

分类号：
密 级：

单位代码：10019
学 号：B11103148

10
中国农业大学

学位论文

丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和
肉鸡肉品质影响的研究

Screening of *Clostridium butyricum* and its effects on animal
antioxidation and meat quality in broiler chickens

研 究 生： 廖秀冬

指 导 教 师： 张日俊 教授

申请学位门类级别： 农学博士

专 业 名 称： 动物营养与饲料科学

研 究 方 向： 饲料生物技术

所 在 学 院： 动物科技学院

2015年5月

分类号：
密 级：

单位代码：10019
学 号：B11103148

中国农业大学

学位论文

丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和 肉鸡肉品质影响的研究

**Screening of *Clostridium butyricum* and its effects on animal
antioxidation and meat quality in broiler chickens**

研 究 生： 廖秀冬

指 导 教 师： 张日俊 教授

申请学位门类级别： 农学博士

专 业 名 称： 动物营养与饲料科学

研 究 方 向： 饲料生物技术

所 在 学 院： 动物科技学院

2015年5月

China Agricultural University

Dissertation

**Screening of *Clostridium butyricum* and its effects on
animal antioxidation and meat quality in broiler chickens**

Ph.D. Candidate

Xiudong Liao

Supervisor

Professor Rijun Zhang

Major

Animal Nutrition and Feed Science

May, 2015

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中已经注明引用和致谢的内容外，论文中不包含本人和其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：廖香冬

时间：2015年6月10日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定。本人同意中国农业大学有权保存及向国家有关部门和机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人同意中国农业大学将本学位论文的全部或部分内 容授权汇编录入《中国博士学位论文全文数据库》或《中国优秀硕士学位论文全文数据库》进行出版，并享受相关权益。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

学位论文作者签名：廖香冬

时间：2015年6月10日

导师签名：张明庆

时间：2015年6月15日

摘要

本研究旨在分离筛选来源于动物肠道的丁酸梭菌并探讨其在提高动物抗氧化能力和改善肉鸡肉品质等方面的应用及其作用机理研究。

试验一旨在从不同动物肠道或粪便中分离筛选生物学性能和抗逆性优良的丁酸梭菌。通过强化梭菌培养基和梭菌选择性培养基以及丁酸梭菌的芽孢和严格厌氧特性分离得到了符合丁酸梭菌培养和形态特征的菌株,经 16S rDNA 初步鉴定获得了 16 株与丁酸梭菌相似性在 99% 以上的菌株。首先以丁酸和总短链脂肪酸 (SCFA) 产量为指标,对这些菌株进行初筛,从中挑选出产酸能力较优的 5 株菌进行 API-20A 生化鉴定和特异性分子鉴定;然后以淀粉酶和纤维素酶活力、活菌数、芽孢存活率、模拟胃液和模拟小肠液存活率为指标,对鉴定获得的丁酸梭菌进行复筛;最后从中挑选出一株生物学性能和抗逆性最优的丁酸梭菌进行后续试验,还发现该株菌可以产生超氧化物歧化酶 (SOD)、NADH 氧化酶以及 H_2 和 CO_2 等气体。

试验二探讨了丁酸梭菌对皮质酮 (CORT) 诱导的氧化应激小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响。75 只体重 20 g 左右的 SPF 级昆明种雄鼠随机分成 5 个处理组,每组 5 个重复。试验期 14 天。皮质酮按所需剂量溶解于橄榄油中,丁酸梭菌用生理盐水稀释成所需浓度。对照组皮下注射不含 CORT 的橄榄油和灌胃生理盐水,氧化应激组小鼠每天皮下注射 20 mg CORT/kg 体重和灌胃生理盐水,丁酸梭菌低剂量、中剂量和高剂量组小鼠分别在诱导氧化应激的基础上每天灌胃 1×10^5 CFU、 1×10^6 CFU 和 1×10^7 CFU 的丁酸梭菌。结果发现丁酸梭菌缓解了氧化应激导致的小鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活力和谷胱甘肽 (GSH) 含量的降低以及丙二醛 (MDA) 含量的升高;丁酸梭菌提高了小鼠结肠黏膜 SOD 和 GST 活力以及 GSH 含量,降低了 MDA 含量。丁酸梭菌降低了小鼠血清 CORT、胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇含量。

试验三研究了丁酸梭菌对肉鸡生长性能、肠道健康、免疫功能、抗氧化能力和肉品质的影响。试验选取 1 日龄体重相近的 AA 肉公雏 320 只,随机分到 5 个处理组,每个处理组 8 个重复。试验期 42 天。各处理组分别为:对照组饲喂基础日粮,丁酸梭菌组分别在基础日粮的基础上添加丁酸梭菌 2.5×10^8 CFU/kg、 5×10^8 CFU/kg 和 1×10^9 CFU/kg,抗生素组在基础日粮的基础上添加金霉素 150 mg/kg。结果发现,日粮中添加丁酸梭菌显著提高了肉鸡 1~21 天和 22~42 天的平均日增重;改善了 21 天和 42 天肉鸡十二指肠形态结构并提高了 21 天盲肠食糜中乙酸、丁酸和总 SCFA 的含量;提高了 21 天和 42 天肉鸡血清中 IgM 的含量;提高了 21 天和 42 天肉鸡十二指肠、空肠和回肠黏膜、血清和肝脏的抗氧化能力;提高了 42 天肉鸡的胸肌率并降低了腹脂率;提高了 42 天肉鸡胸肌多不饱和脂肪酸 (PUFA) C20:2n-6、C20:3n-6、C20:3n-3、C20:4n-6 (ARA)、C20:5n-3 (EPA)、C22:6n-3 (DHA) 和总 PUFA 的含量以及 PUFA/SFA (饱和脂肪酸) 比率,提高了 42 天肉鸡腿肌 PUFA C18:2*t*-9,*t*-12、C20:3n-6、C20:3n-3 和 EPA 的含量,但对胸肌和腿肌中大部分 SFA 和单不饱和脂肪酸 (MUFA) 无显著影响;降低了 21 天肉鸡血清中胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量以及 42 天血清中胆固醇的含量。结果表明丁酸梭菌通过增强肉鸡抗氧化能力、肠道健康和免疫功能提高了肉鸡的肉品质。

试验四探讨了丁酸梭菌的主要代谢产物丁酸对细胞抗氧化能力和存活率的影响。本试验研究了丁酸对结肠癌细胞 HCT116 存活率、线粒体超氧化物和 GSH 氧化还原电位、谷氨酸半胱

氨基酸连接酶调节亚基 (*GCLM*) 和催化亚基 (*GCLC*) 及谷胱甘肽还原酶 (*GSR*) 的基因表达量、*GSR* 活力、细胞核组蛋白去乙酰化酶 (*HDAC*) 和核因子 E2 相关因子 2 (*Nrf2*) 活力的影响。结果表明相对低含量的丁酸 (0.5 mM) 显著上调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达, 而相对高含量的丁酸 (5 mM) 显著下调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达。此外, 0.5 mM 的丁酸缓解了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤, 而 5 mM 的丁酸加剧了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤和死亡, 这些效果受 *Nrf2*-抗氧化反应元件 (*ARE*) 信号通路的调控。

综上所述, 本研究通过特定的方法从不同动物肠道或粪便中筛选得到了丁酸梭菌; 氧化应激小鼠试验证实了丁酸梭菌在提高小鼠抗氧化能力和降低血脂方面的作用; 肉鸡试验实现了通过饲喂丁酸梭菌增强肉鸡抗氧化能力、肠道健康和免疫功能而调控和改善肉鸡肉品质的目的; 最后通过细胞试验发现丁酸对 HCT116 细胞抗氧化能力和存活率的影响受 *Nrf2*-*ARE* 信号通路的调控。

关键词: 丁酸梭菌, 肉鸡, 抗氧化, 肉品质, 多不饱和脂肪酸

Abstract

This study was performed to screen *Clostridium butyricum* from animal intestines and determine its effects on animal antioxidation and meat quality in broiler chickens as well as its underlying mechanism.

Expt. 1 was conducted to isolate and screen *C. butyricum* with excellent biological properties and stress resistance from different animal intestines or feces. 16 strains of similarity with *C. butyricum* more than 99% were identified by 16S rDNA after obtaining strains by reinforced clostridial medium and tryptone sulfite neomycin medium as well as spore and strictly anaerobic conditions. These strains were first screened by comparing their butyric acid and total short-chain fatty acid (SCFA) production and 5 strains with better producing acid ability were chosen to identify by API-20A and specific molecular identification. Then the *C. butyricum* strains were screened by comparing their activity of amylase and cellulase, viable count of the strains, spore viability, viability of simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. Finally, one strain of *C. butyricum* with the best biological property and stress resistance was chosen for the following experiment, and this strain of *C. butyricum* could produce superoxide dismutase (SOD) and NADH oxidase as well as H₂ and CO₂ gases.

Expt. 2 was performed to investigate the effects of *C. butyricum* on antioxidation and serum lipid in oxidative stressed mice induced by corticosterone (CORT) administration (20 mg CORT/kg body weight). 75 SPF-class KM male mice (about 20 g) were divided into 5 groups with five replicates for 14 d: blank control group, oxidative stressed group, oxidative stress+ 1×10^5 , 1×10^6 and 1×10^7 CFU *C. butyricum*. Corticosterone was dissolved in olive oil and *C. butyricum* was diluted into different doses with physiological saline. The results showed that supplementation of *C. butyricum* alleviated the decrease of glutathione S-transferase (GST) activity and glutathione (GSH) content and the increase of malondialdehyde (MDA) content of liver in oxidative stressed mice. *C. butyricum* increased SOD and GST activities as well as GSH concentration while decreased MDA content of colon mucosa in mice. Moreover, *C. butyricum* reduced cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol concentrations of serum in mice.

Expt. 3 was conducted to investigate the effects of *C. butyricum* on growth performance, intestinal health, immune function, antioxidation and meat quality of broilers. 320 1-d-old Arbor Acres commercial male chicks were randomly assigned to one of five treatments with eight replicates in a completely randomized design for 42 d. The birds were randomly divided into five treatments: the basal diet (control), 2.5×10^8 CFU *C. butyricum*/kg, 5×10^8 CFU *C. butyricum*/kg, 1×10^9 CFU *C. butyricum*/kg, and 150 mg of aureomycin/kg (antibiotic). The results showed that supplementation of *C. butyricum* increased average daily gain during d 1 to 21 and d 22 to 42, improved duodenal morphology at 21 and 42 d of age and increased acetic acid, butyric acid and total SCFA concentrations of cecal digesta at 21 d of age, promoted IgM concentration of serum at 21 and 42 d of age, improved antioxidant status of duodenal, jejunum and ileum mucosa, serum and liver at 21 and 42 d of age, increased breast muscle percentage and decreased abdominal fat percentage at 42 d of age,

increased polyunsaturated fatty acid (PUFA) C20:2n-6, C20:3n-6, C20:3n-3, C20:4n-6 (ARA), C20:5n-3 (EPA), C22:6n-3 (DHA) and total PUFA concentrations as well as PUFA/SFA (saturated fatty acid) ratio of breast muscle at 42 d of age, increased PUFA C18:2*t*-9,*t*-12, C20:3n-6, C20:3n-3 and EPA concentrations of thigh muscle at 42 d of age, but did not affect most of SFA and monounsaturated fatty acid (MUFA) of breast and thigh meat, and decreased cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol contents of serum at 21 d of age and cholesterol content of serum at 42 d of age. The results indicate that the improved meat quality of broilers fed a diet supplemented with *C. butyricum* may be as a result of the enhancement of antioxidant defenses, intestinal health and immune function.

Expt. 4 was conducted to evaluate the effects of butyrate on cellular antioxidation and viability. In this study, we examined the effects of butyrate on cell viability, mitochondrial superoxide generation and GSH redox potentials, gene expression of glutamate-cysteine ligase modifier (*GCLM*) and catalytic (*GCLC*) subunits as well as glutathione reductase (*GSR*), *GSR* activity, nuclear histone deacetylase (HDAC) and nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2) activities in HCT116 colorectal cancer cells. The results showed that a low concentration of butyrate (0.5 mM) significantly increased the expression of *GSR* and *GCLM* while the opposite was observed with a relatively high butyrate concentration (5 mM). Moreover, 0.5 mM butyrate slightly reduced while 5.0 mM butyrate potentiated antimycin A-induced oxidative injury, which was regulated by the Nrf2-antioxidant response element (ARE) pathway.

In conclusion, *C. butyricum* was obtained from different animal intestines or feces by specific methods in the current study; the effects of *C. butyricum* on improving antioxidation and decreasing serum lipid were approved in oxidative stressed mice; the results of broiler experiment indicate that the improved meat quality of broilers fed a diet supplemented with *C. butyricum* may be as a result of the enhancement of antioxidant defenses, intestinal health and immune function; and finally it was found that the effects of butyrate on cellular antioxidation and viability may be regulated by the Nrf2-ARE pathway.

Keywords: *Clostridium butyricum*, broilers, antioxidation, meat quality, polyunsaturated fatty acid

目 录

摘 要.....	I
Abstract	III
缩写词.....	VII
第一章 绪 论.....	1
1 研究目的及意义.....	1
2 国内外研究现状.....	2
3 研究内容与技术路线.....	15
第二章 试验研究.....	17
试验一 丁酸梭菌的分离、鉴定和筛选.....	17
1 前言.....	17
2 材料与方法.....	17
3 结果.....	20
4 讨论.....	23
试验二 丁酸梭菌对氧化应激小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响.....	26
1 前言.....	26
2 材料与方法.....	27
3 结果.....	28
4 讨论.....	30
5 小结.....	31
试验三 丁酸梭菌对肉鸡生长性能、肠道健康、免疫功能、抗氧化能力和肉品质的影响.....	32
1 前言.....	32
2 材料与方法.....	33
3 结果.....	37
4 讨论.....	50
5 小结.....	53
试验四 丁酸对 HCT116 细胞抗氧化能力和存活率的影响.....	54
1 前言.....	54
2 材料与方法.....	55
3 结果.....	57
4 讨论.....	64
5 小结.....	66
第三章 结论与建议.....	67
1 本研究的主要结论.....	67
2 研究的创新点.....	67
3 有待于进一步研究和解决的问题.....	67
参考文献.....	68
致 谢.....	78
作者简介.....	79

缩写词 (Abbreviation)

缩写	英文名称	中文名称
ARA	Arachidonic acid	花生四烯酸
CRC	Colorectal cancer	结直肠癌
DHA	Docosahexaenoic acid	二十二碳六烯酸
EFA	Essential fatty acids	必需脂肪酸
EPA	Eicosapentaenoic acid	二十碳五烯酸
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic	谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基
GCLM	Glutamate-cysteine ligase modifier	谷氨酸半胱氨酸连接酶调节亚基
GSH	Reduced glutathione	还原型谷胱甘肽
GSSG	Oxidized glutathione	氧化型谷胱甘肽
HDAC	Histone deacetylase	组蛋白去乙酰化酶
MUFA	Monounsaturated fatty acid	单不饱和脂肪酸
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	多不饱和脂肪酸
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SCFA	Short-chain fatty acid	短链脂肪酸
SFA	Saturated fatty acid	饱和脂肪酸
UFA	Unsaturated fatty acid	不饱和脂肪酸

第一章 绪论

1 研究目的及意义

随着我国畜牧业的迅速发展,人们的消费意识不断地发生改变,和传统消费习惯相比,如今的消费者更加注重畜禽产品的安全性、健康价值和风味品质;然而,随着遗传改良和饲料营养等研究的持续进步,快大型白羽肉鸡的生产性能不断提高,但肉品质却呈现出下降的趋势,为肉鸡生产提出了新课题。

在动物饲养管理及肉类加工保藏过程中,很多因素都能影响畜禽的产品品质,如品种、饲料、环境、运输和屠宰等;而且,现代集约化畜牧的生产过程使动物面临着越来越多的应激因素,如感染、疾病、高温、抓捕、运输、屠宰和常规的生产管理因素等,这些因素不断刺激动物机体的神经系统和内分泌系统,使动物产生各种生理性应激,进而引起机体抗氧化能力下降、免疫应答改变以及营养代谢消耗增加等,更加不利于畜禽产品品质的提高^[1]。因此,如何在保证畜禽产品数量不断增加的同时,还能缓解应激引起的生长抑制、疾病感染以及产品品质下降的问题是我们面临的新挑战。

大量研究表明,畜禽肌肉中多不饱和脂肪酸(PUFA)不仅是人体不可缺少的营养物质,也是组成肌肉风味的重要前体物质,还对人体有许多重要的生理功能,对人类很多疾病具有明显的预防作用。氧化损伤是影响畜禽肉品质的一个重要原因,特别是PUFA更易受到自由基的攻击,而PUFA又在肉品营养价值和风味中起着重要的作用。所以,提高动物的抗氧化能力对增加肌肉中PUFA的沉积和改善肉品质具有重要的作用。

通过外源添加微生态制剂可以改变肉鸡肠道中的菌群结构,进而影响肉鸡的脂肪沉积和肌肉品质,最近一些研究发现乳酸菌和双歧杆菌等益生菌可以产生抗氧化酶或能调节抗氧化能力,具有缓解机体氧化应激的作用。但与乳酸菌和双歧杆菌相比,丁酸梭菌因能形成内生芽孢而具有更好的抗逆性能,如耐胃酸、耐胆盐和耐高温等。而且,有研究发现丁酸梭菌可产生超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶^[2],还可通过厌氧发酵淀粉和纤维素等碳水化合物产生丁酸和氢气,丁酸可作为肠道上皮细胞一种重要的能量来源,已有一些关于丁酸可以改善肠道黏膜结构和提高肠道抗氧化能力的报道^[3,4];最近的研究表明,氢气可以通过选择性清除机体中的羟自由基而起到抗氧化的作用,已被广泛地用于各种医学研究,氢气是一种重要的生理调节因子,具有抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡的作用^[5-7]。丁酸梭菌可改善肠道微生态平衡,提高免疫功能,并能产生SOD、丁酸和氢气这些有益物质,目前对其是否具有抗氧化作用还不清楚,是否我们可以通过添加丁酸梭菌的办法来提高动物的抗氧化能力,调控肉鸡的肉品质和肌肉PUFA的组成和含量还有待进一步研究。目前关于丁酸梭菌的研究主要停留在其促生长和防治肠道疾病的效果上,很少有关于丁酸梭菌对动物抗氧化能力和肉品质效果的研究报道。因此,探索采用丁酸梭菌制剂提高动物抗氧化能力和肉品质具有重要的理论意义和应用价值。

2 国内外研究现状

2.1 动物微生物学和益生菌

微生物学 (Microecology) 的概念由德国科学家 Voeker Rusch 博士于 1977 年最先提出的,并在德国建立起世界上第一个微生物学研究所。它是研究机体内正常微生物菌群与其宿主之间相互作用规律的科学。微生物学是细胞水平或分子水平的生态学,是一门研究微观生命、生命分子之间及其与微环境相互关系的科学^[8, 9]。动物微生物学 (Animal Microecology) 是我国近 20 多年发展起来的一门新兴学科,它是研究正常微生物之间、正常微生物与动物体内环境之间、动物体与外界环境之间三者相互关系、多学科相互交叉的具有分子水平和细胞水平的生命学科分支,其以微生态稳态 (平衡与失调) 等理论为核心,属于生态学范畴^[10]。正常情况下,动物肠道微生物种群及数量处于一个动态平衡状态,这种平衡对于维持肠道的正常功能和健康起着非常重要的作用。

