

益生菌对雏鸡肠道黏膜体液免疫与细胞免疫的影响

杨玉荣¹,姜义宝¹,郑世民²,马春全³

(1 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002; 2 东北农业大学 动物医学院,黑龙江 哈尔滨 150030;
3 佛山科学技术学院,广东 佛山 528000)

[摘要] 为了观察益生菌对雏鸡肠道黏膜免疫的影响,将 60 只雏鸡随机分为益生菌组和对照组,分别在灌服益生菌后 1,4,7,10 和 18 d,采集肠液、十二指肠派伊尔结和盲肠扁桃体,观测肠道黏膜抗体生成细胞数量、T 细胞数量和肠液免疫球蛋白相对含量的变化,并在服用益生菌后 4 d 对盲肠扁桃体的超微结构进行了常规透射电镜及扫描电镜观察。结果表明,在服用益生菌后 7 d,雏鸡肠液的 IgA 高于未服用益生菌的对照雏鸡($P<0.01$),十二指肠派伊尔结的 IgG 生成细胞数量在 10 d、IgM 生成细胞数量在 7 d 明显高于对照组雏鸡($P<0.05$),盲肠扁桃体弥散区的 IgA 生成细胞数量在 7~10 d、IgG 生成细胞数量在 7 d、IgM 生成细胞数量在 4~7 d 明显高于对照组雏鸡($P<0.05$);盲肠扁桃体的 T 淋巴细胞在雏鸡服用益生菌后 7 d 明显高于对照组($P<0.01$);盲肠扁桃体绒毛表面的微绒毛密度和长度在服用益生菌后 3 d 也明显提高;随着雏鸡日龄增加,益生菌的影响逐渐减弱。可见,益生菌能够提高雏鸡生长初期的肠道黏膜免疫。

[关键词] 雏鸡;益生菌;肠道黏膜免疫;盲肠扁桃体;超微结构

[中图分类号] S858.312.5⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0025-05

Effect of probiotics on intestinal mucosal humoral immunity and cellular immunity of chickens

YANG Yu-rong¹,JIANG Yi-bao¹,ZHENG Shi-min²,MA Chun-quan³

(1 College of Animal and Veterinary Engineering, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China;
2 College of Veterinary Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;
3 Foshan University, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Sixty chickens were randomly divided into two groups to determine the effect of oral administration of probiotics on the intestinal mucosal immune response. The first group (control) was fed with a basic diet without antibiotic or probiotics. The second group was fed with the same diet as the control, except receiving drinking water with probiotics. Intestinal fluid, Peyer's patch and cecal tonsils were taken at day 1, 4, 7, 10 and 18 after administration of probiotics. The number of antibody-forming cells and lymphocytes of intestine, and the content of immunoglobulin of intestinal fluid were observed. Besides, the ultrastructure of cecal tonsils was observed by scanning electron microscope (SEM) micrographs and transmission electron microscope (TEM) micrographs at day 4 after orally fed with probiotics. The results showed that compared with the control, probiotics enhanced the content of following items: IgA in the intestinal fluid at day 7 ($P<0.01$), the IgG-forming cells at day 10 ($P<0.05$), IgM-forming cells in the Peyer's patch at day 7 ($P<0.05$), IgA-forming cells at day 7-10 ($P<0.05$), IgG-forming cells at day 7 ($P<0.05$) and IgM-forming cells in cecal tonsils dif-

* [收稿日期] 2006-11-23

[基金项目] 黑龙江省重点科技攻关项目(JC01B509)

[作者简介] 杨玉荣(1977-),女,黑龙江佳木斯市人,讲师,博士,主要从事动物营养与免疫及动物病理研究。E-mail: yangyu7712@sina.com

fuse area at day 4–7 ($P < 0.05$). T lymphocytes in cecal tonsils were enhanced at day 7 ($P < 0.01$) after orally fed with probiotics. The density of microvilli and length of cecal tonsils increased after probiotics were administered at day 4. With chicken aging, the efficiency of probiotics would decrease. These results suggested that probiotics could enhance intestinal mucosal immunity of chicken at the early age.

