

网络出版时间:2012-07-18 10:20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1020.008.html>

复方中药对断奶獭兔盲肠内环境及脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的影响

赵泮峰¹,任战军¹,朱江江¹,王磊¹,邓永荣²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 杨凌惠丰兔业公司,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】研究复方中药(cCHM)添加剂对断奶獭兔盲肠内环境及脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的影响,探讨其对机体抗病能力的调控作用及适宜用量。【方法】选用(35 $\pm$ 2)日龄断奶、体质量相近的獭兔 144 只,随机分为对照组和 3 个试验组,每组 6 个重复,每重复 6 只幼兔。对照组饲喂添加 0.1 g/kg 杆菌肽锌的日粮(不含抗生素等其他药物),试验组分别饲喂添加复方中药 5 g/kg(cCHM1 组)、10 g/kg(cCHM2 组)、20 g/kg(cCHM3 组)的日粮,60 d 后,取脾脏和盲肠样品,测定盲肠微生物活力和数量,检测 IFN- γ 、IL-10 的相对表达量。【结果】与对照组相比,cCHM2 组獭兔盲肠内容物氨氮(NH₃-N)浓度降低 21.62%,菌体蛋白(MCP)含量提高 16.81%,差异显著($P<0.05$)。复方中药抑制大肠杆菌的效果不及抗生素,但 cCHM2 组、cCHM3 组乳酸杆菌数量较对照组分别提高 18.31%和 16.50%,差异显著($P<0.05$)。复方中药提高了脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的相对表达量,cCHM2 组和 cCHM3 组均极显著高于对照组($P<0.01$)。【结论】复方中药添加剂可改善断奶獭兔盲肠内环境,增强机体的免疫功能,有利于断奶獭兔的肠道健康;该试验条件下复方中药添加剂的适宜用量为 10 g/kg。

[关键词] 复方中药;断奶獭兔;盲肠内环境;mRNA 表达

[中图分类号] S853.74

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)08-0021-07

Effects of dietary supplemental compound of Chinese herbal medicine on caecum inner circumstance and mRNA expression of IFN- γ and IL-10 in spleen in weaned rex rabbits

ZHAO Pan-feng¹,REN Zhan-jun¹,ZHU Jiang-jiang¹,

WANG Lei¹,DENG Yong-rong²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Yangling Hui Feng Rabbit Farm, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The trial was designed to study the effects of dietary supplemental compound of Chinese herbal medicine (cCHM) on caecum inner circumstance and mRNA expression of IFN- γ and IL-10 in spleen in weaned rex rabbits. The regulatory effect of cCHM on disease resistance of weaned rex rabbits was probed, and the appropriate supplemental amount was investigated. 【Method】A total of one hundred and forty-four weaned rex rabbits with (35 $\pm$ 2) days of age and similar body weight were randomly divided into the control group and 3 experimental groups, with 6 replicates in each group and 6 rabbits per repli-

* [收稿日期] 2012-01-12

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2010K01-16)

[作者简介] 赵泮峰(1983—),男,山东聊城人,在读硕士,主要从事特种经济动物营养调控研究。

E-mail: zhaopanfang8984161@163.com

[通信作者] 任战军(1966—),男,陕西淳化人,副教授,硕士生导师,主要从事特种经济动物营养调控研究。

E-mail: renzhanjun@nwsuaf.edu.cn

cate. The control group was fed diet supplemented with 0.1 g/kg zinc bacitracin, and the experimental groups with 5 g/kg (cCHM1 group), 10 g/kg (cCHM2 group) and 20 g/kg (cCHM3 group) cCHM, respectively. After 60 days, caecum and spleen were collected to measure the caecum microorganism vitality and quantity, and to detect mRNA relative expression of IFN- γ and IL-10 in spleen. 【Result】 Compared with the control group, cCHM2 group significantly decreased ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) concentration by 21.62% and increased microbial protein (MCP) by 16.81% ($P < 0.05$). Although the result of inhibiting *E. coli* in the experimental groups was not better than the control group, both cCHM2 group and cCHM3 group increased the amount of Lactobacilli by 18.31% and 16.50% ($P < 0.05$), respectively. cCHM improved mRNA relative expression in spleen, compared with the control group, both cCHM2 group and cCHM3 group increased mRNA relative expression of IFN- γ and IL-10 ($P < 0.01$). 【Conclusion】 cCHM as dietary additive can improve weaned rex rabbits caecum inner circumstance and immune function, which is beneficial to intestinal health. The appropriate supplemental amount of compound Chinese herbal additive is 10 g/kg under this experimental condition.