益生菌 (菌) (Probiotics) 是 Parker (1974) 提出的与抗生素相对的新概念,他定义益生菌为促进肠道微生物平衡的生物或物质^[11]。该定义因多种物质甚至抗生素都可能被包括在内受到了许多研究者的质疑。二十世纪 80 年代末到 90 年代,相继出现了多种益生菌的定义。其中 Fuller 的定义被引用的频率最高,该定义为益生菌是通过通过食物供给的改善肠道平衡有益地影响宿主的活性微生物^[12]。FAO/WHO 以及 EFSA (European Food Safety Authority) 等广泛认可的定义是指当服用足够数量时能对宿主产生健康有益的活微生物^[13]。这个概念强调了“足够数量”的活菌和促进健康作用。目前益生菌的种类很多。概括起来常用的主要有:乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌等。

2.1.1 动物微生物学理论

2.1.1.1 优势种群理论

在正常微生物菌群、宿主和环境三者所构成的微生态系统内,通常存在着一种或数种优势种群,优势种群的丧失则发生微生态失调。在动物肠道微生态系统中,厌氧菌是肠道正常菌群的主体,正常菌群中 90~99% 是厌氧菌,兼性厌氧菌和需氧菌只占 1~10%,有时甚至只占 0.1%,这些厌氧菌不仅在数量上占绝对优势,而且对宿主的营养、免疫、生长发育以及生物屏障等都有重要的作用^[14]。使用微生态制剂可以补充或恢复优势种群,如提高肠道中乳酸菌和双歧杆菌等优势菌群的数量,从而使失调的微生态系统重新恢复平衡。在单胃动物或人消化道中寄居着 10^{14} 个细菌,是人体细胞数量的 10 倍,肠道宏基因组编码的基因是人体自身基因数目的 100 倍,种类多达 500~1500 种^[15]。人肠道菌群包含 1000-1150 种细菌,一些专家指出核心菌群由这其中的 160 种组成,大部分个体中都存在这些菌群,这些种群构成了复杂的微生态系统^[16, 17]。

2.1.1.2 生物拮抗理论

正常微生物菌群以及正常微生物与病原微生物之间,存在的拮抗与互助共生是微生物群落

维持稳定的重要机制。生物拮抗有助于宿主防止外袭菌的入侵。正常微生物菌群构成了机体的化学屏障和生物屏障,化学屏障即微生物的代谢产物—乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、消化酶、细菌素、抗生素和其它活性物质等共同发挥的防御作用;而生物屏障为微生物菌群有序地定殖于肠道黏膜、皮肤等表面或细胞之间,从而起到占位、争夺营养和阻止病原微生物定殖的拮抗作用^[18]。

2.1.1.3 微生物夺氧理论

当益生菌中某些需氧菌如芽孢杆菌和酵母菌等进入动物消化道迅速生长繁殖时,可以消耗肠道内的氧气,使局部氧分子浓度下降,造成厌氧的环境,从而有助于肠道内优势菌群厌氧菌的生长,抑制有害需氧菌如大肠杆菌等的生长,使失调的肠道菌群调整重新恢复到正常状态,以达到维持肠道健康和防病治病的目的^[9, 18]。

2.1.1.4 微生态营养理论

微生态营养理论是研究消化道菌群代谢效应及菌群产物与动物机体对营养物质消化、吸收和代谢之间的关系,营养与非营养因素对动物消化道微生态环境的调控以及肠道菌群对动物产品(肉、蛋和奶等)形成和品质的调控^[10]。益生菌可弥补动物本身消化酶的缺失以及分泌量的不足,从而促进宿主对营养物质的消化吸收,如芽孢杆菌能分泌多种消化酶等。该理论为提高畜禽的生产性能、增加营养物质利用率和改善畜禽产品品质提供了一条新思路和方法。

2.1.1.5 “三流”运转理论

“三流”运转即能量流、物质流和基因流的运转,该理论为宏观生态学理论的精髓。能量流是指正常微生物群与宿主保持着能量交换和运转的关系,动物和人类与正常微生物群之间,或正常微生物菌群之间都存在着能源的交换;物质流是指正常菌群生长的能源物质均依赖于宿主,同时肠道菌群也能为宿主提供一部分宿主自身不能合成的物质,如微生物产生的消化酶、维生素以及菌体蛋白也可被动物利用,如此反复进行物质交换;基因流即正常微生物之间(包括种间和属间)有着广泛的基因交换,如耐药因子、产毒因子、菌毛等都可以在正常微生物之间,通过物质的传递进行交换^[10]。

2.1.2 益生菌概论

2.1.2.1 益生菌种类

目前市面上使用的微生物饲料添加剂有很多,包括原核生物中的乳酸杆菌、乳酸球菌、芽孢杆菌、链球菌、肠球菌、片球菌、双歧杆菌、拟杆菌、光合菌、假单胞菌,以及真核生物中的酵母菌、米曲霉和黑曲霉等。考虑到耐药性和菌种污染等方面的安全问题,美国食品和药品管理局(FDA)以及美国饲料控制官员协会(AAFCO)在1989年公布了可用于饲料的微生物

菌种有 43 种。我国农业部 2013 年公布了饲料中允许添加的微生物种类有 34 种（表 1），包括适用于养殖动物和青贮饲料等，但在各类益生菌产品中实际使用最多的菌种是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、植物乳杆菌、酿酒酵母，其次是嗜酸乳杆菌、产朊假丝酵母、乳酸片球菌、戊糖片球菌、凝结芽孢杆菌和丁酸梭菌等^[16]。这些益生菌大体上可以分为 3 类，即乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌。

表 1 饲料添加剂品种目录（2013）中允许添加的微生物种类

Table 1 Microorganisms allowed to add in the catalog of feed additive (2013)

通用名称	适用范围
地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌 粪肠球菌、屎肠球菌、乳酸肠球菌 嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、德式乳杆菌乳酸亚种（原名：乳酸乳杆菌） 植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌 产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌、 婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌 青春双歧杆菌、嗜热链球菌、罗伊氏乳杆菌 动物双歧杆菌、黑曲霉、米曲霉 迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纤维二糖乳杆菌 发酵乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种（原名：保加利亚乳杆菌）	养殖动物
产丙酸丙酸杆菌、布氏乳杆菌	青贮饲料、牛料
副干酪乳杆菌	青贮饲料
凝结芽孢杆菌	肉鸡、生长育肥猪和 水产养殖动物
侧孢短芽孢杆菌（原名：侧孢芽孢杆菌）	肉鸡、肉鸭、猪、虾

资料来源：饲料添加剂品种目录（2013）

1) 乳酸菌：乳酸菌是一类可发酵碳水化合物产生大量乳酸细菌的统称，呈杆状或者球状^[19]。主要有乳酸杆菌属、双歧杆菌属和乳酸球菌属等。乳酸菌多为动物消化道正常微生物区系中的优势菌群，生理需求有厌氧、兼性厌氧或好氧，主要发酵产物为乳酸，耐酸，不形成芽孢，因此不如芽孢菌耐热。含有一种或几种乳酸菌的微生物制剂，利用乳酸菌定植肠道产生乳酸，形成酸性环境，抑制病原菌繁殖，可达到促进生长和防病目的。

2) 芽孢杆菌：芽孢杆菌是一类数量众多，在一定条件下形成孢子的细菌，对热和化学物质等不利环境状况具有良好的稳定性，在自然界中广泛分布。芽孢杆菌多为动物消化道中的正常菌群，其在肠道中可快速繁殖并消耗大量氧气，可通过生物夺氧维持肠道微生态平衡和厌氧环境，从而有利于肠道中优势的厌氧菌定植。益生菌中主要包括三类产芽孢的细菌，一是常用的需氧芽孢杆菌，如生产中使用最多的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌，以及近些年开始使用的产乳酸的凝结芽孢杆菌等；二是菊糖芽孢乳杆菌等芽孢乳杆菌；三是厌氧梭状芽孢杆菌，其可以产生短链脂肪酸（SCFA）并有益于动物的肠道健康，如丁酸梭菌等^[20]。利用芽孢耐受恶劣环境的能力和生长优势拮抗病原微生物，并能产生蛋白酶、多种 B 族维生素以及细菌素等，有益于动物的生长和肠道健康。

3) 酵母菌：酵母是一些单细胞真菌，为肠道中的过路菌，在动物消化道中很少存在。酵

母菌可产酶、B 族维生素和多种促生长因子，可提高动物的饲料消化率和利用率。含有酵母菌的益生菌产品在反刍上应用较多，因酵母菌消耗瘤胃内的氧气，可为严格厌氧的瘤胃微生物生长和活性创造更加有利的条件。饲料中常用的酵母菌种有产朊假丝酵母和酿酒酵母等。

2.1.2.2 益生菌的选择标准和评价规程

目前用于益生菌的菌株主要有以下两种来源：一是从健康动物体内（胃肠道或粪便）分离；二是从动物体外的其他途径获得，如土壤、水、发酵食品或青贮饲料等。随着益生菌研究的深入，其评估标准和评价规程也得到了一定的发展，主要基于菌株的分类鉴定、安全性、生物学特性、抗逆性和对宿主应用效果等方面考虑。建立益生菌选择标准和评价规程对微生态产业的有序和规范化发展十分重要。我国至今少有建立益生菌的标准，更没有建立评价规程^[16]。

1) 菌株应有准确的分类鉴定：从各种环境或材料中分离的微生物必须进行鉴定。一般可分为形态学、培养特性、生化和分子鉴定。近些年来，随着分子生物学的发展，分子鉴定起着越来越重要的作用。如核糖体 RNA 测序，可以对一些微生物菌株进行准确的分类。而且，出现了一些以前使用的菌株种系鉴定与用 16S rRNA 基因测序鉴定结果不一致的现象，表明一些培养特征和生化反应很相似的菌种不易区分。但由于一些菌种之间的 16S rRNA 基因序列相似性很高，在分类学上经常也会产生一些错误的分类结果或是一些菌株相似性太接近而无法准确区分。为此，研究人员开发出一些新的基因序列用于微生物菌种的分类，这些基因与 16S rRNA 基因序列相比，有相似的保守区域，但是序列的变异性更大，从而可以区分更为相似的菌种。其它的 DNA 序列或基因用于区分菌种的有内源转录间隔区 ITS (Internal transcribed spacer)、16S-23S、recA、dnaJ、hsp65 编码 65-kDa 热应激蛋白、rpoB 编码 RNA 聚合酶 B 亚基^[21-24]。还有如细菌 DNA 促旋酶基因的四聚体，它是由 GyrA 和 GyrB 两个亚单位组成，这两个基因碱基平均替换频率比 16S rDNA 替换率更高，可作为分子标记，应用于菌种的鉴定^[25]。此外，益生菌菌株还应存入公共菌种保藏中心。

2) 安全性评价：安全性是对益生菌评价的基本要求。要检测菌种是否具有好的安全性，主要检测四个方面的内容。第一，病理或毒理试验，菌种被用于饲料添加剂之前应经过严格的安全性试验，证明其无毒、无致畸、无耐药性和无药物残留等副作用。第二，潜在的致病性研究，某些有益微生物在特定条件下也可能产生致病性，因此，为了确保安全，在使用微生态制剂时还需要综合考虑动物健康状况和内环境的变化。第三，菌种携带抗性基因的可能性，由于抗生素在养殖业中的广泛使用，对含抗性基因的微生物起到了筛选的作用，使其得以大量繁殖，从而产生了一些具有耐药性的超级细菌。第四，菌种对环境的影响，不被利用的菌种可通过动物排泄到周围环境中，可能会对周边的微生态系统造成影响，严重的话可能对环境造成破坏^[10]。

3) 生物学特性：益生菌良好的生物学特性是保证后续产品开发和应用效果的基础。需根据具体应用的需求选择相应的筛选标准。主要包括：菌株生长速度和发酵后的终产量；产有机酸能力，如乳酸、乙酸、丙酸和丁酸等，这些酸既能作为动物肠道细胞的能量来源改善肠道健康，还能够抑制一些病原微生物的生长繁殖；产生各种消化酶以弥补动物自身消化能力的不足，如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶等，提高饲料消化率；菌株产生抗菌物质的类型、产量和抑菌效果，如细菌素等。

4) **抗逆性**: 益生菌的抗逆性主要是指其对动物体或人体内环境的耐受能力以及加工和生产存放过程中对不良环境的抵抗能力。体内环境的耐受能力包括胃酸耐受性、胆盐耐受性和酶的耐受性等; 生产和存放环境的耐受性包括菌株耐高温的能力和存放的稳定性等。

5) **应用效果**: 益生菌的实际应用效果应通过动物试验进行评价, 如小鼠试验或畜禽试验等。包括益生菌对宿主生产性能的调节、肠道健康的调控、免疫功能和炎症的调节以及对畜禽产品品质和健康价值的调控等。最近一些年, 还发现了益生菌在抗氧化、降低胆固醇和抗肿瘤等方面的作用^[26-30]。

2.1.2.3 益生菌的作用机理及功效

到目前为止, 益生菌的研究主要还停留在益生菌的应用效果上, 基础研究仍然十分薄弱, 对益生菌的作用机制了解还不够充分。有关益生菌使用效果的研究尽管很多, 但效果不稳定, 不同产品间的差异较大。总体来讲, 主要作用是防病、改善生产性能和产品品质, 其机制主要是通过保持肠道内正常微生物区系平衡和生化代谢作用来实现的, 更多的基础和机理研究还有待进一步加强。

1) **维持肠道微生态平衡**: 动物消化道正常的微生物菌群是在长期进化过程中形成的, 随着动物年龄的变化不断的发生改变, 并保持着动态平衡。但在某些因素的影响下, 肠道微生态系统也会遭到破坏, 如机体受到某些应激因素(如断奶、更换饲料、疾病、运输和气候变化等)的影响时, 这种平衡就可能被破坏, 导致菌群比例失调, 平衡从有利于乳酸菌等优势菌的生长转向有利于大肠杆菌、沙门氏菌等病原菌及其它有害菌方向移动, 随之条件性病原菌和腐败菌等异常增殖, 并使蛋白质分解产生胺、氨等有害物质, 动物表现消化机能紊乱、肠炎和下痢等病理性状态, 造成生产性能下降。然而, 当益生菌进入动物消化道后, 却能抑制有害菌的生长, 促进有益菌的生长繁殖, 恢复优势菌群, 重新建立正常的微生态平衡并维持肠道健康^[10, 20]。

2) **提高饲料转化效率, 改善畜禽生长性能**: 益生菌可以合成多种消化酶, 如利用碳水化合物的淀粉酶和纤维素酶等以及消化脂肪和蛋白的脂肪酶和蛋白酶, 这些酶能增强动物机体的消化力, 弥补动物本身消化能力的不足, 特别是幼龄动物, 从而提高饲料的利用效率。饲料发酵后产生的有机酸不仅可以提供后肠所需的部分能量, 还可促进矿物元素的吸收和利用。此外, 酵母菌和光合细菌等益生菌含有丰富的营养物质, 能合成菌体蛋白、多种维生素和未知生长因子等, 作为饲料添加剂可被动物摄取利用。

3) **提高免疫功能**: 益生菌可通过与宿主免疫系统相互作用而调节宿主的免疫机能, 这种相互作用可能导致宿主机体的自身抗体和抗原特异性抗体增强, 激活 T 细胞活性, 改善机体特异性和非特异性的细胞免疫及体液免疫功能^[31]。许多研究显示, 益生菌可增加机体的抗体生产、免疫球蛋白水平、T 淋巴细胞、CD⁺ 细胞和抗体分泌细胞、促炎和抗炎症性细胞因子、白介素、干扰素- γ 、自然杀伤细胞、巨噬细胞等。也有研究发现乳酸菌可通过淋巴细胞循环活化全身的免疫防御系统, 还可诱导机体产生细胞因子, 如白细胞介素和干扰素等; 而嗜酸乳杆菌在引发 Th-1 细胞因子方面很有效果; 酵母菌细胞壁中的酵母多糖也可提高动物的免疫功能。

4) **抗氧化和防癌**: 目前国内外对于益生菌的各种功能特性研究已比较成熟, 但关于其抗氧化功能和缓解机体氧化应激方面的研究并不多见。一些研究表明益生菌抗氧化的机理主要是

其氧化还原调控系统或细胞内的抗氧化成分决定的。一些研究发现益生菌自身能产生谷胱甘肽 (GSH)、SOD 和硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 等抗氧化酶和非酶抗氧化剂, 也可通过改善肠道内环境或产生代谢产物调节氧化还原电位而清除自由基和抗脂质过氧化, 降低氧化应激, 如乳酸菌、双歧杆菌和富硒益生菌等^[26, 27, 32-37]。

日前关于益生菌防癌作用的研究还很有限, 其作用机制可能是益生菌直接作用和间接作用共同发挥作用的结果。直接作用即益生菌本身或其有益代谢产物对致癌物质的降解或结合到其细胞壁上排出体外; 间接作用即益生菌可通过调节肠道微生态平衡或机体免疫功能, 从而间接改善机体抵抗癌变的能力^[38]。一些研究发现添加益生菌可明显降低癌症的发病率, 膳食组成与癌症的发病率有很大的相关性。益生菌可以使粪便中致癌物质的含量降低, 并能结合和降解由腐败细菌产生的致癌原合成酶、抑制肿瘤或预防癌症的发生。已有不少关于食品中或胃肠道中的细菌的抗诱变和防癌特性的研究, 其防癌特性主要是结合或降解前致癌物质、在肠道中调节前致癌物酶活性、产生抗诱变化合物或通过增强免疫反应抑制肿瘤的形成, 如肠道中细菌产生 SCFA 丁酸可起到防结直肠癌的作用^[39, 40]。

5) 改善环境, 降低有害物质的生成: 益生菌可通过抑制大肠杆菌等病原菌的生长从而减少粪便和尿液中氨的浓度, 具有除臭功能, 使圈舍内臭气与苍蝇等减少, 改善畜禽养殖环境, 有利于宿主的健康。而且, 如今畜禽的粪便问题已成为环境污染的一个重要方面, 在一些研究和生产实践中发现益生菌可以减少畜禽粪便的排出量, 这可能是由于益生菌产生的酶等有益物质增加了饲料的消化率。

2.2 丁酸梭菌的研究进展

丁酸梭菌, 即酪酸梭菌, 又称丁酸梭状芽孢杆菌。日本是研究丁酸梭菌历史最长的国家, 该菌是 1933 年由日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报告的, 所以丁酸梭菌又名宫入菌。1935 年, Kingi Miyairi 博士从土壤和人的粪便中分离出丁酸梭菌, 并发现该菌能发酵产生 SCFA, 这些脂肪酸具有明显的改善肠道健康的作用, 还能促进肠道中乳酸菌和双歧杆菌等有益菌的繁殖并抑制肠道中大肠杆菌等致病菌的生长^[18]。日本在 1940 年就实现了对丁酸梭菌的商业化生产, 先后作为人用处方药、非处方药、兽药、饲料添加剂和食品添加剂等而被广泛应用。韩国对丁酸梭菌也有一定的研究, 并将该菌用于畜禽的饲料添加剂。欧美等国家主要研究丁酸梭菌以甘油为底物, 生物转化生产 1, 3-丙二醇, 还研究了利用丁酸梭菌生产丁酸和氢气、处理废水等。近些年, 我国对丁酸梭菌的研究和开发也取得了一定的进展, 目前已开发出一些丁酸梭菌的药品和饲料添加剂。