Key words: chicken; probiotics; intestinal mucosal immunity; cecal tonsils; ultrastructure

益生菌是一种可通过改变肠道菌群平衡而对动物施加有利影响的活微生物饲料添加剂,现已广泛应用于食品、医药以及畜牧业。益生菌通过改善动物体内的菌群和刺激免疫系统而达到保健、防病的功效,是人类和动物保健的理想选择^[1]。禽肠道局部黏膜是病原入侵的主要门户之一,肠道黏膜的免疫状态影响禽抵抗病原的能力,国内外资料证明,益生菌有增强动物免疫的作用^[2-4],但多是关于哺乳类动物的研究,而有关其对禽肠道黏膜免疫的研究少见报道。本研究对服用益生菌的雏鸡局部肠道黏膜免疫进行研究,观察益生菌对雏鸡肠道黏膜的抗体生成细胞数量、T细胞数量变化和肠液免疫球蛋白相对含量的影响,以期为益生菌的临床应用及进一步阐明其调节肠道黏膜免疫的作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1日龄罗曼褐商品健康雏鸡,购自哈尔滨市某孵化场。益生菌是直接饲喂的微生态活菌制剂,包括芽孢杆菌、酵母菌及乳酸菌,活菌 $\geq 80 \times 10^8$ /g。兔抗鸡 IgA/IgM/IgG 抗体由本课题组制备。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物分组及处理 1日龄雏鸡 60 只,随机分为 2 组,即益生菌组(P组,30 只)和对照组(C组,30 只)。P组雏鸡于 1日龄时连续灌服益生菌稀释液 3 d,每天 1 次(4×10^9 cfu/(d·只)),C组同时灌服等量生理盐水。两组雏鸡饲料不含抗生

素,分别隔离饲养。

1.2.2 被检材料采取 P、C组雏鸡于灌服益生菌后第 1,4,7,10 和 18 d,每组随机抽取 5 只雏鸡,心脏采血处死,快速采集肠液、盲肠扁桃体和十二指肠派伊尔结。肠液于 -20°C 保存备检;左侧盲肠扁桃体和派伊尔结固定于体积分数 10%的中性福尔马林溶液中, -4°C 保存备检;右侧盲肠扁桃体固定于体积分数 2.5%的戊二醛溶液中, -4°C 保存备检。

1.2.3 检测指标及方法 肠液 IgA、IgG 和 IgM 相对含量采用间接 ELISA 法测定,盲肠扁桃体、派伊尔结的 IgA、IgM 和 IgG 生成的细胞数量采用组织切片及免疫组织化学方法测定,肠道中 T 淋巴细胞数量采用组织切片及酸性 α -醋酸萘酯酶染色法测定,盲肠扁桃体超微结构采用常规透射电镜及扫描电镜方法观察。

1.2.4 数据处理 试验数据采用 SAS8.02 软件进行处理,比较各组差异,数据以“ $\bar{X} \pm S$ ”表示。

2 结果与分析

2.1 益生菌对肠道黏膜体液免疫的影响

由图 1 可以看出,雏鸡服用益生菌后 1~10 d,其肠液的 IgA 含量高于未服用益生菌的对照组,其中在第 7 天差异达极显著($P < 0.01$);雏鸡服用益生菌组的 IgM 和 IgG 含量在 1~10 d 也高于对照组,但无显著差异($P > 0.05$)。随着日龄继续增加,2 组雏鸡肠液的免疫球蛋白含量无明显差别。