Key words: compound Chinese herbal medicine; weaned rex rabbits; caecum inner circumstance; mRNA expression

在现代养兔生产中,仔兔一般在 35 日龄左右断奶。仔兔断奶后易发生以腹泻为主的消化系统疾病,该疾病是导致幼兔死亡的主要原因^[1-2]。目前,抗生素通常被用来预防和治疗幼兔腹泻疾病,但是抗生素的大量和长期使用会导致细菌耐药性和家兔相关产品的药物残留问题。为了不用或少用抗生素,研发替代饲用抗生素的绿色饲料添加剂成为人们关注的热点,益生菌^[3-4]、益生元^[5]、酸化剂^[6-7]、中药添加剂^[8]等作为替代饲用抗生素的绿色添加剂越来越多地被应用到家兔日粮中。中药是来源于自然并且具有生物活性的天然药物,兼有营养和药用的双重作用,可全面改善机体生理功能,并且随着人们对中药认识的不断深入,“中药营养学”的概念在国内被首次提出^[9],这有利于进一步了解中药发挥作用的物质基础。合理开发利用中药添加剂,符合健康养殖的发展模式,研究表明,中药添加剂可以促进畜禽生长,改善肠道微生态平衡,调控肠道微生物活性,有利于维持肠道健康^[10-12],并且许多中药添加剂还可以增强机体免疫功能^[13-16]。家兔作为单胃草食动物,其盲肠具有同反刍动物瘤胃相似的发酵功能,而脾脏作为重要的免疫器官,其对机体免疫功能的调节作用也一直为人们所关注。盲肠内环境的稳定及本身免疫功能的增强,有利于预防消化道疾病。有关中药添加剂在调控畜禽肠道微生物作用方面的研究较多,但报道结果不尽一致^[8,17-19]。随着现代分子生物学技术手段的发展,有利于进一步探讨复方中药添加剂对断奶獭兔免疫状态的调控机制。为此,本试验以增强免疫、健胃消食、清热解毒为原则,

组方复方中药添加剂,将其按不同用量添加于断奶獭兔日粮中,通过检测断奶獭兔盲肠内环境情况及脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的表达,来研究复方中药添加剂对机体抗病能力的调控作用,以期探索复方中药添加剂对断奶獭兔的作用效果及适宜用量,为集约化条件下断奶獭兔饲用抗生素替代品的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药物 复方中药(Compound Chinese herbal medicine, cCHM)由炙黄芪、党参、炒白术、炒茯苓、炙甘草、陈皮、麦芽、黄柏、黄芩、连翘等 10 味中药按 3.75 : 3 : 3 : 3 : 1.5 : 1 : 1.5 : 1.5 : 1.5 : 1 的配比混合而成,65 ℃ 烘干后粉碎,过孔径 0.45 mm 筛,按不同比例添加于断奶獭兔日粮中。各味中药均购自杨凌后稷药房。

1.1.2 试验动物 (35±2)日龄断奶、体质量相近的獭兔 144 只,由杨凌惠丰兔业公司提供。

1.1.3 试验日粮 断奶獭兔基础日粮参照美国 NRC(1977)、法国 AEC(1993)以及国内营养专家的推荐标准,结合当地家兔饲料原料实际情况进行配制,其组成及营养水平见表 1。

1.2 试验设计

将 144 只供试獭兔随机均分为 4 组(1 个对照组和 3 个试验组),每组 6 个重复,每个重复 6 只幼兔。对照组在基础日粮(不含抗生素等其他药物)中添加 0.1 g/kg 杆菌肽锌,试验组在基础日粮中分别