丁酸梭菌是属于硬壁菌门 (Firmicutes)、梭菌纲 (Clostridia)、梭菌目 (Clostridiales)、梭菌科 (Clostridiaceae)、梭菌属 (Clostridium) 的一种革兰氏阳性菌, 但在老培养物中能变为阴性; 它存在于动物和人的肠道、自然酸奶和土壤中。丁酸梭菌的菌体为直或微弯杆菌 (0.5~1.7×2.4~7.6 μm)、单个或成对、短链, 以周生鞭毛运动; 菌体可产生芽孢, 中部膨大成梭形, 孢子偏心或次端生、无孢子外壁或附属丝; 菌落表面多为圆形, 直径 1~6 mm, 稍凸, 白色; 该菌为厌氧菌, 在含有可发酵碳水化合物 (淀粉或葡萄糖等) 的液体培养基中生长良好, 并能产生大量气体^[18]。

2.2.1 丁酸梭菌的生理作用及机理

2.2.1.1 维持肠道微生态平衡

动物肠道内的菌群在正常状态下维持着相对平衡的状态, 这种平衡状态有益于动物的生长和对疾病的抵抗, 但肠道菌群失衡可导致动物生产性能的下降, 甚至引发各种疾病。丁酸梭菌可以产生纤维素酶和淀粉酶, 这些酶可以水解纤维素或淀粉等碳水化合物生成低聚糖, 乳酸菌和双歧杆菌等可以利用这些低聚糖, 从而促进了肠道内这些有益菌群的生长。Kuroiwa 等(1990)的研究也发现, 丁酸梭菌能与乳酸菌和双歧杆菌等肠道有益菌共生, 共培养时还能够产生具有某些生物活性的成分促进其生长和增殖^[41]。丁酸梭菌在促进肠道有益菌增殖的同时, 还能通过发酵碳水化合物产生乳酸、乙酸、丙酸和丁酸等 SCFA 降低肠道的 pH, 抑制肠道有害菌的生长并降低有毒物质在肠道的积累, 维持肠道健康^[42]。

2.2.1.2 增强机体免疫功能

丁酸梭菌可通过激活机体的免疫系统而增强动物的免疫功能。一些研究发现添加丁酸梭菌可提高小鼠、肉鸡和细胞免疫球蛋白的 IgA、IgG 和 IgM 含量^[43-45]。丁酸梭菌还可提高小肠黏膜 IgA 含量, 抑制微生物的附着, 提高动物机体自身的免疫功能^[46]。傅思武等(2000)的研究发现, 丁酸梭菌-婴儿型双歧杆菌二联活菌制剂可提高小鼠体液免疫能力^[47]。Yang 等(2012)研究表明日粮中添加丁酸梭菌可提高肉鸡血清中 IgA、IgG 和 IgM 含量^[44]。Zhang 等(2014)研究了丁酸梭菌对大肠杆菌 K88 感染肉鸡免疫功能的影响, 发现丁酸梭菌可以提高肉鸡血清 IgA、IgM、IgY、补体成分 C3 和 C4 以及肠黏膜 IgA 的含量^[48]。

2.2.1.3 产生有益的代谢产物

丁酸梭菌的代谢产物中, 既有 SCFA, 也有抗菌物质, 还有各种酶、维生素和多种气体等。Kawasaki 等(1998)研究发现丁酸梭菌可以产生 SOD 和 NADH/NADPH 氧化酶, 当培养基中有氧气时该菌停止生长, 但当培养基中所有的氧气被该菌清除后, 它可以重新恢复正常的生长速率^[2]。丁酸梭菌的主要代谢产物是乙酸和丁酸, 由于丁酸在调节肠道健康和疾病方面具有广泛的作用, 所以在各种 SCFA 中丁酸的研究备受关注。丁酸是肠道上皮组织细胞重要的能量来源, 对于肠道细胞再生和修复具有重要的作用, 特别对于结肠细胞更为重要, 丁酸是其主要的能量来源, 可以占到结肠细胞能量来源的很大一部分, 并能通过抑制结直肠癌细胞的增殖和促进细胞凋亡而起到抗癌的作用, 还有一些关于丁酸可以改善肠道黏膜结构和提高肠道抗氧化能力的报道^[3, 4, 49, 50]。丁酸梭菌还可以产生多种酶类, 如淀粉酶、纤维素酶和半纤维素酶等, 这些酶可以促进营养物质的消化吸收。此外, 丁酸梭菌可以合成一些 B 族维生素和维生素 K 等。丁酸梭菌还能在发酵产生乙酸和丁酸的同时产生多种气体, 如 CO₂ 和 H₂ 等。



H_2 可以被用做清洁能源, 最近的研究表明, H_2 还可以通过选择性清除机体中的羟自由基 ($\cdot OH$) 而起到抗氧化的作用, 已被广泛地用于各种医学研究, H_2 是一种重要的生理调节因子, 具有抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡的作用^[5, 7, 51]。

2.2.2 丁酸梭菌在人类健康和抗癌方面的应用

丁酸梭菌具有多种生理作用, 目前研究最多的是调节微生态平衡和防治肠道疾病, 常被用来防治由多种因素引起的人的腹泻和肠炎等疾病^[52]。许多研究发现, 丁酸梭菌单独使用或与乳酸菌、双歧杆菌以及益生元等合用, 对防治因菌群失调引起的腹泻、便秘、肠易激综合症和抗生素引起的相关肠道疾病等有良好的疗效^[53, 54]。Isono 等 (2007) 研究发现丁酸梭菌培养物上清 (主要为丁酸) 可显著下调人结肠上皮细胞 Toll 样受体 TLR4 mRNA 表达水平, 降低炎症反应^[55]。1944 年, 日本将丁酸菌制剂以整肠制剂药品正式投入临床应用, 米雅利桑株式会社利用该菌开发的米雅系列产品在治疗菌群紊乱引起的肠炎、腹泻、消化不良等疾病取得了显著效果。我国自 1993 年起, 从日本进口丁酸梭菌制剂, 先后在上海、北京等医院使用, 在治疗肠道疾病和改善肠道健康等方面取得了良好的效果。我国青岛东海药业公司在 2005 年通过了国家食品药品监督管理局的 GMP 认证, 开始商业化生产丁酸梭菌制剂; 重庆泰平药业有限公司也在生产丁酸梭菌活菌胶囊。

一些研究发现丁酸梭菌在抗肿瘤方面也有一定的作用。通过对小鼠腹膜注射丁酸梭菌制剂发现丁酸梭菌可完全抑制肉瘤的生长, 可能是丁酸梭菌产生的胞外可溶性多聚糖的作用^[18]。李佳等 (2003) 在小鼠抑癌试验中发现, 灌胃丁酸梭菌对小鼠移植肝癌具有明显的抑制作用^[56]。

丁酸梭菌的代谢产物丁酸在抗结直肠癌方面具有特殊的作用。丁酸对细胞的不同效果取决于丁酸的含量、代谢底物的可用性和细胞内环境的状况等因素。丁酸是正常结肠细胞的主要能源物质和生存因子, 但是对于转化的细胞系, 丁酸却能抑制细胞增殖并促使细胞循环终止、分化和凋亡。事实上, 丁酸对于正常结肠细胞和结肠癌细胞的相反效果被称为“丁酸悖论”。丁酸对结肠细胞的稳态和更新循环具有十分重要的作用, 它可作为诱导隐窝基底细胞的的能量来源而促进细胞增殖, 但对于肠腔表面细胞和发生癌变的细胞, 丁酸却可以作为组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂而抑制这些细胞的增殖并促进其凋亡 (图 1)^[57]。研究发现, 正常人体肠腔中的丁酸含量约为 5~10 mM, 但是由于结肠上皮细胞被厚厚的黏膜层所覆盖, 从肠腔到隐窝细胞的丁酸含量是逐渐降低的, 到达隐窝细胞的丁酸含量为 0.05~0.8 mM^[58]。这样丁酸在结肠中就可以起到抑制正常结肠上皮细胞和癌细胞增殖, 并促进其凋亡的作用, 该作用通过丁酸在细胞核内抑制 HDAC 的活性实现, 从而不断去除肠腔表面衰老的细胞; 但是丁酸能却可以作为能量物质而促进结肠隐窝细胞的增殖, 该变化对结肠细胞的稳态和更新循环具有十分重要的作用。

最近的研究表明丁酸梭菌的另一代谢产物氢气可以通过选择性清除机体中羟自由基而起到抗氧化的作用, 已被广泛地用于各种医学研究, 氢气是一种重要的生理调节因子, 具有抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡和抑制肿瘤的作用^[5, 7]。许多研究已发现与非转化细胞系相比, 人的肿瘤细胞可以产生更多的活性氧 (ROS), 这表明癌症有增加细胞增殖、DNA 的合成、血管生成、侵入和远端转移的潜力^[59-61]。Dole 等 (1975) 发现高压氢气疗法可以减少无毛小鼠鳞状细胞癌皮肤肿瘤的大小, 在含 2.5% 氧气和 97.5% 氢气混合物的 8 个大气压条件下处理小鼠 2 周, 发现氢气

治疗组与对照组小鼠相比，肿瘤变成黑色、脱落、收缩、甚至消失^[62]。Saitoh 等（2010）报道，补充富含氢气的水，通过其抗氧化活性，迅速产生了抗氧化作用，与正常细胞相比抑制了人舌癌细胞的生长^[63]。

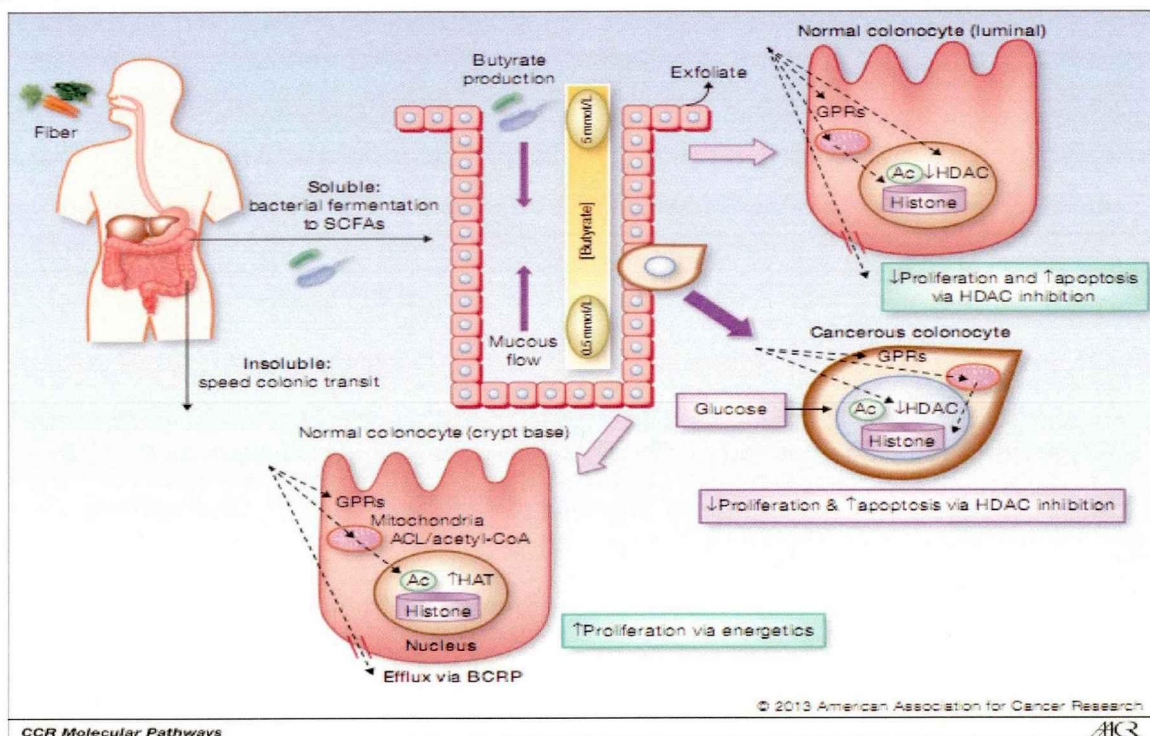


图 1 丁酸抗结直肠癌的作用模型 (Bultman, S. J., 2014)

Figure 1 A model of how butyrate might protect against colorectal cancer

2.2.3 丁酸梭菌在动物生产上的应用

丁酸梭菌在家禽、家畜和水产动物上都有一定的应用。饲料中添加丁酸梭菌可以提高动物日增重、饲料转化率，增强动物机体的免疫功能并改善肠道微生态平衡。丁酸梭菌作为饲料添加剂在动物肠道内可以体现六大生物特性：第一，促进动物肠道中有益菌群的生长并抑制肠道内有害菌和腐败菌的增殖，改善肠道菌群平衡，减少肠毒素的产生；第二，丁酸梭菌的重要代谢产物丁酸是肠道上皮细胞主要的能量来源，对维持肠道健康具有十分重要的作用，特别是后肠；第三，丁酸梭菌的代谢产物丁酸和氢气具有抗氧化和抗癌的作用，可缓解集约化快速生长或环境等造成的应激；第四，在动物肠道内能产生淀粉酶、纤维素酶、B 族维生素、维生素 K 等有益物质，可弥补宿主的消化能力和营养素的缺乏；第五，该菌属厌氧芽孢杆菌，抗逆性强，不受胃酸、胆汁酸等的影响，与非芽孢类益生菌乳酸菌和双歧杆菌相比耐受一定程度的高温；第六，对多种饲用抗生素有较强的耐受性，可与它们配伍使用^[64]。

2009 年 7 月，我国农业部批准了丁酸梭菌制剂在饲料中作为微生物饲料添加剂使用。丁酸梭菌作为饲料添加剂在饲料中使用，对动物肠道调控具有多种功能，丁酸梭菌可以促进肠道中有益菌（乳酸菌、芽孢杆菌和双歧杆菌等）的生长，所以它既可以作为饲料添加剂单独使用，还可与一些有益菌复配使用，起到菌群相互促进的目的。Yang 等（2012）^[44]和 Zhang 等（2014）^[48]发现日粮中添加丁酸梭菌可改善肉鸡的平均日增重，并且丁酸梭菌组与抗生素组差异不显著。

最近的研究发现丁酸梭菌在改善肉鸡肉品质方面还有一定的作用,丁酸梭菌可显著降低胸肌剪切力,提高胸肌脂蛋白酯酶(LPL)活性,增加胸肌肌内脂肪的含量、C20:5n-3及总n-3 PUFA含量^[65]。Zhao等(2013)研究表明日粮中添加丁酸梭菌可提高肉鸡平均日采食量和日增重,提高21天肉鸡血清胰岛素水平和42天肉鸡肌内脂肪含量、肝脏脂肪酸合成酶和胸肌LPL活性以及肝脏中脂肪酸合成酶、苹果酸酶、乙酰辅酶A羧化酶和胸肌LPL mRNA表达,降低21天肉鸡盲肠中拟杆菌门的数量^[66]。王润之等(2009)研究了丁酸梭菌对种鸭生产性能的影响,发现丁酸梭菌可提高种鸭产蛋率和受精率^[67]。刘婷婷等(2011)研究表明饲料中添加谷氨酰胺和丁酸梭菌可提高仔猪断奶后0~21天的平均日增重、增加血清C3、C4水平和溶菌酶活性、改善小肠形态结构、维持盲肠菌群平衡并提高仔猪抗氧化能力^[68]。宋增福等(2006)研究发现丁酸梭菌可提高鲢鱼肠道消化酶活力、增加酸性磷酸酶和酚氧化酶活性、改善免疫功能、促进肠道菌群平衡^[69]。

2.3 家禽脂肪沉积和肉品质调控研究进展

2.3.1 家禽脂肪沉积的特点

禽类与哺乳动物不同,其体内脂肪主要在肝脏合成,而猪等哺乳动物则主要在脂肪组织中合成,家禽肝脏合成的脂肪约占90%以上^[70,71]。禽肉的脂肪主要沉积于腹部和皮下,相对于哺乳动物,禽肉的肌内脂肪含量占体脂沉积的比例很低。脂肪在体内沉积具有一定的时空顺序,即不同部位脂肪的沉积是按时间先后顺序进行的,首先在肌肉内沉积形成肌间和肌内脂肪,然后是皮下脂肪,最后才是腹脂的沉积^[72,73]。肉鸡的腹腔是脂肪沉积的主要部位,大约占体脂总量的22%左右,其次为颈部脂肪,再次为胸部和腿部皮下脂肪^[74]。腹脂和皮下脂肪沉积过多会带来一些负面效应,如饲料转化率降低和肉品质下降等问题^[75],所以,很多研究者一直通过遗传和营养途径来调控肉鸡脂肪的代谢与沉积,希望减少腹脂的沉积。

脂肪组织的生长发育通过细胞增殖和细胞肥大两种方式实现,细胞增殖即细胞数量的增加,细胞肥大即细胞体积的增大。前脂肪细胞的增殖主要发生在家禽出壳之前,而脂肪细胞的肥大主要在出壳后进行,脂肪细胞的增殖仅在出生早期有出现。基因和营养可调控脂肪组织的沉积与分布,脂肪细胞的增殖主要受基因的调控,早期营养也有一定程度的影响,而脂肪细胞的肥大则主要受营养因素的调控^[73,74]。所以,可通过营养的方式对家禽体内脂肪的沉积进行调控。

2.3.2 家禽脂肪的消化吸收

家禽胃脂肪酶和幼小动物口腔的脂肪酶对饲料脂类的消化作用甚小^[76]。十二指肠是脂肪消化吸收的主要部位,脂类到达十二指肠后,在肠蠕动的作用下与大量胰液和胆汁混合,胆汁对于胰脂酶激活和脂类乳化具有重要的作用。脂肪酸在胰脂肪酶作用下从甘油三酯分子上水解。磷脂在磷脂酶的作用下水解成溶血磷脂,而胆固醇酯水解酶可将胆固醇酯水解成胆固醇和脂肪酸。脂肪酸、甘油一酯和胆酸都包含有极性和非极性基团,它们可聚合在一起形成水溶性的适合吸收的混合乳糜微粒。

混合乳糜微粒在与肠绒毛膜接触时会破裂,从而可释放出脂类水解产物,它们吸收的主要部位是十二指肠和空肠上段。在生长鸡和蛋鸡体内,空肠是脂肪吸收的主要场所,而回肠对亚油酸、硬脂酸和棕榈酸的吸收更为重要。一般来说,脂类水解产物进入吸收细胞是一个不耗能的被动转运过程。上述脂类消化吸收的过程可概括为:脂类水解→形成可溶性微粒→小肠黏膜细胞摄取这些微粒→重新合成甘油三酯→进入血液循环^[76]。