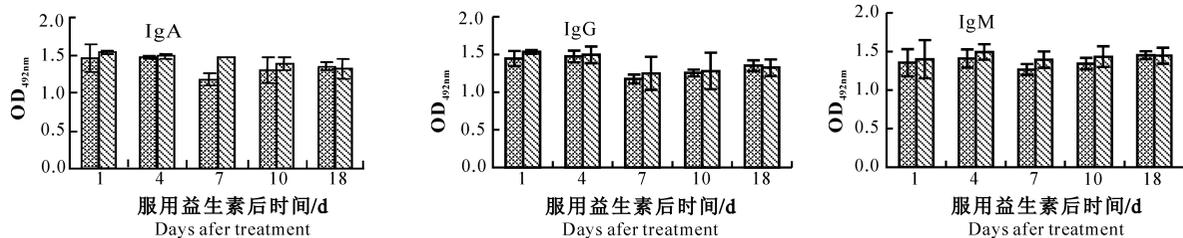


图1 雏鸡服用益生菌后肠液IgA、IgG和IgM免疫球蛋白相对含量的动态变化

■: C; ▨: P

Fig.1 Changes of the relative content of IgA, IgG and IgM in intestinal fluid of chicken

由表 1 可知,雏鸡服用益生菌后,盲肠扁桃体弥散区的 IgA 抗体生成细胞在 7~10 d、IgG 抗体生成

细胞在 7 d、IgM 抗体生成细胞在 4~7 d 明显高于对照组雏鸡($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);盲肠扁桃体的

淋巴小结在 10 日龄以后出现,即服用益生菌后 7 d 出现,雏鸡服用益生菌后,盲肠扁桃体淋巴小结的 IgA、IgG、IgM 抗体生成细胞均不同程度地高于对照组雏鸡,但二者并无统计学差异。由图 2 可见,雏

鸡服用益生菌后,十二指肠派伊尔结的 IgA 抗体生成细胞数量高于对照,但无统计学差异;IgG 和 IgM 抗体生成细胞数量分别在服用益生菌后 10 和 7 d,明显高于对照组雏鸡($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

表 1 雏鸡服用益生菌后盲肠扁桃体抗体生成细胞数量的动态变化

Table 1 Changes of antibody forming cells in cecal tonsils of chicken

$10^3/\text{mm}^2$

服用时间/d Days	组别 Group	盲肠扁桃体弥散区 Cecal tonsils diffuse area			盲肠扁桃体淋巴小结 Cecal tonsils lymphoid nodule		
		IgA ⁺	IgG ⁺	IgM ⁺	IgA ⁺	IgG ⁺	IgM ⁺
1	C	4.8±1.79	5.6±2.19	7.2±1.79	—	—	—
	P	5.6±2.19	5.6±1.67	8.0±2.83	—	—	—
4	C	11.0±0.71	4.8±3.35	5.6±2.79	—	—	—
	P	11.6±0.55	7.2±1.79	8.8±1.79*	—	—	—
7	C	14.0±2.19	5.6±2.20	7.2±3.35	3.0±0.71	4.0±0.71	4.0±0.71
	P	24.0±3.58*	6.4±3.56*	12.0±2.83**	3.6±0.55	4.6±0.55	5.0±0.71
10	C	18.0±1.79	8.0±2.84	9.6±2.19	3.6±0.55	4.6±0.55	4.2±0.45
	P	26.0±2.96*	9.6±2.20	10.4±3.58	4.4±1.67	5.0±0.71	4.4±0.55
18	C	23.0±0.71	16.0±2.80	14.4±2.20	4.8±0.84	5.0±0.71	4.8±0.84
	P	23.4±1.14	17.6±2.22	16.0±2.84	5.0±0.71	5.4±0.89	5.0±1.00