添加复方中药 5 g/kg (cCHM1 组)、10 g/kg 7 d,正试期 60 d。
(cCHM2 组)和 20 g/kg(cCHM3 组)。试验预试期

表 1 断奶獭兔基础日粮组成及其营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diet of weaned rex rabbits (air-dry basis)

日粮组成 Ingredients	含量/(g · kg ⁻¹) Content	营养成分 Nutrient component	水平 Level
玉米 Corn	200.00	消化能/(MJ · kg ⁻¹) DE	11.35
豆粕 Soybean meal	100.00	粗蛋白质/(g · kg ⁻¹) CP	156.2
麸皮 Wheat bran	100.00	粗脂肪/(g · kg ⁻¹) EE	31.4
棉粕 Cottonseed meal	40.00	粗纤维/(g · kg ⁻¹) CF	176.6
菜粕 Rapeseed meal	40.0	钙/(g · kg ⁻¹) Ca	10.7
玉米酒精糟 DDGS	50.00	磷/(g · kg ⁻¹) P	5.2
玉米皮溶浆粉 Corn bran soluble power	50.00		
蚕沙 Silk worm excreta	80.00		
稻壳粉 Rice hull power	100.00		
菌糠 Mushroom bran	100.00		
玉米秆糠 Cornstalk	100.00		
磷酸氢钙 CaHPO ₄	11.00		
石粉 Limestone	14.00		
氯化钠 NaCl	5.00		
1%预混料 Premix	10.00		
合计 Total	1 000.00		

注:每 kg 预混料含 V_A 1 050 000 IU,V_D 100 000 IU,V_E 1 800 IU,烟酸 900 mg,铁 14 g,铜 18.6 g,锰 2.8 g,锌 7.4 g,碘 55 mg,硒 28 mg,钴 93 mg,胆碱 42.5 g;营养水平为实测值。
Note:One kilogram of premix contains: V_A 1 050 000 IU,V_D 100 000 IU,V_E 1 800 IU,nicotinic acid 900 mg,Fe 14 g,Cu 18.6 g,Mn 2.8 g,Zn 7.4 g,I 55 mg,Se 28 mg,Co 93 mg,choline 42.5 g;Nutrient levels were all measured values.

1.3 饲养管理

饲养试验在杨凌惠丰兔业公司进行。试验前用水冲洗兔舍设施,然后对兔笼和水槽彻底消毒。兔舍为单列式,试验獭兔编号后单笼饲养,通风和采光良好,自由饮水,日喂 3 次(08:00,12:00,18:30 各 1 次),合理控制投料量(在下次投料前以料槽略有余料为宜)。每天清扫兔舍,定期清理料槽和水槽,为其提供良好的生活环境。按照兔场制定的免疫程序对獭兔进行预防接种。试验期间仔细观察其采食和健康状况,做好记录。

1.4 样品采集与制备

试验结束后,屠宰獭兔,打开腹腔,取脾脏样品,用焦碳酸二乙酯(DEPC)水清洗,放入无 RNA 水解酶的 1.5 mL 离心管,液氮速冻,-80 ℃ 保存,以备进行总 RNA 的提取。同时取盲肠中段 15 cm 左右肠段,分别结扎两端及中间部位,用酒精棉球消毒结扎口,其中一段用 pH-3B 型酸度计测定 pH,然后将其内容物放入 50 mL 带盖离心管中,液氮速冻 4 h 左右,-80 ℃ 保存,以备进行盲肠内容物氨态氮及菌体蛋白的测定;另一段用无菌塑料袋封装,-20 ℃ 保存,以备进行盲肠微生物的测定。

1.5 测定项目及方法

1.5.1 盲肠微生物活力指标的测定 盲肠内容物

氨态氮 (Ammonia nitrogen, NH₃-N)、菌体蛋白 (Microbial protein,MCP) 分别参考蒲万霞等^[20] 和 Windschitl 等^[21] 的方法测定。