2.3.3 脂肪酸代谢与肉品质的研究

2.3.3.1 脂肪酸简介

脂肪酸(Fatty acid, FA)是由一条长的烃链和一个末端羧基组成的羧酸。烃链多数是线形的,分支或含环的为数很少。烃链不含双键(和三键)的为饱和脂肪酸(Saturated fatty acid, SFA)。含有一个或多个双键的为不饱和脂肪酸(Unsaturated fatty acid, UFA),只含有单个双键的脂肪酸为单不饱和脂肪酸(Monounsaturated fatty acid, MUFA),含两个或两个以上双键的为高度不饱和或多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)。尽管人体及哺乳动物能制造多种脂肪酸,但因不能向脂肪酸引入超过 Δ^9 的双键,所以不能合成亚油酸和亚麻酸。凡是体内不能合成,必需由食物供给,或能通过体内特定先体物形成,对机体正常机能和健康具有重要保护作用的脂肪酸称为必需脂肪酸(Essential fatty acids, EFA)。依照第一个双键距离链端的碳原子数将PUFA分为n-3、n-6、n-7和n-9系列脂肪酸。亚油酸是n-6家族的原初成员,在人和哺乳动物体内能将它转变为 γ -亚麻酸,并继而延长为花生四烯酸(ARA),后者是维持细胞膜的结构和功能所必须的,也是合成一类生理活性脂质一类二十碳烷化合物的前体物。 α -亚麻酸是n-3家族的原初成员,人体能将其合成二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),体内许多组织含有这些重要的PUFA^[77]。DHA、EPA和ARA这三种长链PUFA在营养学和生物学上具有重要的意义,它们主要以复合脂的形式存在于机体组织成分当中,部分作为人体内某些活性物质的前体物质;少量以脂蛋白形式存在于血液中;微量部分以自由脂肪酸形式与血浆清蛋白结合,成为脂肪酸在体内运输载体。DHA对脑、视网膜、皮肤和肾功能的完善均十分重要;EPA与DHA的协同作用被证明在降低血液甘油三酯方面有明显效果,同时也是人体直接合成第二信使(如血栓素TX、前列腺素PG、前列环素PGI等)的前体,可以间接作为合成二十碳烷化合物前体物质,能够一定程度上加快血液流动;ARA在血液、肝脏、肌肉和其他器官系统中作为磷脂结合的结构脂类起重要作用,对预防心血管疾病、糖尿病和肿瘤等具有重要功效。

2.3.3.2 脂肪酸的生物合成与分解

家禽体内脂肪酸主要来源于两个途径:即脂肪酸的从头合成和血液循环系统中甘油三酯(TG)的降解,脂肪主要以TG的形式沉积,还有少量以磷脂的形式沉积。血液循环系统中TG的降解主要受脂蛋白脂酶的调控,该酶对于单胃动物特别重要,因为这是单胃动物体内脂肪酸转移到脂肪细胞的唯一途径。甘油酯化和分解的相对速度决定了机体脂肪的分解或沉积,这些过程受到机体内脂肪合成酶、分解酶活性和有效底物浓度的共同调控^[78]。

机体需要脂肪分解代谢提供能量时,脂肪组织中的激素敏感脂肪酶(HSL)就会水解 TG 为甘油和游离脂肪酸。TG 分解成单脂肪酸和甘油酯需要 HSL 和单甘油酯酶的共同作用。HSL 是脂肪分解的关键酶,它主要水解 TG 中 1'和 3'位置上的脂肪酸,在体内最后一步的水解反应由单甘油酯酶完成。脂肪酸的分解代谢主要以 β -氧化的方式进行,在氧化分解之前,脂肪酸首先在胞液中活化为脂酰 CoA,而后经线粒体内膜两侧的肉碱脂酰转移酶催化脂酰基在肉碱和 CoA 之间的转移反应转移至线粒体内,该步骤是脂肪酸 β -氧化的主要限速步骤。

2.3.3.3 脂肪酸与肉品质和风味

家禽肌肉中的脂肪及其脂肪酸组成与肉的嫩度、剪切力、pH、系水力和风味等肉品质指标有很强的相关性^[79];并且可通过使结缔组织疏松或氧化溶解肌纤维束而起到提高肌肉嫩度的作用^[80]。禽肉香味主要是肌肉在受热过程中的脂质降解产生的,其中 PUFA 可形成鸡肉的特征性风味物质,主要是一些不饱和醛酮等。

食物和肉品中的脂类对于风味的形成具有重要的作用,但其作用具有两面性,一方面可通过氧化而产生令人愉快的味道,但有时也会生成一些不愉快的气味,这取决于肌肉中脂肪酸的组成和含量以及加工条件等因素^[78]。PUFA 是肌肉风味的重要前体物质,其中以亚麻酸、亚油酸为前体生成的香气物质有醇类和醛类(主要为烯醛)。以亚麻酸形成的醇类香气物质有 2 反-己烯醇、3 顺-己烯醇、3 反-己烯醇,醛类香气物质有 2 反-己烯醛、2 反,4 反-壬二烯醛、2 反,4 顺-壬二烯醛、2 反,6 顺-壬二烯醛;以亚油酸形成的醇类香气物质有己醇、1-辛烯-3-醇,醛类香气物质有己醛、2 反-庚烯醛、2 反-辛烯醛、2 反-壬烯醛、2 反,4 反-癸二烯醛、2 反,4 顺-癸二烯醛,其中鸡肉脂肪中的不饱和脂肪酸氧化降解可产生鸡肉的特征性气味成分,(EE) 2,4-癸二烯醛和一些其它醛酮类香味物质^[81-83]。

2.3.4 家禽肉品质与脂肪酸组成的调控

肉品质是一个综合的经济性状,主要特征有感官品质、营养价值、加工质量和卫生质量等方面,包括肌肉嫩度、pH 值、肉色、滴水损失、肌肉脂肪及其脂肪酸组成和含量等性状,肌肉的口感、感官、加工和营养价值及风味等受这些因素的影响^[84]。家禽饲养主要采用集约化的养殖方式,使用的品种较为单一,通过配合饲料满足生长和生产需要,肉品中营养素的含量取决于日粮中营养物质的水平。因此,营养在肉品质的调控上起着重要的作用,可通过营养的手段对肉鸡肉品质进行调控。

2.3.4.1 日粮

畜禽肌肉中的脂肪酸组成可以通过日粮的调整而改变,对于单胃动物家禽这一点更易做到,因为日粮中的脂肪酸可以不经氢化而直接沉积到肌肉中。一些研究发现可以通过调整日粮而改变鸡肉中脂肪酸的组成和含量^[74,85]。肉鸡的肌肉脂肪、皮下脂肪和腹脂的脂肪酸组成主要受肝脏脂肪合成和外源脂肪类型的影响。内源性脂肪,即肝脏合成的脂肪,主要是一些长链的 SFA

及少量的 MUFA, 而外源性脂肪包括亚麻酸和亚油酸等必需脂肪酸需要日粮提供。来自饲料中的 UFA 在家禽体内不经氢化可直接沉积在体脂肪中, 因此, 当饲喂 UFA 含量高的饲料脂肪时, 家禽体内的 UFA 亦显著升高。家禽体内脂肪酸的组成可直接反应日粮中脂肪酸的情况。家禽自身不能合成 PUFA, 所以肌肉中 SFA 和 MUFA 的组成和含量主要受饲料中脂肪的类型、脂肪酸氧化的速度以及肝脏合成脂肪酸的速度影响, 而肌肉中 PUFA 的组成和含量受日粮脂肪酸类型及它们在组织中的氧化速度决定, 所以, 可以通过增加日粮中 PUFA 的含量或是改善机体组织的抗氧化能力调节肌肉中 PUFA 的组成和含量。

2.3.4.2 肠道微生物和益生菌

近年的研究发现, 人、鼠、猪和禽的肠道微生物与体脂和脂肪酸的沉积有关。与无菌鼠相比, 有菌鼠从肠道获取能量的能力更强。肥胖鼠(人)菌群元基因组分析表明它们有更强的发酵碳水化合物的能力, 增加了 SCFA (如乙酸、丙酸、丁酸和 L-乳酸) 的量, 被用于宿主的代谢底物以增加能量的收获。除了能量富集和相关的 SCFA 产生之外, 肠道菌群还可能通过其它机制影响肥胖。按照这个假设, 肠道菌群也影响宿主基因的表达, 即那些在肠道中表达和控制脂肪酸的吸收、氧化和存储的基因。其中之一是血管生成素相关蛋白 4 (ANGPTL4), 它对脂蛋白脂肪酶有很强的抑制作用。在白色脂肪和肌肉组织富含甘油三酯脂蛋白的循环中, ANGPTL4 抑制脂肪酸的摄取并促进骨骼肌细胞和脂肪细胞中脂肪酸的氧化。ANGPTL4 在白色脂肪组织的过度表达, 还可以减少脂肪含量。然而, 无菌和 ANGPTL4 基因缺陷小鼠与野生型小鼠相比却表现出增加脂蛋白脂酶活性和肥胖的现象。这些观察表明, ANGPTL4 可对肠道菌群的环境产生作用, 还可通过控制组织脂肪酸摄入和代谢调节肥胖^[17]。

国内外的研究者发现益生菌可以调控机体脂肪酸的组成: 孙建广等(2010)研究表明, 发酵乳酸杆菌可显著降低肌肉滴水损失和剪切力, 显著提高 C18:2、C20:2、C20:4 和总 PUFA 的含量, 改善猪肉风味^[86]。Endo (1999) 报道, 在日粮中添加乳酸杆菌、芽孢杆菌、链球菌、梭菌、酵母菌和念珠菌后, 肉鸡肝脏和腿肌中胆固醇含量降低, 胸肌和腿肌中亚麻酸以及 UFA 与 SFA 的含量提高^[87]。Kalavathy 等(2006)研究发现日粮中添加混合乳酸菌培养物可显著降低肉鸡的屠体和肝脏的胆固醇含量、肝脏、肌肉和屠体的脂肪含量, 增加肝脏中 ARA 和总 UFA 的含量^[88]。Ramasamy 等(2009)研究发现混合乳酸菌培养物可提高蛋重、减少胆固醇, 但总脂含量与脂肪酸无差异^[89]。张日俊等(2005)在日粮中添加乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌组成的微生态制剂发现添加益生菌可提高血清中脂肪酶活性、降低血清中的胆固醇和甘油三酯含量并降低腹脂率, 益生菌可能通过脂肪酶分解了多余的脂肪或抑制了脂肪的合成, 最终使脂肪的沉积降低^[90]。

2.3.4.3 抗氧化剂

在畜禽饲养管理及肉类加工保藏过程中, 氧化损伤是影响肉品质的重要原因之一。各种肉类的抗氧化能力有着较大的差别, 常见动物肉的抗氧化能力由大到小依次为: 羊肉>牛肉>猪肉>鸡肉, 所以肉鸡在氧化应激状态下对肉品质的影响相对较大^[91]。

添加天然抗氧化剂,如硒、锌、VE、VC、类胡萝卜素、核黄素等抗氧化剂,可以提高肌肉中脂质的稳定性,减少挥发性物质的产生,保护肌肉中的PUFA,使肉中异味减弱。最近,许多研究表明通过抗氧化剂的保护作用可以增加肌肉中PUFA含量。肠道上皮细胞位于组织和肠腔的交界处,因而持续地暴露于饲料来源的有毒物质、细菌代谢物以及代谢过程中产生的氧化物等^[92]。这些复合物能自身或通过与其它化合物反应而产生自由基^[93]。因此,肠道比其它组织更易受到ROS的攻击而诱导氧化应激,从而对饲料中进入肠道消化的PUFA产生影响,使其组成在进入肠道消化后发生改变,进而改变肌肉中PUFA的组成和含量。所以,保护肠道的氧化损伤将有助于保护日粮中的PUFA,从而增加脂肪酸沉积到肌肉中的量。Kamboh和Zhu等(2013)研究发现生物类黄酮可增加鸡胸肉中PUFA的含量及n-6/n-3和PUFA/SFA的比例^[94]。Jung等(2010)研究表明肉鸡日粮中添加没食子酸和亚油酸可提高肉鸡胸肌肉的抗氧化能力、营养组成和功能特点,显著增加胸肌ARA和DHA含量^[95]。提高抗氧化酶的活力可降低脂质过氧化的速率,从而减少PUFA的过氧化反应。

近些年来,越来越多的研究发现益生菌具有抗氧化的功能,如乳酸菌和双歧杆菌等^[26, 27, 32, 33]。Amaretti等(2013)研究发现,一些乳酸菌、双歧杆菌和嗜热链球菌可以产生GSH、SOD和TrxR等抗氧化酶和非酶性抗氧化剂,也可通过改善肠道内环境或产生有益代谢产物调节氧化还原电位而清除自由基和抗脂质过氧化,降低氧化应激,小鼠试验表明这些益生菌可以提高小鼠的抗氧化能力,缓解小鼠的氧化应激^[32]。Martarelli等(2011)研究了乳酸菌对运动员剧烈体力训练诱导氧化应激的影响,发现乳酸菌可以提高血浆抗氧化能力并中和ROS的水平^[27]。

丁酸梭菌可发酵碳水化合物产生丁酸和氢气,已有研究表明这两种物质可通过增加抗氧化酶的活力和降低ROS代谢物而调节氧化应激^[4, 5, 96],还有研究发现丁酸梭菌可产生SOD和NADH氧化酶^[2]。Zhang等(2011)的研究发现丁酸钠可缓解皮质酮诱导肉鸡产生的氧化应激,丁酸钠显著增加胸肌中过氧化氢酶(CAT)的活性并降低MDA的含量^[97]。Hamer等(2009)发现丁酸处理可显著增加健康人结肠黏膜GSH的含量并降低尿酸的含量,改善人结肠黏膜的抗氧化能力^[4]。Ohsawa等(2007)的研究首次发现了氢气可作为抗氧化剂选择性的清除机体和细胞中的羟自由基^[5]。因此,丁酸梭菌可能通过其代谢产物SOD、丁酸和氢气而产生抗氧化的效果;而且,一些研究表明益生菌的抗氧化作用可能是由于益生菌刺激免疫系统而降低炎症反应,或通过抑制肠道病原菌降低炎症反应以及缓解与炎症反应相关的氧化应激^[27, 33]。然而,目前很少有关于丁酸梭菌对动物抗氧化能力的研究报道。

3 研究内容与技术路线

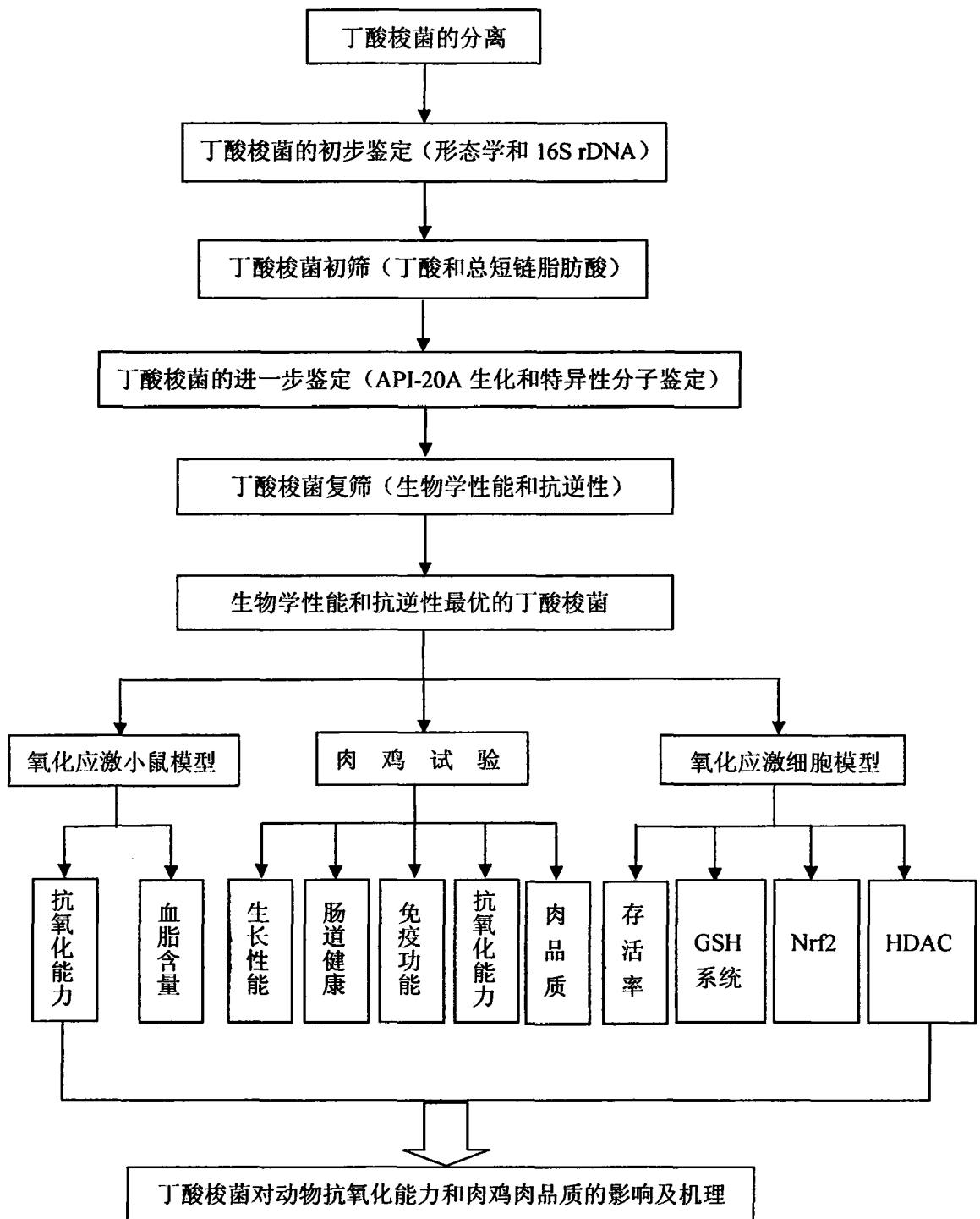
3.1 研究内容

本课题以丁酸梭菌及其主要代谢产物丁酸为研究对象,分丁酸梭菌的分离、鉴定和筛选,氧化应激小鼠试验,肉鸡试验和细胞试验四部分重点研究了筛选的丁酸梭菌在提高小鼠和肉鸡抗氧化能力方面的可行性,添加丁酸梭菌对肉鸡肉品质和肌肉PUFA组成和含量的影响以及丁酸调节细胞抗氧化能力和存活率的机制。具体研究内容如下:

- 1) 丁酸梭菌的分离、鉴定和筛选;

- 2) 丁酸梭菌对氧化应激小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响;
- 3) 丁酸梭菌对肉鸡生长性能、肠道健康、免疫功能、抗氧化能力和肉品质的影响;
- 4) 丁酸对 HCT116 细胞抗氧化能力和存活率的影响。

3.2 技术路线



第二章 试验研究

试验一 丁酸梭菌的分离、鉴定和筛选

摘要：本试验旨在从不同动物肠道或粪便中分离筛选生物学性能和抗逆性优良的丁酸梭菌。通过强化梭菌培养基和梭菌选择性培养基以及丁酸梭菌的芽孢和严格厌氧特性分离得到了符合丁酸梭菌培养和形态特征的菌株，经 16S rDNA 初步鉴定获得了 16 株与丁酸梭菌相似性在 99% 以上的菌株。首先以丁酸和总短链脂肪酸（SCFA）产量为指标，对这些菌株进行初筛，从中挑选出产酸能力较优的 5 株菌进行 API-20A 生化鉴定和特异性分子鉴定；然后以淀粉酶和纤维素酶活力、活菌数、芽孢存活率、模拟胃液和模拟小肠液存活率为指标，对鉴定获得的丁酸梭菌进行复筛；最后从中挑选出一株生物学性能和抗逆性最优的丁酸梭菌进行后续试验，还发现该菌株可以产生超氧化物歧化酶（SOD）、NADH 氧化酶以及 H₂ 和 CO₂ 等气体。

1 前言

抗生素对细菌引起的疾病具有极强的杀伤力，它作为饲料添加剂在提高动物生产性能和防治疫病等方面起到了巨大的作用。但是随着抗生素长期广泛的使用，其弊端开始为人们所认识，如导致肠道正常菌群比例失调、耐药性和药物残留等问题。

微生态制剂是选用动物体内正常微生物成员及其促进物质经微生物发酵和不同的加工工艺而制成的活菌制剂。它是一种安全的饲料添加剂，具有促进生长、防病和增强机体免疫力等多种功能，无残留，不产生耐药性。近年来，由于环境和食品安全的需要，微生态制剂逐渐得到人们的肯定，其研究和开发得以较快发展。