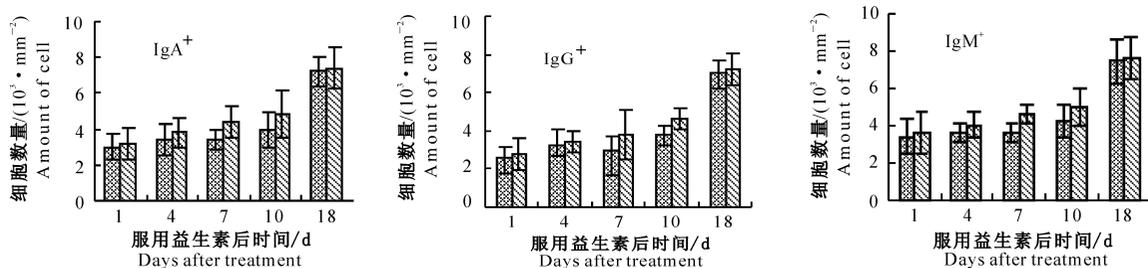


图2 雏鸡服用益生菌后十二指肠派伊尔结抗体生成细胞数量的变化

■:C;▨:P

Fig.2 Changes of the antibody forming cells in duodenum Peyer's patch of chicken

2.2 雏鸡服用益生菌后肠道 T 淋巴细胞数量的动态变化

图 3 表明,雏鸡服用益生菌后,肠道 T 细胞数

量高于对照组雏鸡,其中只有盲扁桃体的 T 细胞数量在服用益生菌后的 7 d 明显高于对照组雏鸡 ($P<0.01$),其余处理间均无统计学差异。

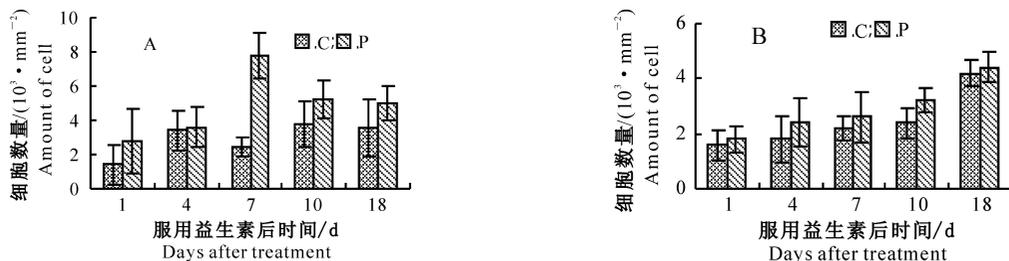


图 3 雏鸡服用益生菌后肠道的 T 细胞数量变化

A. 盲肠扁桃体;B. 十二指肠派伊尔结

Fig.3 Changes of the T cells in intestine of chicken

A. Cecal tonsils;B. Duodenum Peyer's patch

2.3 益生菌对雏鸡盲肠扁桃体形态学的影响

扫描电镜(图 4)观察发现,服用益生菌的雏鸡盲肠扁桃体黏膜皱襞增多,绒毛表面间隔线不明显,区域略隆起,区域交界线不明显,绒毛表面的微绒毛

致密度增加。透射电镜观察发现,服用益生菌的雏鸡盲肠扁桃体吸收细胞微绒毛长度约为 $0.96\sim 1.6\mu\text{m}$,高于未服用益生菌的雏鸡 ($0.8\sim 1.13\mu\text{m}$);吸收细胞和淋巴细胞粗面内质网发达,线粒体丰富。