1.5.2 盲肠微生物(大肠杆菌和乳酸杆菌)数量的测定 将低温保存的样品在无菌操作台上自然解冻,取 1 g 左右靠近肠壁部分的食糜置于无菌试管内,用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释,直至稀释度达到 10⁻⁶。将稀释度为 10⁻⁶ 的样品分别接种于伊红美蓝琼脂培养基(用于大肠杆菌计数)和乳酸杆菌选择性培养基(用于乳酸杆菌计数)上,放置于 37 ℃ 恒温培养箱内,分别需氧培养 24 h 和厌氧培养 48 h,采用平板菌落计数法对细菌数量进行统计,结果以每克肠道内容物所含细菌数量的常用对数来表示。

1.5.3 脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达量的测定 采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取脾脏总 RNA,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计法检测其完整性、纯度和浓度。根据所测总 RNA 浓度取不同量的总 RNA,按照 TakaRa 荧光定量试剂盒说明反转录合成 cDNA。根据美国国立生物技术中心(NCBI)公布的兔 IFN- γ (登录号:DQ852341)、IL-10(登录号:AF068058)、18S rRNA(登录号:X00640) mRNA 基因序列,并参考文献[22]设计 3 对引物,

引物序列信息见表 2。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。以 cDNA 为模板,18S rRNA 为内参基因,在 CFX96 实时定量 PCR 仪(BIO-RAD 公

司)上进行相对定量。脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[23]检测。

表 2 试验用引物序列信息
Table 2 Specific primer sequence in experiment

基因 Genes	上游引物(5'→3') Sense primer	下游引物(5'→3') Antisense primer	产物长度/bp Product size
IFN- γ	AGCCAAATTGTCTCCTTC	AAACAGCGTCTGACTCCT	270
IL-10	AAGCCTTGTCGGAGATGA	CTTTGTAGACGCCTTCCTC	228
18S rRNA	TCCAGCTCCAATAGCGTAT	TAATCATGGCCTCAGTTCC	289

1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行单因子方差分析,Duncan 法进行多重比较,试验数据采用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠内环境的影响

2.1.1 对微生物活力的影响 由表 3 可知,复方中

药对盲肠 pH 无显著影响($P>0.05$);随日粮复方中药添加水平的升高,盲肠 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度呈先下降后上升的趋势,cCHM2 组 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度较对照组和 cCHM1 组分别显著($P<0.05$)降低了 21.62%和 21.50%,其他各组间无显著差异($P>0.05$)。盲肠菌体蛋白含量随日粮复方中药添加水平的升高呈先上升后下降的趋势,cCHM2 组 MCP 含量较对照组提高了 16.81%,差异显著($P<0.05$),其他各组间差异不显著($P>0.05$)。

表 3 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠微生物活力的影响

Table 3 Effects of dietary supplemental cCHM on the caecum microorganism vitality of weaned rex rabbits

组别 Groups	pH	$\text{NH}_3\text{-N}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	菌体蛋白/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ MCP
对照 Control	6.54±0.13	62.93±1.69 a	5.95±0.73 b
cCHM1	6.53±0.14	62.83±7.73 a	6.38±0.39 ab
cCHM2	6.48±0.21	49.31±3.58 b	6.95±0.58 a
cCHM3	6.57±0.16	60.94±17.39 ab	6.37±0.23 ab

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note:In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference($P<0.05$),with different capital letter superscripts mean significant difference($P<0.01$). The same as below.

2.1.2 对微生物数量的影响 由表 4 可知,复方中药添加剂可提高断奶獭兔盲肠乳酸杆菌数量,除 cCHM1 组外,cCHM2 组、cCHM3 组乳酸杆菌数量较对照组分别提高了 18.31%和 16.50%,差异达显著水平($P<0.05$),其他各组间差异不显著($P>$

0.05)。复方中药添加剂对大肠杆菌的抑制效果低于对照组中的抗生素杆菌肽锌,cCHM1 组、cCHM2 组、cCHM3 组大肠杆菌数量分别比对照组提高了 22.22%,16.39%和 23.50%,差异显著($P<0.05$),各试验组间差异不显著($P>0.05$)。

表 4 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠乳酸杆菌和大肠杆菌数量的影响

Table 4 Effects of dietary supplemental cCHM on quantity of *lactobacilli* and *E.coli* in cecum of weaned rex rabbits