目前对于丁酸梭菌的研究相对较少。丁酸梭菌又称酪酸梭菌或丁酸梭状芽孢杆菌，是存在于人和畜禽肠道的一种厌氧有益菌，对改善畜禽肠道健康具有明显的作用。与非芽孢类活菌制剂相比，丁酸梭菌因能产生内生芽孢而具有较好的抗逆性，它能够在复杂的环境中维持较强的活力，作为饲料添加剂具有显著的优势和市场前景。

2 材料与方方法

2.1 生境丁酸梭菌的分离

2.1.1 样品采集

菌种分离的样品来自土壤、污泥、健康鸡、猪和牛的新鲜粪便、鸡盲肠和直肠内容物、瘤胃液等。样品采集于灭菌的试管中冷藏备用，并迅速分离。

2.1.2 丁酸梭菌分离培养基

强化梭菌培养基(RCM 培养基): 蛋白胨 1.0%、牛肉浸膏 1.0%、酵母粉 0.3%、葡萄糖 0.5%、氯化钠 0.5%、可溶性淀粉 0.1%、乙酸钠 0.3%、半胱氨酸盐酸盐 0.05%、琼脂 2.0% (固体培养基时用), 调节 pH 7.1 ± 0.1 , 121°C, 20 min 灭菌备用。

梭菌选择性培养基 (TSN 培养基): 蛋白胨 1.5%、亚硫酸钠 0.1%、新霉素 0.005%、多粘菌素 0.002%、酵母粉 1.0%、柠檬酸铁 0.05%、琼脂 2.0% (固体培养基时用), 调节 pH 7.1 ± 0.1 , 121°C, 20 min 灭菌备用^[98]。

2.1.3 丁酸梭菌分离步骤

首先将采集的样品用生理盐水稀释后 80°C 水浴加热 10 min, 以杀死非芽孢菌; 然后接种于 RCM 液体培养基, 置于厌氧罐中 (混合气体: N₂ 80%、CO₂ 10% 和 H₂ 10%) 37°C 恒温箱中培养 48 h, 再次水浴加热 10 min, 接种于 TSN 液体培养基厌氧培养 48 h; 梯度稀释培养液 (10⁵、10⁶、10⁷ 倍稀释度), 涂布 TSN 培养基平板, 置入厌氧培养罐, 37°C 培养 48 h。通过菌落形态和镜检对菌株进行初步鉴定, 从中挑选出培养特征、菌落形态和显微形态符合丁酸梭菌特征的菌株连续划线纯化培养三代, 分别标记编号进入下一步鉴定和筛选。

2.2 丁酸梭菌形态学和 16S rDNA 鉴定

对分离获得的菌株进行形态学和 16S rDNA 的初步鉴定。形态学鉴定包括观察菌株于平板上形成的菌落形态和颜色, 革兰氏染色后于显微镜下观察菌体和芽孢形态。对符合丁酸梭菌培养和形态特征的菌株进行 16S rDNA 初步鉴定, 采用通用引物:

27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',

1525r: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

PCR 扩增其 16S rDNA 片段。PCR 反应体系: DNA 模板 1 μL, 2×Taq PCR Mix 25 μL, 正向引物 2 μL, 反向引物 2 μL, dd H₂O 20 μL。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取情况以及扩增产物大小。将扩增获得的片段送 Invitrogen 公司测序, 测序后的 16S rDNA 序列结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。然后选取与丁酸梭菌 16S rDNA 相似性在 99% 以上的菌株进行下一步试验。

2.3 丁酸梭菌产酸能力的初筛

取上述编号菌株接种到 RCM 液体培养基厌氧培养 16~24 h, 测得其 OD₆₅₀, 分别接种相同 OD 量的菌液到 RCM 液体培养基厌氧培养 48 h。

短链脂肪酸含量: 采用气相色谱法测定上述发酵液中 SCFA 的含量。

从上述菌株中选择丁酸和总 SCFA 产量较高的菌株进入下一步鉴定和复筛。

2.4 丁酸梭菌 API-20A 生化和特异性分子鉴定

对初筛获得的菌株进行 API-20A 生化鉴定和特异性分子鉴定。生化鉴定使用法国 API-20A 菌种鉴定试剂条（梅里埃，法国），按说明书进行操作。因 16S rDNA 和 API-20A 生化鉴定不能很好的区分丁酸梭菌和拜氏梭菌，再通过设计特异性的丁酸梭菌引物对丁酸梭菌和拜氏梭菌进行区分。引物序列如下：

F: 5'-CAGCAGCAGATGGTCCAATG-3',

R: 5'-GCGATTGGAGTGATTAATTC-3'

PCR 扩增该特异性片段。PCR 反应体系：DNA 模板 1 μ L，2 \times Taq PCR Mix 25 μ L，正向引物 2 μ L，反向引物 2 μ L，dd H₂O 20 μ L。PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，55 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s，共 30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取情况以及扩增产物大小。将扩增获得的的目的片段送 Invitrogen 公司测序，测序后的序列结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。

2.5 丁酸梭菌的复筛

取上述编号菌株接种到 RCM 液体培养基厌氧培养 16~24 h，测得其 OD₆₅₀，分别接种相同 OD 量的菌液到 RCM 液体培养基厌氧培养 48 h，得到各菌株发酵液，用于比较不同菌株的活菌数、芽孢存活率、模拟胃液和模拟小肠液存活率。

活菌数：采用平板计算法测定各菌株厌氧培养 48 h 后发酵液中丁酸梭菌的活菌数。

芽孢存活率：比较加热（80 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 和 10 min）和不加热各菌株发酵液的活菌数，计算芽孢存活率。

模拟胃液存活率：胃蛋白酶（3 g/L），溶于 0.2% NaCl 溶液，用浓盐酸调 pH 到 2.5。比较模拟胃液处理 3 h 前后的活菌数。

模拟小肠液存活率：胰蛋白酶（1 g/L）+胆盐（1 g/L）溶于 0.68% KH₂PO₄，调节 pH 到 8。比较模拟小肠液处理 3 h 前后的活菌数。

淀粉酶活力：取上述相同 OD 量的种子液滴种到淀粉平板（可溶性淀粉 0.1%，蛋白胨 0.5%，葡萄糖 0.5%，NaCl 0.5%，牛肉膏 0.5%，琼脂 0.8%，pH 7.1 \pm 0.1，121 $^{\circ}$ C，20 min 灭菌备用），厌氧培养 48 h，在其表面覆盖一层碘液（5 mM I₂ 和 5 mM KI），再观察并测定产生透明圈的直径。

纤维素酶活力：取上述相同 OD 量的种子液滴种到纤维素刚果红培养基平板（CMC-Na 0.2%，蛋白胨 0.5%，葡萄糖 0.3%，牛肉膏 0.5%，MgSO₄·7H₂O 0.05%，K₂HPO₄ 0.1%，刚果红 0.02%，琼脂 2.0%，pH 7.0 \pm 0.1，121 $^{\circ}$ C，20 min 灭菌备用），厌氧培养 48 h，测定产生透明圈的直径。

2.6 丁酸梭菌 SOD 和 NADH 氧化酶活力检测

采用超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）检测挑选出丁酸梭菌的 SOD 活力；采用 NADH 氧化酶酶联免疫分析试剂盒（上海索莱宝生物科技有限公司）测

定挑选出丁酸梭菌的 NADH 氧化酶活力。按照生产商的说明进行操作。

2.7 丁酸梭菌气体产量和组分检测

采用 AGRS-III 型微生物发酵微量产气自动记录仪与实时监控系统(中国农业大学)在 37℃ 培养挑选出的丁酸梭菌 72 h 并进行实时测定发酵累积产气量;此外,另外准备相同的丁酸梭菌发酵瓶放入恒温培养箱并连接气体收集袋培养 72 h,用气相色谱仪测定气体组分。

3 结果

3.1 菌株分离与初步鉴定

通过上述分离步骤以及形态学和 16S rDNA 初步鉴定共挑选出 16 株符合丁酸梭菌培养和形态特征以及与丁酸梭菌 16S rDNA 相似性在 99%以上的菌株进行下一步产酸能力初筛。

3.2 分离菌株产酸能力的初步筛选

不同菌株产丁酸和总 SCFA 产量如表 1-1 所示。综合考虑菌株的产酸能力和来源,从中挑选出 5 株菌株进入下一步鉴定和复筛。

表 1-1 菌株产丁酸和总 SCFA 的初步筛选

Table 1-1 Primary screening of strains producing butyrate and total SCFA

菌株	丁酸 (mM)	总挥发酸 (mM)
TR1	14.7±2.4	30.6±2.6
TR2	10.3±2.6	28.8±2.3
WN1	13.0±1.8	39.1±2.2
WN2	14.8±2.5	41.0±4.8
WN3	13.8±1.4	40.2±3.7
NF1*	17.9±2.5	53.3±3.6
NF2	16.8±2.7	49.5±4.3
NF3*	18.0±2.8	52.1±4.5
NF4	16.0±1.6	48.1±2.6
JF1*	14.9±1.7	43.3±3.2
JF2	12.2±1.5	41.7±3.7
ZF1	13.5±1.9	48.2±4.4
ZF2*	14.6±2.1	52.2±2.8
ZF3	12.5±1.3	44.4±3.5

ZF4*	4.1±2.2	50.8±2.7
ZF5	3.9±2.1	45.8±4.1

注：表中值表示平均值±SE

*挑选出的菌株进行后续试验

3.3 初筛菌株 API-20A 生化 and 特异性分子鉴定

对挑选的 5 株菌株进行 API-20A 菌种鉴定试剂条快速鉴定，记录糖发酵结果（表 1-2），鉴定结果使用 API-20A V3.0 软件进行分析。

表 1-2 菌株 API-20A 鉴定结果

Table 1-2 Results of API-20A identification in strains

试验项目（底物）	NF1	NF3	JF1	ZF2	ZF4
色氨酸 (IND)	-	-	-	-	-
尿酸 (URE)	-	-	-	-	-
葡萄糖 (GLU)	+	+	+	+	+
甘露醇 (MAN)	-	-	-	-	-
乳糖 (LAC)	+	+	+	+	+
蔗糖 (SAC)	+	+	+	+	+
麦芽糖 (MAL)	+	+	+	+	+
水杨苷 (SAL)	+	+	+	+	+
D-木糖 (XYL)	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖 (ARA)	+	+	-	-	-
明胶 (GEL)	-	-	-	-	-
七叶灵 (ESC)	+	+	+	+	+
甘油 (GLY)	+	+	+	-	-
纤维二糖 (CEL)	+	+	+	+	+
甘露糖 (MNE)	+	+	+	+	+
松三糖 (MLZ)	-	-	-	-	-
棉子糖 (RAF)	+	+	+	-	-
山梨醇 (SOR)	-	-	-	-	-
鼠李糖 (RHA)	-	-	-	-	-
海藻糖 (TRE)	+	+	+	+	+
过氧化氢酶 (CAT)	-	-	-	-	-
芽孢 (SPOR)	+	+	+	+	+
革兰氏反应 (GRAM)	+	+	+	+	+
形态 (COCC, 球状)	-	-	-	-	-

注：+代表反应呈阳性，-代表反应呈阴性

因 16S rDNA 和 API-20A 生化鉴定不能区分丁酸梭菌和拜氏梭菌，16S rDNA 与丁酸梭菌和拜氏梭菌的相似性在 97~100%之间，序列间的差异不够大，区分不准确；而 API-20A 只能鉴定到丁酸梭菌/拜氏梭菌，不能对这两种菌进行进一步区分。最后通过设计特异性的丁酸梭菌引

物扩增测序得到片段长度为 721 bp 的丁酸梭菌特异性序列, 该序列与丁酸梭菌序列的相似性在 99%以上, 与拜氏梭菌序列的相似性为 91%, 可以很好的将丁酸梭菌和拜氏梭菌区分开。该特异性序列如下:

```

agagttggta tagaatacat agtagtattc ttaaacaag ctgatatggt agatgatcca      60
gaattattag aattagttga aatggaagtt agagaattat taagtgaata tgacttccca      120
ggagatgata ttccagtaat aacaggatca gcattaaaag cattagaaaa cccaacagat      180
gatgcagcaa acaaatgtat catggaatta atggaagcag tagatagcta cattccaaca      240
ccagaaagag ctacagataa gccattctta atgccagtag aagatgtatt cacaatcact      300
ggtagaggaa cagttgcaac aggtagagtt gaaactggag tacttcacgt aggagacgaa      360
gttgaaatcg ttggattaag tgaagaaaag aagaagactg tatgtacagg aatcgaaatg      420
ttcagaaagt tattagatga agcacaagct ggagataaca tcggagcatt attaagaggg      480
gtacaaagaa ctgatatcga aagaggtcaa gttttagcag taccaaactc agtacacca      540
cacactaagt tcgtaggtca agtatacgtc cttaaaaaag aagaaggtgg aagacatact      600
ccattctttg atggatatag accacaattc tacttcagaa caacagacgt tacaggatca      660
atcaaattac cagatggtat ggaatggtt atgcctggag accacatcga catgaacgtt      720
g
    
```

通过以上 API-20A 生化 and 分子鉴定结果(表 1-3), 最终对挑选出的菌株进行了准确的鉴定, 确定了丁酸梭菌菌株, 另外拜氏梭菌 22954 为购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC) 的标准菌株, 作为鉴定试验对照, 用以确定鉴定结果是否准确。

表 1-3 菌株 API-20A V3.0 软件分析和分子鉴定结果

Table 1-3 Results of API-20A V3.0 software analysis and molecular identification in strains

菌种	鉴定%	T 指数	评价 (丁酸梭菌/拜氏梭菌)	16S rDNA 相似性 (丁酸梭菌/拜氏梭菌)	特异性分子相似性 (丁酸梭菌/拜氏梭菌)
22954 (拜氏梭菌)	99.6	0.75	很好的鉴定	99/100	91/99
NF1	99.9	1.0	极好的鉴定	100/98	99/91
NF3	99.9	1.0	极好的鉴定	100/98	99/91
JF1	99.9	0.9	极好的鉴定	100/98	99/91
ZF2	52.9	0.79	好的鉴定到“属”	99/97	99/91
ZF4	52.9	0.79	好的鉴定到“属”	99/97	99/91

3.4 丁酸梭菌的生物学性能和抗逆性复筛

不同丁酸梭菌菌株产酶能力、活菌数和抗逆性能如表 1-4 所示。其中丁酸梭菌 NF3 的淀粉酶活力最高，但与 NF1 和 JF1 差异不显著 ($P>0.05$)；NF3 的纤维素酶活力、活菌数和芽孢存活率显著高于其它菌株 ($P<0.05$)；NF3 模拟胃液存活率最高，但与其它菌株差异不显著 ($P>0.05$)；NF3 模拟小肠液存活率与各菌株之间差异不大 ($P>0.05$)。综合考虑初筛与复筛各菌株生物学性能和抗逆性结果，选取各性能最优的丁酸梭菌 NF3 进行后续试验。该菌株已于 2013 年 9 月 16 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路甲 3 号，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），保藏号为 CGMCC No. 8187。

表 1-4 菌株生物学性能和抗逆性复筛

Table 1-4 Screening of biological properties and stress resistance in strains

菌株	淀粉酶 (mm)	纤维素酶 (mm)	活菌数 (10^7 CFU/mL)	芽孢存活率 (5 min, %)	芽孢存活率 (10 min, %)	模拟胃液存 活率 (%)	模拟小肠液 存活率 (%)
NF1	19.0±0.5 ^a	8.8±0.3 ^b	1.3±0.2 ^c	43.2±2.3 ^c	16.5±2.3 ^c	95.9±3.2	93.7±2.6
NF3	20.3±0.3 ^a	9.8±0.3 ^a	5.8±0.5 ^a	77.4±5.3 ^a	36.0±2.1 ^a	99.5±2.3	94.2±3.5
JF1	18.8±1.0 ^a	8.7±0.5 ^b	0.7±0.2 ^d	41.2±3.4 ^c	14.5±1.8 ^c	93.9±3.7	94.7±4.3
ZF2	16.0±0.6 ^b	7.3±0.5 ^c	2.4±0.3 ^b	52.5±3.6 ^b	22.1±1.3 ^b	98.5±2.6	92.4±3.8
ZF4	15.5±1.0 ^b	7.7±0.4 ^c	1.8±0.4 ^{bc}	50.2±2.3 ^b	20.6±2.5 ^b	98.1±3.1	95.7±4.5

注：表中值表示平均值±SE

同一列中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.5 丁酸梭菌 SOD 和 NADH 氧化酶活力

对挑选出的丁酸梭菌 CGMCC No. 8187 进行了 SOD 和 NADH 氧化酶活力检测，发现该菌可以产生 SOD 和 NADH 氧化酶，这两种酶的活力分别为 0.90 和 1.34 U/mg protein。API-20A 鉴定时发现挑选的所有丁酸梭菌菌株过氧化氢酶（CAT）都为阴性。

3.6 丁酸梭菌气体产量和组分

对丁酸梭菌 CGMCC No. 8187 进行了气体产量和组分测定，发现该菌可产气 58.22 mL/50 mL 发酵液，气体由 H₂ 和 CO₂ 组成，其中 H₂ 产量为 37.49 mL，CO₂ 产量为 20.73 mL。

4 讨论

丁酸梭菌是存在于土壤、人和畜禽肠道中的一种厌氧菌，对改善畜禽肠道健康具有明显的

作用。目前有关丁酸梭菌的研究和应用还处于初级阶段,并且存在一些问题,如菌种不是来源于动物肠道,造成其不易在动物肠道中定植及进入动物肠道后效果不佳;以及对丁酸梭菌生物学特性和抗逆性研究不够系统等。

许多研究证明,丁酸梭菌主要在大肠和盲肠周边定植。所以本研究主要采集了动物的后肠和盲肠内容物以及新鲜粪便分离丁酸梭菌。主要利用梭菌强化和选择性培养基、丁酸梭菌的培养特性、形态特征和产芽孢等分离得到了丁酸梭菌,并采用 16S rDNA、API-20A 生化 and 特异性分子对分离得到的菌株进行了鉴定,最终确定了丁酸梭菌,并挑选出了各方面性能优异的丁酸梭菌。

益生菌菌种在使用前需进行准确的分类鉴定并给出确切的分类地位。传统的细菌分类及鉴定主要是对一般表型特征和生理生化特点进行鉴定,而随着现代分子生物学技术的发展,以 16S rDNA 为代表的现代分子生物学技术正成为菌种鉴定的重要手段。但是由于许多菌种之间的 16S rDNA 基因序列相似性很高,在分类学上经常也会产生一些错误的分类结果或是一些菌株相似性太接近而无法准确区分。所以研究者们开始寻找其它更加特异性的序列对这些不易区分的菌株进行鉴定,如内源转录间隔区 ITS、recA、dnaJ、hsp65 编码 65-kDa 热应激蛋白、rpoB 编码 RNA 聚合酶 B 亚基、细菌 DNA 促旋酶基因的活性结构 GyrA 和 GyrB 两个亚单位组成的四聚体等^[21-25]。本研究综合利用了 16S rDNA 和 API-20A 生化鉴定试剂条鉴定结果,但是发现丁酸梭菌和拜氏梭菌仍然不能很好的被区分开,所以又设计了丁酸梭菌特异性引物,得到的序列与丁酸梭菌序列的同源性在 99%以上,与拜氏梭菌序列的同源性为 91%。在以后的菌种鉴定和研究中可以利用该特异性序列和引物对丁酸梭菌进行快速而准确的鉴定,节约时间和成本。

