~110%之间^[27]。

6.2 噬菌体传感器

目前噬菌体的沙门氏菌检测平台已成功商业化。噬菌体仅感染某种特异的单细胞宿主物种,基于这个特征,将其用作生物受体。Chen等展示了一种噬菌体磁弹性生物传感器,通过将噬菌体C4-22固定在快速磁弹性(ME)生物传感器上作为前线检测配体,检测Tris中的所有肠道沙门氏菌血清型,结果表明,当细菌污染物被吸收到鸡体内时,噬菌体传感器可有效地检测沙门氏菌^[28]。然而,从噬菌体中提取的沙门氏菌裂解物将导致捕获效率的降低和识别信号的减少或丢失。

6.3 核酸生物传感器

核酸生物传感器也称为基因传感器。利用DNA和RNA序列作为生物识别元件,与免疫传感器和噬菌体传感器类似,基因传感器利用DNA探针与病原体目标核酸的互补杂交信号,将其转化为特定的转导信号。Tabrizi等开发了一种基于干涉反射光谱(IRS)的DNA传感器,用于测定沙门氏菌特异性DNA片段浓度,结果表明其选择性良好^[29]。

7 小结与展望

目前,许多食品安全实验室和微生物诊断实验室依旧首选传统的分离培养法,整个实验过程需要4~7 d,费时费力,不适合现场检测,但能分离纯化得到有活性的沙门氏菌菌落,这是其他快速检测方法不可替代之处。近些年来,沙门氏菌的检测方法已从传统的分离培养方法转向更有效的基于免疫学或核酸分子生物学方法。免疫学方法中ELISA应用最广泛,但由于特异性靶抗体的可用性有限,大多数免疫学方法仅用于检测某些较常见的沙门氏菌血清型。PCR方法可检测某些不常见沙门氏菌血清型,但大多数分子生物学方法都需对样品进行预处理,此外,分子生物学方法对仪器设备以及操作人员的技术要求较高,因此难以在广大的应用市场上普及。无论是免疫学方法还是分子生物学方法,沙门氏菌亚型间的交叉反应都会对实验结果造成一定的干扰,导致假阳性问题的产生,质谱法、光谱法可以很好的避免交叉反应的发生。生物传感器具有良好前景和广阔的应用空间,具备超高的灵敏度和超低的检出限,无须

预富集处理,但成本较高,难以在市场普及。

单一的检测方法可能无法满足检测和分离鉴定任务要求,可考虑多种检测方法结合使用。IMS法是广泛认可的分离和富集沙门氏菌的方法,可与多种方法结合发挥更佳的效果,如与dPCR结合直接监测鼠伤寒沙门氏菌、与实时环介导等温扩增技术(RTI-LAMP)和SDS漂洗的结合检测即食鸭肉中的沙门氏菌等^[30-31]。智能手机是一种便捷带有智能操作系统的检测工具,可与生物传感器联用。Wang等基于免疫磁分离、荧光标记和智能手机视频处理技术,研制了一种可在线灵敏检测沙门氏菌的微流控生物传感器^[32]。随着智能手机在快速检测中的成功应用,检测设备的小型化和自动化是一大趋势,如何开发集预处理和检测于一体的筛选和鉴定方法是未来沙门氏菌检测方法的热门话题。未来沙门氏菌的检测方法应朝着成本低效益高、现场检测、灵敏、高通量检测等方向发展。

参考文献:

- [1] AJMERA A, SHABBIR N. Salmonella [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- [2] ALAKOMI H L, SAARELA M. Salmonella importance and current status of detection and surveillance methods [J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2009, 1(3): 142-152.
- [3] RASTAWICKI W, NATALIA RC, KAROLINA S, et al. Absorption of non-specific antibodies with Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium suspensions from tested serum samples as a useful method in serodiagnosis of salmonellosis carried out by ELISA for epidemiological surveillance [J]. Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia, 2019, 71(1): 13-21.
- [4] FEBO T D, MARIA S, PIERINA V, et al. Development of a capture ELISA for rapid detection of Salmonella enterica in food samples [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(2): 322-330.
- [5] XIA S Q, YU Z B, LIU D F, et al. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of Salmonella choleraesuis in milk [J]. Food Control, 2016, 59: 507-512.
- [6] WU Y X, WU M J, LIU C, et al. Colloidal gold immunochromatographic test strips for broad-spectrum detection of Salmonella [J]. Food Control, 2021, 126108052.
- [7] LI J W, LIU Q J, WAN Y P, et al. Rapid detection of trace Salmonella in milk and chicken by immunomagnetic separation in combination with a chemiluminescence microparticle immunoassay [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(23): 6067-6080.