组别 Groups	乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i>	大肠杆菌 <i>E.coli</i>	组别 Groups	乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i>	大肠杆菌 <i>E.coli</i>
对照 Control	7.21±0.76 b	5.49±0.55 b	cCHM2	8.53±0.78 a	6.39±0.21 a
cCHM1	8.32±0.43 ab	6.71±0.19 a	cCHM3	8.40±0.23 a	6.78±0.18 a

2.2 复方中药添加剂对断奶獭兔脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的影响

2.2.1 脾脏总 RNA 的检测 提取的脾脏总 RNA 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,结果显示,各泳道 28S、18S 条带清晰,隐约可见 5S 条带,并且 28S 条带亮度大约是 18S 条带亮度的 2~3 倍(图 1);紫外分光光度计测得的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.85~2.01,质量浓度为 1 460~2 900 ng/ μL 。表明总 RNA 的

完整性及纯度较好,可以用来进行反转录及实时定量。

2.2.2 cDNA 的检测 以脾脏总 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,用 IL-10、IFN- γ 、18S rRNA 基因引物分别进行 PCR 扩增,产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,扩增的目的条带单一,无非特异性条带出现,其长度分别为 228,270 和 289 bp (图 2),说明 PCR 扩增成功,合成的 cDNA 可以用

来进行实时定量 PCR。



图 1 断奶獭兔脾脏总 RNA 的电泳结果
Fig. 1 Electrophoresis result of total RNA of spleen of weaned rex rabbits

2.2.3 产物特异性的检测 为消除非特异性扩增产物及引物二聚体对实时荧光定量结果产生的影响,在 PCR 结束后,系统所设程序会自动生成熔解曲线,以确定 PCR 产物是否为目的片段。本试验

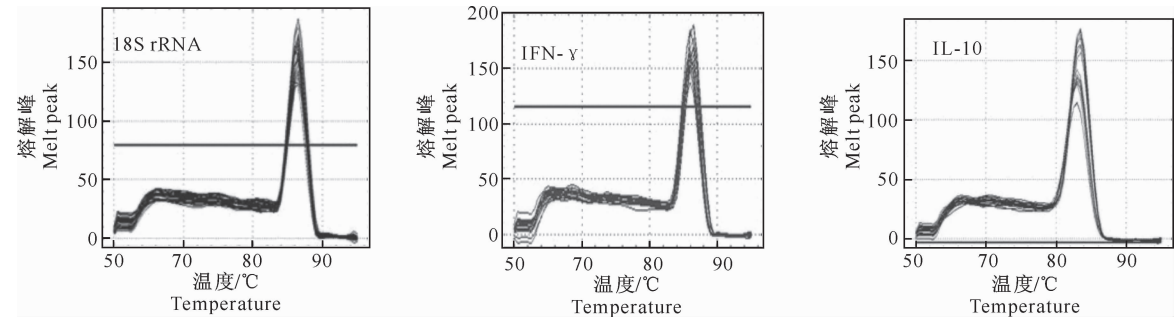


图 2 断奶獭兔脾脏 IL-10,IFN- γ 和 18S rRNA 的 PCR 扩增
1. IL-10;2. IFN- γ ;3. 18S rRNA;4. DL 2000 DNA Marker
Fig. 2 PCR products of IL-10,IFN- γ and 18S rRNA of spleen of weaned rex rabbits

18S rRNA、IFN- γ 、IL-10 基因片段 PCR 产物的熔解曲线如图 3 所示。由图 3 可以看出,目的基因片段扩增峰单一,无其他峰出现,表明引物特异性较强,无引物二聚体及非特异性产物形成。

图 3 断奶獭兔脾脏 18S rRNA、IFN- γ 和 IL-10 基因的熔解曲线
熔解峰为每个温度下的相对荧光单位数据的负导数

Fig. 3 The melt curve of 18S rRNA, IFN- γ and IL-10 of spleen of weaned rex rabbits
Melt peak is the negative derivate of fluorescence versus the temperature

2.2.4 脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的相对表达量 由表 5 可知,随着复方中药添加比例的提高,IFN- γ mRNA 的相对表达量呈上升趋势,cCHM1 组 IFN- γ mRNA 的相对表达量显著($P<0.05$)高于对照组,cCHM2 组和 cCHM3 组极显著($P<0.01$)高于