益生菌的特性以及抗逆性决定了其能否在畜牧生产中应用与推广。产丁酸是丁酸梭菌最主要和最重要的特征,也是该菌改善肠道健康方面的作用基础,所以本研究首先从产丁酸和总 SCFA 能力对菌株进行了初筛,我们的研究发现这些丁酸梭菌产生的 SCFA 主要是乙酸和丁酸,其它的 SCFA 含量很低;然后对初筛和鉴定获得的丁酸梭菌进行了产淀粉酶和纤维素能力、活菌数、芽孢存活率、模拟胃液存活率和模拟小肠液存活率等方面的复筛。丁酸梭菌的另一个显著特征是产生淀粉酶和纤维素酶,可以水解淀粉和纤维素等碳水化合物生成低聚糖,这些低聚糖更容易被乳酸菌和双歧杆菌等利用,从而促进了肠道内有益菌的生长。抗逆性对益生菌能否在畜牧生产上应用以及其应用效果起着非常重要的影响。饲料在制粒的过程中通常需要耐受 80℃ 左右的高温几分钟,所以与乳酸菌等非芽孢菌相比,芽孢菌具有更好的耐高温能力,从而在畜牧生产中应用也更广。丁酸梭菌也可以形成内生芽孢,对 80℃ 的高温具有一定的耐受性,本研究发现了丁酸梭菌菌株 CGMCC No. 8187 对 80℃ 作用 5 min 和 10 min 的存活率分别为 77.4% 和 36.0%,可以耐受短时间的高温。谢树贵(2007)研究丁酸梭菌 B1 芽孢耐热性时也发现,该菌在 55、60 和 80℃ 作用 120、60 和 30 min 后的存活率分别为 84.8%、77.1% 和 6.48%^[98]。上述研究共同表明了与大多数枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌相比,丁酸梭菌的耐热性略差,但是与产酸的乳酸菌和双歧杆菌相比,丁酸梭菌的耐热性明显优于这些产酸益生菌。益生菌进入肠道中最终发挥作用还得先经过胃酸和胆盐的作用,本研究发现了丁酸梭菌具有很强的耐受胃酸和胆盐的能力,大多数菌株在经过胃酸和胆盐作用后的存活率都能维持在 95% 左右。

需氧菌、厌氧菌和兼性厌氧菌主要是根据它们对氧气的敏感程度不同而进行分类的。需氧菌一般都含有 SOD 和 CAT,这些菌在有氧环境中可以抵抗氧的毒害;而厌氧菌所含的 SOD 都

低于需氧菌，且不含 CAT，所以对氧的抵抗能力低于需氧菌^[99]。Kawasaki 等（1998）研究发现丁酸梭菌可以产生 SOD 和 NADH/NADPH 氧化酶，当培养基中有氧气时丁酸梭菌停止生长，但当培养基中所有的氧气被其消除后，丁酸梭菌可以重新恢复正常的生长速率，表明在细胞内氧的还原没有对该菌造成氧化损伤^[2]。我们的研究也发现丁酸梭菌可以产生 SOD 和 NADH 氧化酶。

综上所述，本研究通过生境分离、生化和分子鉴定以及生物学性能和抗逆性筛选，最终挑选得到了生物学性能和抗逆性优异的丁酸梭菌。

试验二 丁酸梭菌对氧化应激小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响

摘要：本试验探讨了丁酸梭菌对皮质酮（CORT）诱导的氧化应激小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响。75 只体重 20 g 左右的 SPF 级昆明种雄鼠随机分成 5 个处理组，每组 5 个重复。试验期 14 天。皮质酮按所需剂量溶解于橄榄油中，丁酸梭菌用生理盐水稀释成所需浓度。对照组皮下注射不含 CORT 的橄榄油和灌胃生理盐水，氧化应激组小鼠每天皮下注射 20 mg CORT/kg 体重和灌胃生理盐水，丁酸梭菌低剂量、中剂量和高剂量组小鼠分别在诱导氧化应激的基础上每天灌胃 1×10^5 CFU、 1×10^6 CFU 和 1×10^7 CFU 的丁酸梭菌。结果发现丁酸梭菌缓解了氧化应激导致的小鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活力和谷胱甘肽（GSH）含量的降低以及丙二醛（MDA）含量的升高；丁酸梭菌提高了小鼠结肠黏膜 SOD 和 GST 活力以及 GSH 含量，降低了 MDA 含量。丁酸梭菌降低了小鼠血清 CORT、胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇含量。试验结果表明丁酸梭菌具有提高小鼠抗氧化能力和调节脂类代谢的作用。

1 前言

丁酸梭菌是存在于动物肠道中的一种厌氧有益菌，可通过维持肠道微生态平衡而改善动物肠道健康^[55, 100-102]，该菌还具有调节机体和肠道免疫功能的作用^[48, 103]。丁酸梭菌可通过厌氧发酵碳水化合物产生丁酸和氢气^[49, 51]，还有研究发现丁酸梭菌可产生 SOD 和 NADH 氧化酶^[2]。丁酸可作为肠道上皮细胞一种重要的能量来源，已有一些关于丁酸可以改善肠道黏膜结构和提高肠道和机体抗氧化能力的报道^[3, 4]；最近的研究表明，氢气可以通过选择性清除机体中羟自由基而起到抗氧化的作用，已被广泛地用于各种医学研究，氢气是一种重要的生理调节因子，具有抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡的作用^[5, 7]。丁酸梭菌可产生 SOD、丁酸和氢气这些有益物质，因此可能对动物机体抗氧化能力具有一定的效果。近些年来，一些研究发现益生菌能通过产生抗氧化酶或是通过改善肠道内环境和产生有益代谢产物调节氧化还原电位而清除自由基和抗脂质过氧化，缓解氧化应激，如一些双歧杆菌、乳酸菌和富硒益生菌等^[26, 27, 32-37]。然而，目前关于丁酸梭菌的研究主要停留在其促生长和防治肠道疾病的效果上，很少有关于丁酸梭菌对动物抗氧化能力的研究报道。

研究表明糖皮质激素皮质酮（CORT）可以显著增加机体内的过氧化物，降低抗氧化酶活性，较易于控制应激效果，是建立氧化应激模型的一种较为理想的应激原（图 2-1）^[104-106]。本试验通过给小鼠注射皮质酮诱导氧化应激模型，同时灌服不同剂量的丁酸梭菌，比较各组小鼠的肝脏和结肠黏膜抗氧化能力的差异，并测定小鼠血脂含量，探讨丁酸梭菌对小鼠抗氧化能力和血脂含量的影响。

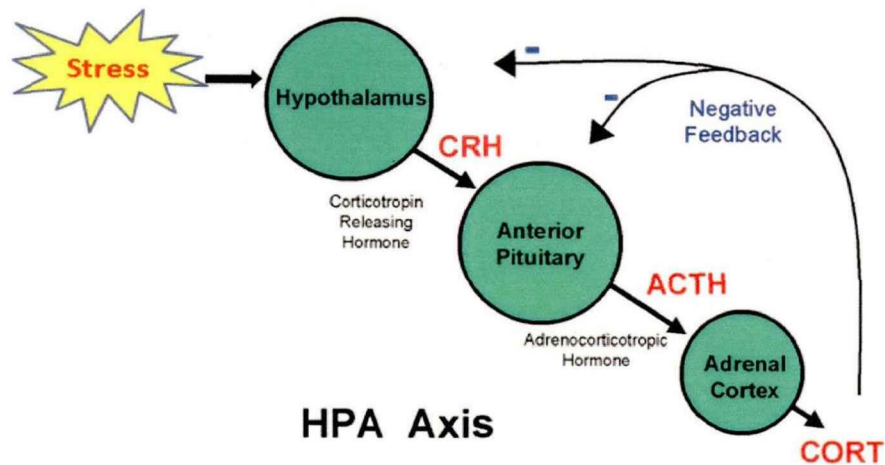


图 2-1 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (HPA轴)

Figure 2-1 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis)

2 材料与方法

2.1 试验材料

丁酸梭菌制剂的制备：丁酸梭菌CGMCC No. 8187三角瓶厌氧发酵获得丁酸梭菌发酵液，经活菌计数后用生理盐水稀释到相应浓度。

超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

小鼠血清皮质酮和血脂测定试剂盒购自北京柏定生物工程有限公司。

皮质酮购自 Sigima 公司，按所需浓度溶解于橄榄油中。

2.2 试验动物与管理

体重 20 g 左右的 SPF 级昆明种雄鼠、高压灭菌的全价小鼠颗粒饲料和垫料由军事医学科学院提供。小鼠饲养于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所清洁级鼠房内，人工昼夜 (12 h 黑夜，12 h 白昼)，室温 24-26℃。小鼠自由饮水和采食。

2.3 试验分组和处理

小鼠适应性饲养 3 天后，将 75 只体重 20 g 左右的 SPF 级昆明种雄鼠随机分成 5 个处理组 (表 2-1)，每个处理组 5 个重复。对照组皮下注射 0.2 mL 橄榄油 (不含皮质酮) 和灌胃生理盐水 0.5 mL，氧化应激组小鼠按每天 20 mg 皮质酮/kg 体重皮下注射 0.2 mL 橄榄油和灌胃生理盐水 0.5 mL，丁酸梭菌低剂量、中剂量和高剂量组小鼠分别在氧化应激的基础上每天灌胃 1×10^5 CFU、 1×10^6 CFU 和 1×10^7 CFU 的丁酸梭菌。试验期 14 天，每天上午 9 点给小鼠注射皮质酮和灌胃丁酸梭菌。

表 2-1 试验设计和处理

Table 2-1 Experimental design and treatments

组别	氧化应激处理	丁酸梭菌处理
对照组	皮下注射橄榄油	灌胃生理盐水
氧化应激组	皮下注射皮质酮	灌胃生理盐水
菌低剂量菌组	皮下注射皮质酮	灌胃 1×10^5 CFU 丁酸梭菌
中剂量菌组	皮下注射皮质酮	灌胃 1×10^6 CFU 丁酸梭菌
高剂量菌组	皮下注射皮质酮	灌胃 1×10^7 CFU 丁酸梭菌

2.4 血清皮质酮和血脂含量

试验结束后,从小鼠眼眶采集血液,分离血清,将分离得到的血清冻存于-20℃,以备测定小鼠血清皮质酮和血脂含量。

2.5 抗氧化能力

采血后,采用颈椎脱臼法处死小鼠,采集小鼠肝脏和结肠黏膜迅速冻存于-20℃,以备测定小鼠组织抗氧化能力。

2.6 统计分析

采用 SAS 9.4 统计软件中的一般线性模型 (GLM) 中单因素方差分析,对所有试验数据进行方差分析。每个重复为一个试验单元。方差分析差异显著者,以最小显著差异 (LSD) 法比较平均数间的差异。以 0.05 作为各项数据的差异显著性检验水平。

3 结果

3.1 小鼠抗氧化能力

由表 2-2 可看出,丁酸梭菌对小鼠肝脏 GST 活力、GSH 含量和 MDA 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。丁酸梭菌高剂量组的肝脏 GST 活力显著高于氧化应激组 ($P < 0.05$),与对照组差异不显著 ($P > 0.05$),对照组肝脏的 GST 活力显著高于氧化应激组、丁酸梭菌低剂量组和丁酸梭菌中剂量组 ($P < 0.05$);丁酸梭菌高剂量组 GSH 含量显著高于氧化应激组和丁酸梭菌低剂量组 ($P < 0.05$),与对照组差异不显著 ($P > 0.05$);氧化应激组的 MDA 含量显著高于对照组、丁酸梭菌中剂量组和丁酸梭菌高剂量组 ($P < 0.05$),与丁酸梭菌低剂量组差异不显著 ($P > 0.05$)。试验处理对小鼠肝脏 SOD 和 GPX 活力没有显著影响 ($P > 0.05$)。

丁酸梭菌对小鼠结肠黏膜 SOD 活力、GST 活力、GSH 含量和 MDA 含量有显著影响 ($P<0.05$)。丁酸梭菌中剂量组和高剂量组的结肠黏膜 SOD 活力显著高于氧化应激组和对照组 ($P<0.05$)；丁酸梭菌高剂量组的 GST 活力显著高于氧化应激组和丁酸梭菌低剂量组 ($P<0.05$)，与对照组差异不显著 ($P>0.05$)；丁酸梭菌高剂量组的 GSH 含量显著高于氧化应激组和丁酸梭菌低剂量组 ($P<0.05$)，与对照组和丁酸梭菌中剂量组差异不显著 ($P>0.05$)；丁酸梭菌中剂量组和高剂量组的 MDA 含量显著低于氧化应激组 ($P<0.05$)，与对照组和丁酸梭菌低剂量组差异不显著 ($P>0.05$)。试验处理对结肠黏膜 GPX 活力没有显著影响 ($P>0.05$)。

表 2-2 丁酸梭菌对氧化应激小鼠组织抗氧化能力的影响

Table 2-2 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of tissues in oxidative stress mice

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	氧化应激组	集合标准误	P 值
肝脏							
SOD	68.3	72.6	72.3	72.2	73.0	4.5	0.9582
GST	33.6 ^a	27.1 ^{bc}	27.3 ^{bc}	30.1 ^{ab}	22.2 ^c	2.0	0.0226
GPX	445	448	458	412	418	41	0.9183
GSH	0.587 ^{ab}	0.536 ^{bc}	0.554 ^{abc}	0.607 ^a	0.500 ^c	0.041	0.0231
MDA	0.373 ^c	0.438 ^{ab}	0.353 ^c	0.344 ^c	0.454 ^a	0.019	0.0033
结肠							
SOD	52.1 ^c	54.1 ^{bc}	60.1 ^b	67.3 ^a	46.8 ^c	2.1	0.0001
GST	135 ^{ab}	113 ^b	135 ^{ab}	163 ^a	110 ^b	11	0.0421
GPX	6.64	5.74	5.45	5.91	5.39	1.23	0.9544
GSH	24.7 ^{ab}	18.2 ^{bc}	24.1 ^{ab}	29.3 ^a	16.1 ^c	2.2	0.0162
MDA	0.839 ^b	0.986 ^{ab}	0.790 ^b	0.807 ^b	1.190 ^a	0.084	0.0341

SOD: 超氧化物歧化酶, GST: 谷胱甘肽S-转移酶, GPX: 谷胱甘肽过氧化物酶, GSH: 还原型谷胱甘肽, MDA: 丙二醛

单位: GST, GPX 和 SOD: U/mg protein, GSH: $\mu\text{mol/g protein}$, MDA: nmol/mg protein

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.2 血清皮质酮和血脂含量

由表 2-3 可知, 丁酸梭菌对小鼠血清皮质酮、胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇含量有显著影响 ($P<0.05$), 对低密度脂蛋白胆固醇含量无显著影响 ($P>0.05$)。丁酸梭菌高剂量组小鼠血清皮质酮含量显著低于氧化应激组 ($P<0.05$), 与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。丁酸梭菌高剂量组小鼠血清胆固醇含量显著低于对照组和氧化应激组 ($P<0.05$), 与丁酸梭菌低剂

量组和中剂量组差异不显著 ($P>0.05$); 丁酸梭菌中剂量组和氧化应激组小鼠血清甘油三酯含量显著高于对照组 ($P<0.05$); 丁酸梭菌高剂量组和氧化应激组小鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇含量显著低于对照组 ($P<0.05$), 丁酸梭菌高剂量组小鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇含量显著低于对照组、丁酸梭菌低剂量组和丁酸梭菌中剂量组 ($P<0.05$)。

表 2-3 丁酸梭菌对氧化应激小鼠血清皮质酮和血脂含量的影响

Table 2-3 Effect of *C. butyricum* on serum corticosterone and lipid in oxidative stress mice

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	氧化应激组	集合标准误	P 值
皮质酮	795 ^c	910 ^{ab}	856 ^{abc}	846 ^{bc}	935 ^a	28	0.0266
CHOL	3.20 ^a	2.91 ^{ab}	2.87 ^{ab}	2.56 ^b	3.00 ^a	0.14	0.0462
TG	2.29 ^b	2.62 ^{ab}	2.78 ^a	2.47 ^{ab}	2.83 ^a	0.12	0.0347
HDLC	2.38 ^a	2.16 ^{ab}	2.21 ^{ab}	1.80 ^c	1.87 ^{bc}	0.13	0.0115
LDLC	0.423	0.332	0.305	0.333	0.377	0.046	0.3997

CHOL: 总胆固醇, TG: 甘油三酯, HDLC: 高密度脂蛋白胆固醇, LDLC: 低密度脂蛋白胆固醇

单位: 皮质酮: ng/mL, CHOL、TG、HDLC和LDLC: mM

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

4 讨论

氧化应激是由于机体受到内源性或外源性刺激, 机体氧化系统和抗氧化系统失去平衡的一种状态。如果这种应激状态得不到及时修复, 就会发展为氧化损伤, 从而对组织的细胞膜、DNA、蛋白质和脂类等造成严重破坏。近些年来, 较多的研究者通过给动物饲喂或注射糖皮质激素 (如皮质酮和地塞米松) 诱导机体产生氧化应激反应, 来建立氧化应激模型^[97, 105, 106]。本研究通过皮质酮诱导小鼠产生了氧化应激, 同时灌胃丁酸梭菌研究其对小鼠抗氧化能力和血脂代谢的影响, 发现丁酸梭菌可以提高小鼠肝脏和结肠黏膜的抗氧化能力, 并且可以降低小鼠血清皮质酮、胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量。

最近一些研究发现乳酸菌和双歧杆菌等益生菌具有抗氧化的功能^[26, 27, 32, 33]。然而, 目前很少有关于丁酸梭菌对小鼠抗氧化能力的研究报道。丁酸梭菌可产生SOD、丁酸和氢气, 已有研究表明这些有益物质可通过增加抗氧化酶的活力和降低活性氧代谢物而调节氧化应激^[4, 5, 96]。Endo等 (2013) 研究表明丁酸梭菌MIYAIRI 588可显著诱导大鼠核因子Nrf2及其调节的抗氧化酶的表达并能抑制肝脏的氧化应激^[107]。Zhang 等 (2011) 的研究发现丁酸钠可缓解皮质酮诱导肉鸡产生的氧化应激, 丁酸钠显著增加了胸肌中过氧化氢酶 (CAT) 的活性并降低了MDA的含量^[97]。Hamer 等 (2009) 发现丁酸处理可显著增加健康人结肠黏膜GSH的含量并降低尿酸的含量, 可改善人结肠黏膜的抗氧化能力^[4]。Ohsawa等 (2007) 的研究首次发现了氢气可作为抗氧化剂选择性的清除机体和细胞中的羟自由基^[5]。因此, 丁酸梭菌的抗氧化作用可能部分是由于其产生的抗氧化酶或代谢物丁酸和氢气产生的抗氧化作用。而且, 一些研究表明益生菌的抗氧化作用可能是由于益生

菌可刺激免疫系统从而降低炎症反应, 或通过抑制肠道病原菌降低炎症反应以及与炎症反应相关的氧化应激^[27, 33]。但是, 丁酸梭菌降低氧化应激反应的确切机制还需要进一步研究。