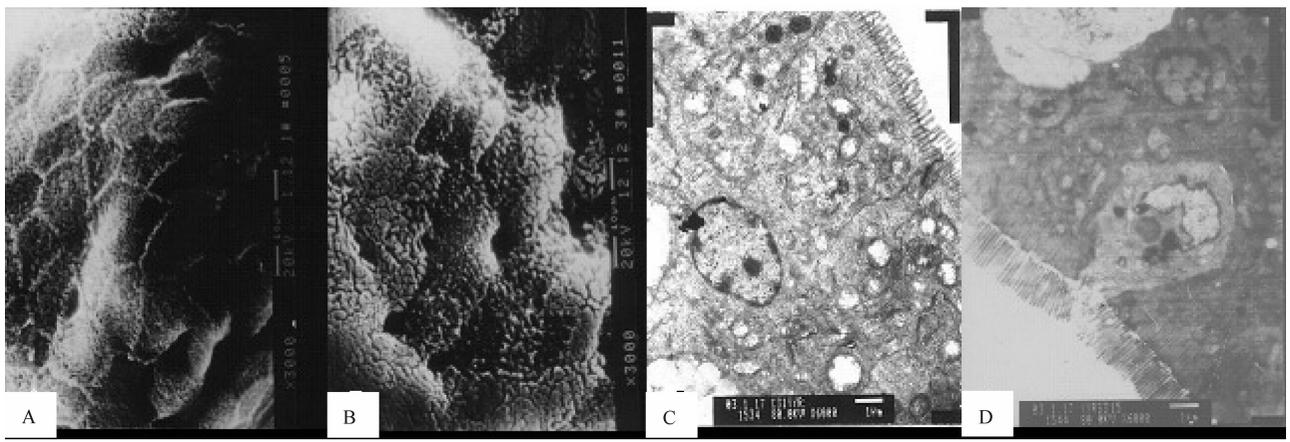


图4 雏鸡服用益生菌4 d后盲肠扁桃体的透射电镜和扫描电镜观察

A. 对照组扫描电镜观察, $\times 3\ 000$; B. 益生菌组扫描电镜观察, $\times 3\ 000$; C. 对照组透射电镜观察, $\times 6\ 000$; D. 益生菌组透射电镜观察, $\times 6\ 000$

Fig. 4 Scanning electron microscope (SEM) micrographs and transmission electron microscope (TEM) micrographs of the mucosal surface of chicken cecal tonsils with application of probiotics after 4 d

A. Control group by SEM, magnification $\times 3\ 000$; B. Probiotics group by SEM, magnification $\times 3\ 000$;

C. Control group by TEM, magnification $\times 6\ 000$; D. Probiotics group by TEM, magnification $\times 6\ 000$

3 讨论

雏鸡消化道是病原微生物感染的主要门户之一^[5],其局部黏膜免疫是全身免疫的重要组成部分,黏膜的免疫成分和非免疫成分可对各种病原刺激产生反应来保护机体,其中 T、B 淋巴细胞也在局部免疫防御中起着重要作用。本试验发现,给 1 日龄雏鸡连续服用益生菌 3 d,益生菌能够在服用后 7~10 d 提高雏鸡局部肠道黏膜的体液免疫和细胞免疫,这与乳酸菌能够刺激哺乳动物产生抗体的报道相一致^[6],小鼠口服乳酸菌和酵母菌能够提高肠道的 IgA 生成细胞数量^[7],小鼠注射干酪乳杆菌 LC9018 能够提高脾脏细胞的免疫^[8]。

益生菌能够增加雏鸡肠道抗体生成细胞和免疫球蛋白的产生,可能是益生菌含有的乳酸菌和芽孢菌增强了派伊尔结对抗原的识别能力,益生菌作为无害抗原活化肠道相关淋巴组织,激活免疫器官生发中心的 B 细胞,使其转化为浆细胞。浆细胞经胸导管进入血循环,在特异的归巢受体介导下,归巢到致敏部位的黏膜内,即肠黏膜内,形成肠黏膜中的抗体生成细胞和分泌免疫球蛋白,从而发挥其免疫效应功能。

本研究观察发现,雏鸡服用益生菌后,其盲肠扁桃体的黏膜皱襞增多,绒毛表面间隔线不明显,表明微绒毛密度增大,透射电镜观察也发现微绒毛长度增加。微绒毛有保护和参与细胞间黏着的作用,微绒毛上附着有大量淀粉酶和胰蛋白酶,对食物先进

行消化,其含有双糖酶和多肽酶,能将双糖和多肽水解为单糖和氨基酸,因此参与蛋白质和碳水化合物的终端消化,而且微绒毛含有的唾液酸糖蛋白对上皮细胞间的黏着起着重要作用。微绒毛密度和长度的增加,说明小肠黏膜对物质的吸收面积增大,吸收机能增强。透射电镜观察还发现,服用益生菌雏鸡吸收和淋巴细胞的线粒体、核糖体增多,内质网发达。线粒体是细胞生物氧化的主要场所,三羧酸循环、呼吸链电子传递和氧化磷酸化等产能过程均在此进行,是提供细胞生命活动所需能量的主要部分。内质网在细胞生物合成功能有重要作用,粗面内质网上的核糖体是细胞合成蛋白质的场所。益生菌组雏鸡肠吸收细胞中上述细胞器增多,结构形态的改变表明细胞对蛋白质、脂类、糖类的代谢增强,进而促进细胞数量特别是肠吸收细胞、淋巴细胞的增多,免疫机能得以改善。