对照组和 cCHM1 组;随日粮复方中药添加水平的升高,IL-10 mRNA 的相对表达量呈先上升后下降的趋势,cCHM2 组、cCHM3 组极显著($P<0.01$)高于对照组和 cCHM1 组,而其余各组间差异不显著($P>0.05$)。

表 5 复方中药添加剂对断奶獭兔脾脏 IFN- γ 和 IL-10 mRNA 表达量的影响

Table 5 Effects of dietary supplemental cCHM on mRNA relative expression of IFN- γ and IL-10 of spleen of weaned rex rabbits					
组别 Groups	IFN- γ		IL-10		
对照 Control	1.00 $\pm$ 0.00	Bc	1.00 $\pm$ 0.00	Bb	组别 Groups
cCHM1	1.17 $\pm$ 0.13	Bb	0.86 $\pm$ 0.06	Bb	IFN- γ
					IL-10
					对照 Control
					cCHM2
					cCHM3

3 讨 论

3.1 复方中药组方解析

本试验复方中药由炙黄芪、党参、炒白术、炒茯

苓、炙甘草、陈皮、麦芽、黄柏、黄芩、连翘等 10 味中药组成,其中炙黄芪、党参、炒白术、炒茯苓、炙甘草健脾补气,可增强免疫力;陈皮、麦芽健胃消食;黄柏、黄芩、连翘清热解毒,可抑制肠道中的致病菌,调节肠道

微生态平衡,改善肠道健康水平。将各味中药合理组方并添加于断奶獭兔日粮中,可增强机体免疫,改善肠道健康,从而提高断奶獭兔的生长性能。

3.2 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠内环境的影响

3.2.1 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠微生物活力的影响 目前,关于中药添加剂对畜禽盲肠发酵调节的研究较多。植物提取物可以显著影响盲肠细菌分泌的酶活性,改善盲肠物质代谢,进而对盲肠微生物活力产生影响^[24-25]。荣娜^[26]研究发现,中药成分小檗碱可保持獭兔盲肠 pH 相对稳定,显著提高盲肠微生物脱氢酶总活力,促进 MCP 合成,增强微生物活力,但复方中药对家兔盲肠微生物活力的影响尚未见报道。家兔盲肠是微生物发酵的主要场所,盲肠 pH、NH₃-N 浓度、MCP 含量等是反映微生物活力的主要指标,它们之间还具有一定的关联性: NH₃-N 浓度降低说明盲肠微生物利用 NH₃-N 的效率提高, MCP 合成能力增强,微生物活力增强; NH₃-N 呈弱碱性, NH₃-N 浓度下降, pH 下降。本试验表明,复方中药降低了盲肠 NH₃-N 浓度,提高了 MCP 含量,改善了盲肠微生态环境,有利于肠道健康,其主要原因可能在于:一方面,复方中药具有抑制盲肠微生物脲酶活性的作用,降低了 NH₃-N 的产生;另一方面,复方中药提高了盲肠微生物的活力,增强了盲肠微生物利用 NH₃-N 合成 MCP 的能力。

3.2.2 复方中药添加剂对断奶獭兔盲肠微生物数量的影响 肠道菌群是肠粘膜屏障的重要组成部分,在营养物质的消化吸收、肠道健康、免疫应答等方面发挥着重要作用。肠道内的乳酸杆菌和大肠杆菌通常会被分别看作有益菌及致病菌的代表。目前,有关中药添加剂在调控畜禽肠道微生物作用方面的研究较多,但报道结果不尽一致。刘合军等^[17]研究发现,复方中药可显著提高断奶仔猪肠道乳酸杆菌的数量,降低大肠杆菌的数量; Demir 等^[18]报道,中药可以替代抗生素作为肉仔鸡的生长促进剂,但并未显著影响盲肠大肠杆菌的数量; Krieg 等^[8]采用 PCR-DGGE 技术研究了复方中药对幼兔肠道菌群的影响,结果发现,复方中药可显著降低盲肠微生物的多样性,这表明在微生物的组成中优势菌群占据绝对优势; Corduk 等^[19]通过试验发现,植物提取物可以提高肉仔鸡的体质量及饲料转化率,但并未对肠道大肠杆菌、总需氧菌等致病菌的数量产生显著影响。造成这些试验结果不一致的原因,可能与日粮组成、中药的来源及性质、动物种类等因素有关。本试验对照组乳酸杆菌和大肠杆菌数量显著下