一些研究发现, 乳杆菌、双歧杆菌和肠球菌等益生菌具有降低机体胆固醇和血脂含量的作用。心脑血管疾病的主要原因之一就是高血脂症, 降低血清胆固醇和血脂浓度能够显著降低心脑血管病的死亡率^[108]。Harrison和Peat (1975) 用嗜酸乳杆菌发酵酸奶喂养婴儿后发现婴儿粪便中乳杆菌数量明显增加, 与此同时婴儿血清胆固醇水平明显降低, 表明该菌对婴儿血清胆固醇水平具有调节作用^[109]。Seo等 (2013) 研究了丁酸梭菌MIYAIRI 588对高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝病的影响, 发现丁酸梭菌组大鼠肝脏调节胆固醇代谢和排泄转运蛋白的mRNA表达量增加和总胆酸的排出量增加, 以及肝脏脂滴的积累降低^[30]。Zhao等 (2014) 研究发现丁酸梭菌可以通过细胞壁组分和代谢产物丁酸降低细胞脂肪的合成能力^[110]。本研究在上述研究共同表明了丁酸梭菌及其代谢物丁酸具有降低胆固醇和脂质的作用。

5 小结

本研究通过皮下注射肾上腺皮质激素皮质酮诱导了小鼠氧化应激模型, 发现灌胃丁酸梭菌可提高小鼠肝脏和结肠黏膜的抗氧化能力, 减轻皮质酮诱导的氧化应激; 还发现丁酸梭菌具有降低小鼠血清皮质酮、胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇含量的作用。

试验三 丁酸梭菌对肉鸡生长性能、肠道健康、免疫功能、抗氧化能力和肉品质的影响

摘要: 本试验研究了丁酸梭菌对肉鸡生长性能、肠道健康、免疫功能、抗氧化能力和肉品质的影响。试验选取 1 日龄体重相近的 AA 肉公雏 320 只, 随机分到 5 个处理组, 每个处理组 8 个重复。试验期 42 天。各处理组分别为: 对照组饲喂基础日粮, 丁酸梭菌组分别在基础日粮的基础上添加丁酸梭菌 2.5×10^8 CFU/kg、 5×10^8 CFU/kg 和 1×10^9 CFU/kg, 抗生素组在基础日粮的基础上添加金霉素 150 mg/kg。结果发现, 日粮中添加丁酸梭菌显著提高了肉鸡 1~21 天和 22~42 天的平均日增重; 改善了 21 天和 42 天肉鸡十二指肠的形态结构并提高了 21 天盲肠食糜中乙酸、丁酸和总 SCFA 的含量; 提高了 21 天和 42 天肉鸡血清中 IgM 的含量; 提高了 21 天和 42 天肉鸡十二指肠、空肠和回肠黏膜、血清和肝脏的抗氧化能力; 提高了 42 天肉鸡的胸肌率并降低了腹脂率; 提高了 42 天肉鸡胸肌多不饱和脂肪酸(PUFA) C20:2n-6、C20:3n-6、C20:3n-3、C20:4n-6 (ARA)、C20:5n-3 (EPA)、C22:6n-3 (DHA) 和总 PUFA 的含量以及 PUFA/SFA (饱和脂肪酸) 比率, 提高了 42 天肉鸡腿肌 PUFA C18:2*t*-9,*t*-12、C20:3n-6、C20:3n-3 和 EPA 的含量, 但对胸肌和腿肌中大部分 SFA 和单不饱和脂肪酸(MUFA) 无显著影响; 降低了 21 天肉鸡血清中胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量以及 42 天血清中胆固醇的含量。结果表明丁酸梭菌通过增强肉鸡抗氧化能力、肠道健康和免疫功能提高了肉鸡的肉品质。

1 前言

鸡肉在我国肉类的消费结构中占有重要地位, 是仅次于猪肉的第二大肉类消费品。然而, 随着动物遗传和营养等研究的发展, 快大型白羽肉鸡的生产性能不断提高, 但肉品质却呈下降趋势, 为肉鸡生产提出了新课题^[78]。随着我国畜牧业的迅速发展和人们消费意识的改变, 消费者更加注重畜禽产品的安全性、健康价值和风味品质。鸡肉中的 PUFA 不仅是人体不可缺少的营养物质, 对人的心脑血管疾病具有预防作用, 还是鸡肉中主要的风味前体物质^[85]。因此, 关于肉鸡脂肪沉积和 PUFA 调控的研究具有重要的现实和理论意义。

饲料中的不饱和脂肪酸(UFA)在肉鸡体内不经氢化可直接沉积在体脂肪中, 其体内脂肪酸的组成可直接反应日粮中脂肪酸的情况。研究发现, 鸡组织中饱和脂肪酸(SFA)和单不饱和脂肪酸(MUFA)主要受日粮脂肪类型、氧化速度以及肝脏合成脂肪酸的速度影响, 而肝脏不能合成多不饱和脂肪酸(PUFA), 所以 PUFA 的组成和含量主要受氧化速度和日粮中脂肪酸类型决定, 所以, 可以通过增加日粮中 PUFA 的含量或是改善机体组织的抗氧化能力调节肌肉中 PUFA 的组成和含量。

在动物饲养管理及肉类加工保藏过程中, 氧化损伤是影响肉品质的重要原因, 特别是肌肉中的 PUFA 更易受到自由基的攻击, 而 PUFA 又在畜禽肉品质和风味中起着重要的作用, 所以, 提高动物的抗氧化能力对改善其肉品质具有重要的作用^[95, 97]。然而, 目前很少有关于丁酸梭菌对肉鸡抗氧化能力和肉品质效果的研究报道。之前的小鼠试验已发现丁酸梭菌具有提高小鼠抗氧化能力和调节脂类代谢的作用。因此, 本试验将探讨采用丁酸梭菌提高肉鸡抗氧化能力和改

善肉品质的效果。

2 材料与方 法

2.1 丁酸梭菌制剂的制备

将丁酸梭菌 CGMCC No. 8187 接种于丁酸梭菌种子培养基, 置于厌氧罐中 (混合气体: N₂ 80%、CO₂ 10%和 H₂ 10%) 37℃恒温箱中培养 16~24 h, 然后按 5%~10%的接种量接种到发酵罐中, 37℃厌氧培养 36~48 h, 得到丁酸梭菌发酵液。

其中, 丁酸梭菌种子培养基为: 蛋白胨 1.0%、牛肉膏 1.0%、酵母粉 0.3%、葡萄糖 0.5%、(NH₄)₂SO₄ 0.1%、NaCl 0.5%、K₂HPO₄·H₂O 0.4%、MnSO₄·H₂O 0.02%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、CaCO₃ 0.2%, pH 值: 7.1 ± 0.1, 灭菌条件: 121℃灭菌 20 min。

丁酸梭菌发酵培养基为: 大豆蛋白胨 0.6%、胰蛋白胨 0.4%、酵母粉 0.3%、葡萄糖 0.5%、玉米渣 1.2%、(NH₄)₂SO₄ 0.1%、NaCl 0.5%、K₂HPO₄·H₂O 0.4%、MnSO₄·H₂O 0.02%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、CaCO₃ 0.2%, 消泡剂 M 0.05% (V/V), pH 值: 7.1 ± 0.1, 灭菌条件: 121℃灭菌 20 min。

将丁酸梭菌发酵液与麸皮按重量比为 0.5~0.8:1 的比例混合均匀, 然后在 50~60℃条件下烘干粉碎到 80 目以上, 得到丁酸梭菌干粉。

2.2 肉鸡与试验设计

试验选取 320 只爱拔益加 (Arbor Acre) 肉公雏 (北京华都肉鸡公司), 随机分到 5 个处理组, 每个处理分 8 个重复笼饲养。各处理组分别为: 基础日粮 (对照组, 表 3-1), 基础日粮+2.5×10⁸ CFU 丁酸梭菌/kg (低剂量菌组), 基础日粮+5×10⁸ CFU 丁酸梭菌/kg (中剂量菌组), 基础日粮+1×10⁹ CFU 丁酸梭菌/kg (高剂量菌组) 和 150 mg 金霉素/kg (抗生素组)。

2.3 试验日粮

试验基础日粮营养水平参照 NRC (1994) 标准配制, 日粮组成及营养水平见表 3-1。

表 3-1 肉鸡基础日粮组成

Table 3-1 Composition of the basal diets for broilers

项目	1-21 天	22-42 天
原料, %		
玉米	53.33	60.87
豆粕	38.75	32.04
豆油	3.70	3.26
磷酸氢钙	1.98	1.69
石粉	1.05	1.08

食盐	0.35	0.35
DL-蛋氨酸	0.18	0.12
氯化胆碱,50%	0.30	0.25
L-赖氨酸	0.04	0.02
微量预混料 ^a	0.30	0.30
肉鸡多维 ^b	0.02	0.02
营养指标, %		
代谢能, Mcal/kg	2.95	3.00
粗蛋白	21.00	19.00
赖氨酸	1.15	1.00
蛋氨酸	0.50	0.40
钙	0.98	0.90
非植酸磷	0.45	0.40

^a每千克饲料中添加: Mn, 100 mg; Fe, 80 mg; Zn, 75 mg; Cu, 8 mg; I, 0.35 mg; Se, 0.15 mg

^b每千克饲料中添加: VA 12500IU, VD₃ 2500IU, VE 30IU, VK₃ 2.65mg, VB₁ 2mg, VB₂ 6mg, Pantothenic acid 12mg, VB₁₂ 0.025mg,

Niacin 50mg, Folic acid 1.25mg, Biotin 0.0325mg

2.4 饲养管理

AA 肉鸡采用笼养, 自由采食和饮水。按《AA 肉鸡饲养管理手册》进行饲养管理。试验期 42 天。

2.5 生长性能统计

在试验的第 21 天和 42 天, 称鸡空腹 (前一天晚停料不停水) 重和耗料量, 计算平均日增重 (ADG)、平均日采食量 (ADFI) 和饲料转化率 (FCR)。整个试验期间每天记录鸡只死亡和健康状况。

2.6 样品采集和制备

分别于试验的第 21 天和 42 天, 从每个重复笼选取 1 只接近平均体重鸡称重。心脏穿刺采血, 分离血清, -20°C 保存, 用于测定血脂含量、免疫功能和抗氧化能力, 采用颈椎脱臼法处死肉鸡。取部分肝脏, 采集十二指肠、空肠和回肠黏膜用于抗氧化能力的测定; 采集一小段十二指肠 (U 型弯曲处) 用于十二指肠形态结构的分析; 采集盲肠食糜用于盲肠 SCFA 的测定; 采集胸肌和腿肌测定肉品质相关指标。42 日龄时, 每个处理随机选择 8 只鸡放血处死后, 把鸡

浸烫于 60℃ 的温水中 45 s, 然后使用脱毛机来回滚动脱毛。接着按下述方法进行胴体性能的测定。

2.7 测定指标和方法

2.7.1 胴体性能的测定

胴体指标测定, 在宰后 30 min 内完成(参照家禽生产性能名词术语和度量统计方法进行测定, NY/T 823-2004)。

宰前体重: 肉鸡宰前禁食 12 h, 以 g 为单位记录。

屠体重: 放血, 去羽毛、脚角质层、趾壳和喙壳后的重量。

腹脂: 肌胃周围的脂肪和腹部脂肪。

全净膛重: 屠体去头、脚和器官(除了肺和肾脏)的重量。去头时在第一颈椎骨与头部交界处连皮切开; 去脚时沿附关节处切开。

胸肌: 沿着胸骨脊切开皮肤并向背部剥离, 最后把整个胸肌从胸骨上剥离进行称重。

腿肌: 去除腿部皮肤和皮下脂肪, 将腿肌从腿骨上剥离进行称重。

胴体性能计算:

- 1) 屠宰率 (%) = 屠体重/宰前体重×100
- 2) 全净膛率 (%) = 全净膛重/宰前体重×100
- 3) 腹脂率 (%) = 腹脂重/宰前体重×100
- 4) 胸肌率 (%) = (左侧胸肌重×2/全净膛重) ×100
- 5) 腿肌率 (%) = (左侧大小腿净肌肉重×2/全净膛重) ×100

2.7.2 肉品质指标测定

肌肉 pH: 宰后 45 min 和 24 h (放 4℃ 冰箱) 用 Testo 205 pH 计 (Testo AG, Lenzkirch, Germany) 直接插入胸肌和腿肌中测定, 测定三次, 取平均值。使用前用 pH 4.01 和 pH 6.86 的标准缓冲液对 pH 计进行校正。

肌肉肉色: 屠宰后 45 min 用上海申光 WSC-S 数显测色色差计测定胸肌和腿肌的 L*值、a*值和 b*值, 测定 3 次, 取平均值。

肌肉剪切力: 屠宰后 24 h 的胸肌样品, 用塑料袋包装后放置于 80℃ 恒温水浴锅进行加热, 当肉品中心温度达到 75℃ 时取出, 冷却至室温。然后沿肌纤维方向修成长、宽、高分别为 2.5 cm、1.0 cm、0.25 cm 的长条, 用数显肉品嫩度仪 (型号 C-LM3, 东北农业大学) 垂直于肌纤维方向切割三个点, 求各点平均值。

肌肉失水率: 失水率采用 Grau-Hamm 滤纸挤压法测定。屠宰后 24 h 用取样器取胸肌肉样 5 g 左右, 称重记录压前重。将取好的肉样用滤纸包好, 压力 35 kg 持续挤压 5 min, 称量并记录压后重, 计算失水率。失水率=[(压前重-压后重)/压前重]×100%。

肌内脂肪: 采用 FOSS FoodScan 近红外分光光度计测定胸肌和腿肌中脂肪的含量。测定时

首先需将样品绞碎进行均一化处理，形成浆糊样混合物，然后取大约 300 g 样品平铺于样品盘中，放入设备中进行测定。每个样品读数 3 次，取平均值。

脂肪酸测定：采用气相色谱测定胸肌和腿肌中脂肪酸的组成和含量。参照 Folch 等^[111] 氯仿-甲醇程序提取肌肉中总脂类物质。然后将总脂类物质提取物转化为脂肪酸甲酯，接着用 HP 6890 气相色谱仪进行分离。该气相色谱仪装有火焰电离检测器和 DB-23 毛细管柱（内部直径 0.25 mm，长度 60 m，膜厚度 0.25 μ m；J&W Scientific, Folsom, CA, USA）。进样器和检测器的温度分别为 250 $^{\circ}$ C 和 280 $^{\circ}$ C。载气使用高纯氦气，流动速度为 1 mL/min。升温程序：初始温度 120 $^{\circ}$ C，保持 1 min，10 $^{\circ}$ C/min 升温到 170 $^{\circ}$ C，保持 10 min，5 $^{\circ}$ C/min 升温到 210 $^{\circ}$ C，保持 5 min，5 $^{\circ}$ C/min 升温到 230 $^{\circ}$ C，然后保持 20 min。通过比较样品与标准品的保留时间和峰面积确认脂肪酸的组成和计算脂肪酸的含量，脂肪酸的含量以 mg/g 肌肉表示。

血脂含量：采用北京柏定生物工程有限公司血脂测定试剂盒和东芝 TBA-120FR 全自动生化分析仪测定肉鸡血清中血脂含量。

2.7.3 肠道健康

十二指肠形态结构：取十二指肠组织 2 cm 左右置于 10%中性福尔马林固定液（100 mL 37%~40%甲醛原液，6.5 g 硫酸二氢钠，4 g 硫酸氢二钠，加蒸馏水至 1000 mL）中固定，测定肠黏膜形态结构。肠道样品采用酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切成 5 μ m 厚的切片，进行苏木精-伊红（HE）染色。每张切片在显微镜下随机选取 5 个视野，测定肠绒毛高度和隐窝深度，并计算每张切片绒毛高度和隐窝深度比值（V/C）。

盲肠食糜 SCFA：盲肠食糜 SCFA 采用气相色谱法进行测定。首先将样品从冰箱取出解冻后称取 0.5 g 左右的样品转入离心管内，加入蒸馏水按 1:10 稀释，然后混合均匀，以 10000 rpm，4 $^{\circ}$ C 低温离心 15 min，取上清液分装于离心管中，作为 SCFA 测定的样品。参照 Erwin 等^[112]建立的 SCFA 测定方法进行测定。

2.7.4 免疫功能

采用鸡特异性 IgA、IgG、IgM、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒（北京方程生物科技有限公司）测定肉鸡血清免疫功能。

2.7.5 抗氧化能力

采用南京建成生物工程研究所的超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）、还原型谷胱甘肽（GSH）和丙二醛（MDA）测定试剂盒测定肉鸡血清、肝脏和肠黏膜抗氧化指标。

2.8 数据分析

采用 SAS 9.4 统计软件中的一般线性模型（GLM）中单因素方差分析，对所有试验数据进

行方差分析。方差分析差异显著者，以最小显著差异（LSD）法比较平均数间的差异。以 0.05 作为各项数据的差异显著性检验水平。

3 结果

3.1 生长性能

由表 3-2 可看出，添加丁酸梭菌对肉鸡 1~21 天和 22~42 天的 ADG 有显著影响 ($P<0.05$)，但对 1~21 天和 22~42 天的 ADFI 和 FCR 无显著影响 ($P>0.05$)。添加丁酸梭菌各组 1~21 天肉鸡的 ADG 显著高于对照组 ($P<0.05$)，与抗生素组差异不显著 ($P>0.05$)；添加丁酸梭菌中剂量组 22~42 天肉鸡的 ADG 显著高于对照组和丁酸梭菌低剂量组 ($P<0.05$)，与抗生素组和丁酸梭菌高剂量组差异不显著 ($P>0.05$)。

表 3-2 丁酸梭菌对肉鸡生长性能的影响

Table 3-2 Effect of *C. butyricum* on growth performance in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
1~21 天							
ADFI (g/d)	51.0	52.2	52.9	53.1	52.8	0.5	0.1166
ADG (g/d)	36.0 ^b	37.5 ^a	37.9 ^a	37.7 ^a	37.2 ^{ab}	0.4	0.0320
FCR (g/g)	1.42	1.39	1.40	1.41	1.43	0.01	0.0817
22~42 天							
ADFI (g/d)	146	150	156	153	149	3	0.1886
ADG (g/d)	76.0 ^c	78.8 ^{bc}	83.9 ^a	81.4 ^{abc}	82.7 ^{ab}	1.8	0.0343
FCR (g/g)	1.95	1.90	1.89	1.91	1.85	0.05	0.6524

ADFI: 平均日采食量, ADG: 平均日增重, FCR: 饲料转化率 (饲料/增重), g/d: 克/天

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.2 肠道健康

3.2.1 十二指肠形态结构

由表 3-3 可看出，添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡十二指肠绒毛高度没有显著影响 ($P>0.05$)，但对隐窝深度和绒毛高度/隐窝深度 (V/C) 有显著影响 ($P<0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡十二指肠隐窝深度显著低于对照组 ($P<0.05$)，添加丁酸梭菌低剂量组和中剂量组隐窝深度显著低于抗生素组 ($P<0.05$)；添加丁酸梭菌中剂量组的 V/C 值显著高于其余各组 ($P<0.05$)，添加丁酸梭菌各组的 V/C 值显著高于对照组 ($P<0.05$)。

添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡十二指肠绒毛高度、隐窝深度和 V/C 值均有显著影响 ($P<0.05$)。

添加丁酸梭菌低剂量组肉鸡十二指肠绒毛高度显著高于丁酸梭菌高剂量组和抗生素组 ($P<0.05$); 添加丁酸梭菌中剂量组隐窝深度显著低于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 ($P<0.05$); 添加丁酸梭菌中剂量组的 V/C 值显著高于其余各组 ($P<0.05$)。