- [8] YAN B, SHU M, ZHONG C, et al. A novel SDS rinse and immunomagnetic beads separation combined with real-Time loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of Salmonella in ready-to-eat duck meat [J]. *Food Analytical Methods*, 2020, 13(5): 1166-1175.
- [9] WANG L, LI X, GUO R Y, et al. Combining impedance biosensor with immunomagnetic separation for rapid screening of Salmonella in poultry supply chains [J]. *Poultry Science*, 2020, 99(3): 1606-1614.
- [10] MUSTAK B I, MUSTAK H K. Detection and differentiation of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium by multiplex quantitative PCR from different poultry matrices [J]. *British Poultry Science*, 2021, 63(2): 171-178.
- [11] SALIPANTE S J, JEROME K R. Digital PCR—an emerging technology with broad applications in microbiology [J]. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(1): 117-123.
- [12] WANG M, YANG J J, GAI Z T, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of Salmonella typhimurium in milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 251-256.
- [13] DU M H, LI J W, LIU Q J, et al. Rapid detection of trace Salmonella in milk using an effective pretreatment combined with droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Microbiology Research*, 2021, 251: 126838-126845.
- [14] SHANG Y T, YE Q H, CAI S Z, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of Salmonella in foods based on new molecular targets [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 142: 110999-111005.
- [15] YAN S G, ZHANG W C, LI C Y, et al. Serotyping, MLST, and core genome MLST analysis of Salmonella enterica from different sources in China during 2004-2019 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12, 688614-688627.
- [16] YANG C, SHAO W F, WEI L L, et al. Subtyping Salmonella isolated from pet dogs with multilocus sequencing (MLST) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) [J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 60.
- [17] FERONE M, AOIFE G, SEAMUS F, et al. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 3106-3129.
- [18] MANGMEE S, ONRAPAK R, THAREERAT K B, et al. MALDI-TOF mass spectrometry typing for predominant serovars of non-typhoidal Salmonella in a Thai broiler industry [J]. *Food Control*, 2020, 113: 107188-107196.
- [19] CHEN S H, PARKER C H, CROLEY T R, et al. Genus, species, and subspecies classification of Salmonella isolates by proteomics [J]. *Applied Sciences-Basel*, 2021, 11(9): 4264-4274.
- [20] CHEN S H, PARKER C H, CROLEY T R, et al. Identification of Salmonella taxon-specific peptide markers to the serovar level by mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4388-4395.
- [21] PEREIRA J M, LEME L M, PERDONCINI M R F G, et al. Fast discrimination of milk contaminated with Salmonella sp via near-infrared spectroscopy [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(7SI): 1878-1885.
- [22] FERONE M, AOIFE G, SEAMUS F, et al. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 3106-3129.
- [23] GAO S Y, HE L L. Development of a filtration-based SERS mapping platform for specific screening of Salmonella enterica serovar enteritidis [J]. *Analytical and Binanalytical Chemistry*, 2019, 411(29): 7899-7906.
- [24] DRAZ M H, LU X N. Development of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) - surface enhanced raman spectroscopy (SERS) assay for the detection of Salmonella enterica serotype enteritidis [J]. *Theranostics*, 2016, 6(4): 522-532.
- [25] MELO A M A, FURTADO R F, BORGES M D F, et al. Performance of an amperometric immunosensor assembled on carboxymethylated cashew gum for Salmonella detection [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 167: 106268-106276.
- [26] MAJDINASAB M, AKHTAR H, MARTY J L. Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples [J]. *Trac-trends in Analytical Chemistry*, 2018, 107: 60-77.
- [27] CHEN Q M, GAO R, JIA L. Enhancement of the peroxidase-like activity of aptamers modified gold nanoclusters by bacteria for colorimetric detection of Salmonella typhimurium [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121476.
- [28] CHEN I H, SHIN H, KAYLA B, et al. Bacterial assessment of phage magnetoelastic sensors for Salmonella enterica Typhimurium detection in chicken meat [J]. *Food Control*, 2017, 71: 273-278.
- [29] TABRIZI M A, JOSEP F B, MARSAL L F. Remote sensing of Salmonella-specific DNA fragment by using nanoporous alumina modified with the single-strand DNA probe [J]. *Sensors and Actuators B-chemical*, 2020, 127: 302-304.
- [30] VINAYAKAV A C, NGO TA, KRISHNA K, et al. Rapid detection of Salmonella enterica in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 129: 224-230.
- [31] YAN B, SHU M, ZHONG C, et al. A novel SDS rinse and immunomagnetic beads separation combined with real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of Salmonella in ready-to-eat duck meat [J]. *Food Analytical Methods*, 2020, 13(5): 1166-1175.
- [32] WANG S Y, ZHENG L G, CAI G Z, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of Salmonella typhimurium using fluorescence labeling and smartphone video processing [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 140: 69-76.