降,这说明抗生素不仅可杀灭病原菌,同时也可抑制有益菌,导致菌群失调;复方中药抑制大肠杆菌的效果不及抗生素,但复方中药可以通过增加乳酸杆菌数量占据肠道位点,抑制大肠杆菌在肠粘膜的吸附定植,改善肠道微生物区系,有利于肠道健康。在饲养试验中复方中药组腹泻率要低于对照组,这也充分说明了复方中药提高了断奶獭兔的肠道健康水平。

3.3 复方中药添加剂对断奶獭兔脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的影响

IFN- γ 和 IL-10 具有重要的抗感染免疫功能。IFN- γ 是 Th1 型细胞因子,主要介导细胞免疫、迟发型变态反应等; IL-10 是 Th2 型细胞因子,主要介导体液免疫、辅助 B 细胞分化和产生抗体。脾脏作为一种重要的外周免疫器官,观察脾脏细胞因子的表达量,对于阐明复方中药对断奶獭兔免疫机能的影响至关重要。体外试验表明,复方中药成分可显著促进家兔外周血淋巴细胞增殖,提高 IFN- γ 、IL-10 mRNA 在淋巴细胞中的表达量^[22]。动物试验发现,复方中药可显著提高血清中 Th1 型、Th2 型细胞因子含量,增强机体免疫力^[27]。细胞因子是一类小分子量的可溶性蛋白质,蛋白质表达水平可通过检测 mRNA 来反映。本试验从分子生物学角度阐明了复方中药对脾脏 IFN- γ 、IL-10 mRNA 相对表达量的影响,结果表明,复方中药可提高脾脏 IFN- γ 、IL-10 基因的相对表达,促进 IFN- γ 、IL-10 的分泌,增强机体的免疫应答能力。

4 结 论

在断奶獭兔日粮中添加复方中药可降低盲肠氨态氮浓度,增加菌体蛋白含量,改善盲肠微生物区系,促进脾脏 IFN- γ 、IL-10 基因的表达,增强机体的免疫应答能力,从而有利于断奶獭兔的肠道健康。本试验条件下复方中药添加剂的适宜用量为 10 g/kg。

[参考文献]

- [1] Chamorro S, Gómez-conde M S, Pérez de rozas A M, et al. Effect on digestion and performance of dietary protein content and increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits [J]. Animal, 2007, 1(5): 651-659.
- [2] Gómez-conde M S, García J, Chamorro S, et al. Neutral detergent-soluble dietary fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits [J]. Journal of Animal Science, 2007, 85(12): 3313-3321.
- [3] Trocino A, Xiccato G, Carraro L, et al. Effect of diet supplementation with Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on