Ichikawa 等^[9]报道,益生菌能够诱导大鼠肠道上皮细胞增殖。微绒毛长度的增加可以加强肠道表面积,并能提高吸收能力^[10]。Langhout 等^[11]和 Shamoto 等^[12]也指出,肠道内较长的微绒毛和较多的分裂细胞,预示着肠道微绒毛功能的增强,该结果也证明了益生菌能够增强微绒毛的功能。

综上所述,含有芽孢杆菌、酵母菌及乳酸菌的益生菌,能够提高雏鸡早期生长阶段的肠道黏膜免疫反应。但不同的菌种具有不同的特性,还需要进一步试验,以明确究竟是哪一种菌具有主要的免疫调节能力。

[参考文献]

- [1] Bornet F R, Brouns F. Immune-stimulating and gut health promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides[J]. Nutrition Reviews, 2002, 60(10): 326-334.
- [2] Kelly S S. Prebiotics and probiotics: impact on gut microbial populations, nutrient digestibilities, fecal protein catabolite concentrations, and immune function of humans and dogs[D]. Urbana (USA): University of Illinois Urbana-Champaign, 2002: 1-26.
- [3] Benvacoub J, Czarnecki-Maulden G L, Cavadini C, et al. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(4): 1158-1162.
- [4] 杨玉荣, 郑世民, 刘晶, 等. 雏鸡服用益生菌后免疫器官指数及局部体液免疫球蛋白相对含量的动态变化[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 352-356.
- [5] 刘忠贵, 郑世民, 杨丽萍, 等. 感染鸡贫血病毒雏鸡接种新城疫疫苗后局部粘膜免疫功能的变化[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(2): 187-191.
- [6] Yasui H, Ohwaki M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(4): 1187-1195.
- [7] Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, et al. Immune system stimulation by probiotics[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(7): 1597-1606.
- [8] Kato I, Yokokura T, Mutai M. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens[J]. Microbiology and Immunology, 1984, 28(2): 209-217.
- [9] Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, et al. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat[J]. Digestive Diseases and Sciences, 1999, 44(10): 2119-2123.
- [10] Caspary W F. Functional morphology of the intestines [J]. Zeitschrift Gastroenterologie Verhandlungsband, 1987, 22: 39-49.
- [11] Langhout D J, Schutte J B, Van Leeuwen P, et al. Effect of dietary high and low methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks[J]. British Poultry Science, 1999, 40(3): 340-347.
- [12] Shamoto K, Yamauchi K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures[J]. Poultry Science, 2000, 79(5): 718-723.

(上接第 24 页)

[参考文献]

- [1] Teshome M, Marck J M, Koolen, et al. Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope[J]. Journal of Virology, 2002, 76(20): 10138-10146.
- [2] 江国托. 核酸疫苗研究进展[J]. 中国禽业导刊, 2005, 22(3): 37-39.
- [3] Cascinelli N, Clemente C, Bufalino R, et al. Perinodular injection of thymopentin (TP5) in cutaneous and subcutaneous metastases of melanoma[J]. Melanoma Res, 1993, 3(6): 471-476.
- [4] Kantharia B K. Thymopentin (TP-5) in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology, 1989, 28(2): 118-123.
- [5] Scheerlinck J. Genetic adjuvant for DNA vaccines[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 1247-1256.
- [6] 蓝晓红, 王莉. 国内胸腺肽的药理学研究及临床应用进展[J]. 药学实践杂志, 2004, 22(3): 157-159.
- [7] Conser S, Weber E, Folker G, et al. Peptides and polypeptide as modulators of the immune response: thymopentin an example with unknown mode of action[J]. Pharm Acta Helv, 1999, 73(6): 265-268.
- [8] 刘兆球, 姜世金, 常维山. 新城疫病毒 F 基因的真核表达及其免疫原性检测[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(10): 5-7.
- [9] Bona C A, Casares S, Brumeau T D. Towards development of T-cell vaccines[J]. Immunol Today, 1998, 19(3): 126-133.