- performance and health of growing rabbits [J]. World Rabbit Science, 2005, 13(1): 17-28.
- [4] Pinheiro V, Mourão J L, Jimenez G. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on the breeding performances of primiparous rabbit does [J]. World Rabbit Science, 2007, 15(4): 179-188.
- [5] Mourao J L, Pinheiro V, Alves A, et al. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits [J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 126(1/2): 107-120.
- [6] Skřivanová V, Marounek M. Effect of caprylic acid on performance and mortality of growing rabbits [J]. Acta Veterinaria Brno, 2002, 71(4): 435-439.
- [7] Skřivanová V, Marounek M. A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric acid on performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits [J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 127(1/2): 161-168.
- [8] Krieg R, Vahjen W, Awad W, et al. Performance, digestive disorders and the intestinal microbiota in weaning rabbits are affected by a herbal feed additive [J]. World Rabbit Science, 2009, 17(2): 87-95.
- [9] 孔祥峰, 吴 信, 印遇龙, 等. 中药饲料添加剂的研发 [J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(11): 35-37.
Kong X F, Wu X, Yin Y L, et al. The research and development of Chinese herbal additive [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 39(11): 35-37. (in Chinese)
- [10] Kong X F, Wu G Y, Liao Y P, et al. Effects of Chinese herbal ultra-fine powder as a dietary additive on growth performance, serum metabolites and intestinal health in early-weaned piglets [J]. Livestock Science, 2007, 108(1/2/3): 272-275.
- [11] Manzanilla E G, Perez J F, Martin M, et al. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs [J]. Animal Science, 2004, 82(11): 3210-3218.
- [12] Sarica S, Ciftci A, Demir E, et al. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets [J]. South African Journal of Animal Science, 2005, 35(1): 61-72.
- [13] Kong X F, Hu Y L, Rui R, et al. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken [J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(7): 975-982.
- [14] Liu F X, Sun S, Cui Z Z. Analysis of immunological enhancement of immunosuppression chickens by Chinese herbal extracts [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 127(2): 251-256.
- [15] Sun J L, Hu Y L, Wang D Y, et al. Immunological enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines [J]. Vaccine, 2006, 24(13): 2343-2348.
- [16] Chen Y, Wang D, Hu Y, et al. Astragalus polysaccharide and oxymatrine can synergistically improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 425-428.
- [17] 刘合军, 印遇龙, 孔祥峰, 等. 中药复方对早期断奶仔猪肠道微生态的影响 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 53-58.
Liu H J, Yin Y L, Kong X F, et al. Effects of Chinese herbal formula as a dietary additive on gut microflora in early-weaned piglets [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2008, 24(1): 53-58. (in Chinese)
- [18] Demir E, Sarica E, Ozcan Ma, et al. The use of natural feed additives as alternative to an antibiotic growth promoter in broiler diets [J]. Archiv Fur Geflugelkunde, 2005, 69(3): 110-116.
- [19] Corduk M, Ceylan N, Dede N, et al. Effects of novel feed additives on performance, carcass traits and *E. coli*, aerobic bacteria and yeast counts in broilers [J]. Archiv Fur Geflugelkunde, 2008, 72(2): 61-67.
- [20] 蒲万霞, 魏云霞, 孟晓琴, 等. 靛酚蓝-分光光度法测定胃肠道内容物中氨态氮含量研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(5): 13-17.
Pu W X, Wei Y X, Meng X Q, et al. Determination of NH_4^+ -N content in castrintestinal with indophenol blue spectrophotometric method [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2008, 43(5): 13-17. (in Chinese)
- [21] Windschitl P M, Stern M D. Effects of urea supplementation of diets containing lignosulfonate-treated soybean meal on bacterial fermentation in continuous culture of ruminal contents [J]. Journal of Animal Science, 1988, 66: 2948-2958.
- [22] Yang L S, Hu Y L, Xue J B, et al. Compound Chinese herbal medicinal ingredients can enhance immune response and efficacy of RHD vaccine in rabbit [J]. Vaccine, 2008, 26(35): 4451-4455.
- [23] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] Zdunczyk P, Matusevicius P, Juskiewicz J, et al. Gastrointestinal tract response to dietary probiotic (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) and phytogetic preparation containing herbs, and spices and essential oils in growing White New Zealand rabbits [J]. Archiv Fur Geflugelkunde, 2011, 75(2): 125-131.
- [25] Juskiewicz J, Gruzauskas R, Zdunczyk Z, et al. Effects of dietary addition of *Macleaya cordata* alkaloid extract on growth performance, caecal indices and breast meat fatty acids profile in male broilers [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2010, 95(2): 171-178.
- [26] 荣 娜. 小檗碱促进獭兔生长代谢、盲肠微生物活力及免疫性能的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
Rong N. Study on berberine improving growth metabolism and caecum microorganism vitality and immunity in otter rabbit [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2007. (in Chinese)
- [27] Lien T F, Horng Y M, Wu C P. Feasibility of replacing antibiotics feed promoters with the Chinese traditional herbal medicine Bazhen in weaned pigs [J]. Livestock Science, 2007, 107(2/3): 97-102.