表 3-3 丁酸梭菌对肉鸡十二指肠形态结构的影响

Table 3-3 Effect of *C. butyricum* on duodenal morphology in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
21 天							
绒毛高度 (μm)	3128	2991	3410	3274	3262	127	0.1988
隐窝深度 (μm)	213 ^a	174 ^c	169 ^c	185 ^{bc}	196 ^{ab}	7	0.0002
V/C	14.9 ^c	17.3 ^b	20.3 ^a	17.9 ^b	16.7 ^{bc}	0.8	0.0011
42 天							
绒毛高度 (μm)	3174 ^a	3131 ^a	3090 ^{ab}	2804 ^b	2872 ^b	63	0.0006
隐窝深度 (μm)	272 ^a	278 ^a	229 ^c	238 ^{bc}	250 ^b	8	0.0001
V/C	11.7 ^b	11.4 ^b	13.6 ^a	10.7 ^b	11.6 ^b	0.4	0.0056

V/C: 绒毛高度/隐窝深度

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.2.2 盲肠食糜短链脂肪酸

由表 3-4 可看出, 添加丁酸梭菌对肉鸡 21 天盲肠食糜中的乙酸、丁酸和总 SCFA 含量有显著影响 ($P<0.05$), 但对丙酸含量没有显著影响 ($P>0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡盲肠食糜中乙酸含量显著高于对照组 ($P<0.05$); 添加丁酸梭菌高剂量组肉鸡盲肠食糜中丁酸含量显著高于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 ($P<0.05$), 与丁酸梭菌中剂量组差异不显著 ($P>0.05$); 添加丁酸梭菌中剂量组和高剂量组肉鸡盲肠食糜中总酸含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。

添加丁酸梭菌对肉鸡 42 天盲肠食糜中的乙酸、丙酸、丁酸和总 SCFA 含量无显著影响 ($P>0.05$)。

表 3-4 丁酸梭菌对肉鸡盲肠食糜中短链脂肪酸的影响

Table 3-4 Effect of *C. butyricum* on SCFA concentration of cecal digesta in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
21 天							
乙酸	33.1 ^b	55.9 ^a	65.4 ^a	59.2 ^a	48.1 ^{ab}	6.3	0.0164
丙酸	14.4	17.3	22.0	20.0	14.4	3.3	0.3845
丁酸	11.9 ^b	11.5 ^b	13.4 ^{ab}	15.9 ^a	9.9 ^b	1.5	0.0424
总 SCFA	59.4 ^b	84.7 ^{ab}	100.8 ^a	95.1 ^a	72.4 ^{ab}	9.7	0.0375

42 天							
乙酸	56.7	78.1	71.2	60.8	62.0	6.8	0.1295
丙酸	19.0	22.4	22.9	22.3	22.2	3.0	0.8863
丁酸	13.2	15.9	14.1	13.0	11.6	1.5	0.3084
总 SCFA	88.9	116.4	108.2	96.1	95.8	10.0	0.2494

单位: mM

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P < 0.05$)

3.3 免疫功能

由表 3-5 可看出, 添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡血清中 IgA、IgG、IL-6 和 TNF- α 含量无显著影响 ($P > 0.05$), 但对 IgM 和 IL-1 β 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡的血清中 IgM 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 与抗生素组差异不显著 ($P > 0.05$); 添加丁酸梭菌高剂量组 21 天肉鸡血清中 IL-1 β 含量显著低于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 ($P < 0.05$), 与丁酸梭菌中剂量组差异不显著 ($P > 0.05$)。

添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡血清中 IgA、IgG、IL-1 β 和 TNF- α 含量无显著影响 ($P > 0.05$), 但对 IgM 和 IL-6 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡血清中 IgM 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 与抗生素组差异不显著 ($P > 0.05$); 抗生素组 42 天肉鸡血清中 IL-6 含量显著低于丁酸梭菌低剂量组和中剂量组 ($P < 0.05$), 与对照组和丁酸梭菌高剂量组差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3-5 丁酸梭菌对肉鸡免疫功能的影响

Table 3-5 Effect of *C. butyricum* on immune function in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
21 天							
IgA (ng/ml)	83.5	75.0	72.2	76.3	72.3	3.3	0.1157
IgG (ng/ml)	396	425	424	410	431	15	0.4476
IgM (ug/ml)	29.7 ^b	33.6 ^a	36.4 ^a	36.5 ^a	33.5 ^a	1.4	0.0068
IL-1 β (pg/ml)	1803 ^a	1696 ^a	1670 ^{ab}	1497 ^b	1686 ^a	65	0.0441
IL-6 (pg/ml)	849	856	884	823	844	40	0.8742
TNF- α (ng/ml)	257	264	251	260	269	8	0.6301
42 天							
IgA (ng/ml)	83.9	82.8	82.5	86.5	79.3	3.2	0.5737
IgG (ng/ml)	399	430	438	437	422	13	0.2110

IgM (ug/ml)	28.2 ^b	32.0 ^a	35.3 ^a	34.8 ^a	31.4 ^{ab}	1.2	0.0068
IL-1 β (pg/ml)	1747	1611	1597	1727	1697	55	0.2227
IL-6 (pg/ml)	805 ^{ab}	835 ^a	840 ^a	789 ^{ab}	738 ^b	21	0.0190
TNF- α (ng/ml)	250	258	245	252	260	8	0.6887

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P < 0.05$)

3.4 抗氧化能力

3.4.1 丁酸梭菌对 21 天肉鸡抗氧化能力的影响

丁酸梭菌对 21 天肉鸡肠道黏膜抗氧化能力的影响

由表 3-6 可看出, 添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡十二指肠黏膜 SOD 和 GPX 活力没有显著影响 ($P > 0.05$), 但对 GST 活力、GSH 和 MDA 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡十二指肠黏膜的 GST 活力和 GSH 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 添加丁酸梭菌高剂量组肉鸡的十二指肠黏膜 MDA 含量显著低于对照组和丁酸梭菌低剂量组 ($P < 0.05$), 与丁酸梭菌中剂量组和抗生素组差异不显著 ($P > 0.05$)。

添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡空肠黏膜 SOD 和 GPX 活力以及 MDA 含量没有显著影响 ($P > 0.05$), 但对 GST 活力和 GSH 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。抗生素组肉鸡空肠黏膜 GST 活力显著高于对照组、丁酸梭菌低剂量组和高剂量组 ($P < 0.05$), 与丁酸梭菌中剂量组差异不显著 ($P > 0.05$); 添加丁酸梭菌低剂量和中剂量组肉鸡空肠黏膜的 GSH 显著高于抗生素组 ($P < 0.05$)。

添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡回肠黏膜 GPX 活力没有显著影响 ($P > 0.05$), 但对 SOD 活力、GST 活力、GSH 和 MDA 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。添加丁酸梭菌高剂量组 21 天肉鸡回肠黏膜 SOD 活力显著高于其余各组 ($P < 0.05$); 添加丁酸梭菌高剂量组肉鸡回肠黏膜的 GST 活力显著高于对照组和丁酸梭菌低剂量组 ($P < 0.05$), 与丁酸梭菌中剂量组和抗生素组差异不显著 ($P > 0.05$); 添加丁酸梭菌中剂量组的回肠黏膜 GSH 含量显著高于其余各组 ($P < 0.05$); 添加丁酸梭菌中剂量组、高剂量组和抗生素组的 MDA 含量显著低于对照组和丁酸梭菌低剂量组 ($P < 0.05$)。

表 3-6 丁酸梭菌对 21 日龄肉鸡肠黏膜抗氧化能力的影响

Table 3-6 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of intestinal mucosa in broilers at 21 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
十二指肠黏膜							
SOD	73.5	84.4	86.0	79.4	72.8	4.4	0.0962
GST	29.0 ^c	36.3 ^{ab}	36.6 ^{ab}	38.3 ^a	33.2 ^{bc}	1.6	0.0016
GPX	1.26	1.42	1.64	1.37	1.28	0.19	0.7543

GSH	27.7 ^b	45.3 ^a	48.4 ^a	42.3 ^a	43.0 ^a	2.8	<0.0001
MDA	5.69 ^a	5.06 ^a	3.65 ^{ab}	2.90 ^b	4.05 ^{ab}	0.66	0.0349
空肠黏膜							
SOD	79.0	81.3	77.6	79.1	79.1	2.2	0.8669
GST	31.2 ^b	33.2 ^b	35.1 ^{ab}	32.0 ^b	38.8 ^a	1.8	0.0374
GPX	5.09	4.71	4.90	3.87	4.69	0.34	0.1337
GSH	22.7 ^{ab}	24.6 ^{ab}	23.1 ^a	18.5 ^{bc}	17.3 ^c	1.6	0.0038
MDA	2.96	2.76	3.44	2.31	3.32	0.32	0.1312
回肠黏膜							
SOD	72.6 ^{bc}	67.2 ^c	74.8 ^b	84.6 ^a	67.8 ^{bc}	2.7	0.0006
GST	30.2 ^{bc}	26.7 ^c	34.8 ^{ab}	40.9 ^a	38.8 ^a	2.1	0.0003
GPX	4.84	4.19	4.48	4.05	3.95	0.25	0.1122
GSH	19.4 ^b	17.9 ^b	22.8 ^a	17.7 ^b	17.1 ^b	0.8	0.0003
MDA	12.4 ^a	10.9 ^a	5.5 ^b	5.4 ^b	7.0 ^b	0.8	<0.0001

单位: SOD、GST 和 GPX: U/mg protein, GSH: $\mu\text{mol/g}$ protein, MDA: nmol/mg protein

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

丁酸梭菌对 21 天肉鸡血清抗氧化能力的影响

由表 3-7 可看出, 添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡血清 SOD 活力、GPX 活力和 GSH 含量没有显著影响 ($P>0.05$), 但对 GST 活力和 MDA 含量有显著影响 ($P<0.05$)。丁酸梭菌低剂量组、高剂量组和抗生素组血清 GST 活力显著高于对照组 ($P<0.05$); 丁酸梭菌高剂量组血清 MDA 含量显著低于抗生素组 ($P<0.05$)。

表 3-7 丁酸梭菌对 21 日龄肉鸡血清抗氧化能力的影响

Table 3-7 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of serum in broilers at 21 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
SOD	78.2	89.1	90.1	92.8	99.5	7.5	0.3538
GST	20.9 ^b	24.5 ^a	23.2 ^{ab}	26.4 ^a	25.8 ^a	1.2	0.0178
GPX	1380	1254	1219	1319	1247	101	0.7834
GSH	25.6	27.6	34.6	26.7	25.7	4.1	0.4450
MDA	3.54 ^{ab}	3.43 ^{ab}	3.31 ^{ab}	2.95 ^b	3.87 ^a	0.20	0.0385

单位: SOD 和 GST: U/mL, GPX: U, GSH: $\mu\text{mol/L}$, MDA: nmol/mL

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

丁酸梭菌对 21 天肉鸡肝脏抗氧化能力的影响

由表 3-8 可知, 添加丁酸梭菌对 21 天肉鸡肝脏 SOD、GST 和 GPX 活力以及 GSH 和 MDA 含量均没有显著影响 ($P>0.05$)。

表 3-8 丁酸梭菌对 21 日龄肉鸡肝脏抗氧化能力的影响

Table 3-8 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of liver in broilers at 21 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
SOD	214	207	200	201	191	10	0.5004
GST	67.0	57.3	55.3	60.5	88.4	4.0	0.4671
GPX	8.28	7.83	8.16	7.34	6.74	0.39	0.0728
GSH	13.7	11.2	13.1	11.6	11.0	1.05	0.3271
MDA	1.05	0.92	0.93	1.00	1.15	0.06	0.1184

单位: SOD、GST 和 GPX: U/mg protein, GSH: $\mu\text{mol/g protein}$, MDA: nmol/mg protein

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.4.2 丁酸梭菌对 42 天肉鸡抗氧化能力的影响

丁酸梭菌对 42 天肉鸡肠道黏膜抗氧化能力的影响

由表 3-9 可看出, 添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡十二指肠黏膜 GSH 含量有显著影响 ($P<0.05$)。添加丁酸梭菌中剂量组和高剂量组以及抗生素组 GSH 含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。但添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡十二指肠黏膜 SOD、GST 和 GPX 活力以及 MDA 含量没有显著影响 ($P>0.05$)。

添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡空肠黏膜 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量有显著影响 ($P<0.05$)，但对 GST 和 GPX 活力没有显著影响 ($P>0.05$)。添加丁酸梭菌高剂量组的 SOD 活力显著高于其余各组 ($P<0.05$)；添加丁酸梭菌各组 GSH 含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，添加丁酸梭菌高剂量 GSH 含量显著高于抗生素组 ($P<0.05$)；添加丁酸梭菌各组 MDA 含量显著低于对照组 ($P<0.05$)，与抗生素组差异不显著 ($P>0.05$)。

添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡回肠黏膜 SOD、GST 和 GPX 活力以及 GSH 和 MDA 含量均没有显著影响 ($P>0.05$)。

表 3-9 丁酸梭菌对肉鸡 42 天肠黏膜抗氧化能力的影响

Table 3-9 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of intestinal mucosa in broilers at 42 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
十二指肠黏膜							
SOD	80.7	77.3	77.1	79.8	74.3	2.7	0.4998
GST	31.5	29.9	24.9	25.7	27.2	2.0	0.2016

GPX	2.22	2.14	2.28	2.36	2.34	0.34	0.9857
GSH	19.3 ^c	20.4 ^{bc}	30.1 ^a	26.3 ^{ab}	26.9 ^a	2.1	0.0094
MDA	0.90	0.78	0.83	0.77	0.80	0.09	0.8455
空肠黏膜							
SOD	80.3 ^b	77.2 ^b	81.6 ^b	87.9 ^a	79.3 ^b	1.6	0.0010
GST	29.9	29.6	30.0	32.2	30.1	1.5	0.7997
GPX	2.97	2.73	3.44	3.40	2.97	0.30	0.3923
GSH	15.0 ^c	20.7 ^{ab}	22.3 ^{ab}	24.3 ^a	19.9 ^b	1.3	0.0005
MDA	0.98 ^a	0.82 ^b	0.62 ^c	0.62 ^c	0.70 ^{bc}	0.06	0.0003
回肠黏膜							
SOD	80.1	81.6	79.9	79.7	77.1	3.4	0.9145
GST	29.0	29.6	27.1	30.3	33.4	1.4	0.0782
GPX	3.04	3.41	3.02	4.05	3.74	0.64	0.7625
GSH	16.1	17.6	15.1	17.4	15.6	1.5	0.7070
MDA	0.62	0.63	0.67	0.73	0.77	0.06	0.4577

单位: SOD、GST 和 GPX: U/mg protein, GSH: $\mu\text{mol/g}$ protein, MDA: nmol/mg protein

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

丁酸梭菌对 42 天肉鸡血清抗氧化能力的影响

由表 3-10 可看出, 添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡血清 SOD、GST 和 GPX 活力没有显著影响 ($P>0.05$), 但对 GSH 含量和 MDA 含量有显著影响 ($P<0.05$)。添加丁酸梭菌中剂量组 GSH 含量显著高于对照组和抗生素组 ($P<0.05$); 对照组、丁酸梭菌低剂量和中剂量组的 MDA 含量显著低于抗生素组 ($P<0.05$)。

表 3-10 丁酸梭菌对 42 日龄肉鸡血清抗氧化能力的影响

Table 3-10 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of serum in broilers at 42 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
SOD	118	110	128	113	107	9	0.5090
GST	22.9	22.7	22.4	21.5	19.8	0.8	0.0680
GPX	785	797	786	867	890	46	0.4621
GSH	29.9 ^{bc}	32.5 ^{ab}	38.0 ^a	24.6 ^{cd}	22.1 ^d	2.7	0.0016
MDA	2.36 ^{bc}	2.37 ^{bc}	2.24 ^c	2.80 ^{ab}	2.87 ^a	0.16	0.0282

单位: SOD 和 GST: U/mL, GPX: U, GSH: $\mu\text{mol/L}$, MDA: nmol/mL

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

丁酸梭菌对 42 天肉鸡肝脏抗氧化能力的影响

由表 3-11 可看出，添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡肝脏 SOD 活力和 MDA 含量有显著影响 ($P<0.05$)，但对 GST 和 GPX 活力以及 GSH 含量没有显著影响 ($P>0.05$)。添加丁酸梭菌中剂量组 SOD 活力显著高于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 ($P<0.05$)，与丁酸梭菌高剂量组差异不显著 ($P>0.05$)；添加丁酸梭菌中剂量组的 MDA 含量显著低于对照组和抗生素组 ($P<0.05$)。

表 3-11 丁酸梭菌对 42 日龄肉鸡肝脏抗氧化能力的影响

Table 3-11 Effect of *C. butyricum* on antioxidation of liver in broilers at 42 d of age

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
SOD	195 ^c	212 ^{bc}	240 ^a	226 ^{ab}	210 ^{bc}	6	0.0002
GST	59.0	52.8	52.4	60.7	53.1	3.9	0.4546
GPX	8.49	9.45	9.19	8.67	9.26	0.36	0.2836
GSH	10.09	9.39	10.32	9.39	9.36	0.50	0.5412
MDA	1.02 ^a	0.88 ^{bc}	0.82 ^c	0.86 ^{bc}	0.93 ^{ab}	0.03	0.0014

单位：SOD、GST 和 GPX：U/mg protein，GSH：μmol/g protein，MDA：nmol/mg protein

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

3.5 肉品质

3.5.1 胴体性状

结果列于表 3-12。由表 3-12 可以看出，添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡屠宰率、全净膛率和腿肌率没有显著影响 ($P>0.05$)，但对腹脂率和胸肌率有显著影响 ($P<0.05$)。添加丁酸梭菌各组肉鸡的腹脂率显著低于抗生素组 ($P<0.05$)，添加丁酸梭菌低剂量组和高剂量组肉鸡的腹脂率显著低于对照组 ($P<0.05$)；添加丁酸梭菌高剂量组肉鸡的胸肌率显著高于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 ($P<0.05$)。

表 3-12 丁酸梭菌对肉鸡胴体性状的影响

Table 3-12 Effect of *C. butyricum* on carcass traits in broilers

项目 (单位%)	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
屠宰率	90.5	89.3	90.0	89.7	88.8	0.4	0.0764
腹脂率	1.50 ^{ab}	1.23 ^c	1.30 ^{bc}	1.27 ^c	1.57 ^a	0.08	0.0339

全净膛率	71.2	71.5	71.8	72.1	72.0	0.6	0.8087
胸肌率	26.8 ^b	27.8 ^b	28.0 ^{ab}	29.9 ^a	27.5 ^b	0.7	0.0367
腿肌率	22.5	22.0	21.8	22.3	21.2	0.5	0.4417

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P < 0.05$)

3.5.2 肌肉品质

由表 3-13 可知,添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡胸肌黄度(b^*)和 pH_{45min} 有显著影响 ($P < 0.05$),但对胸肌亮度 (L^*)、红度 (a^*)、 pH_{24h} 、失水率、剪切力和肌内脂肪含量无显著影响 ($P > 0.05$)。丁酸梭菌低剂量组和中剂量组肉鸡胸肌 b^* 值显著低于抗生素组 ($P < 0.05$),与对照组和丁酸梭菌高剂量组差异不显著 ($P > 0.05$);丁酸梭菌低剂量和抗生素组的胸肌 pH_{45min} 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡腿肌 pH_{45min} 有显著影响 ($P < 0.05$),但对 L^* 、 a^* 、 b^* 、 pH_{24h} 和肌内脂肪含量无显著影响 ($P > 0.05$)。丁酸梭菌低剂量、中剂量组和抗生素组的腿肌 pH_{45min} 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3-13 丁酸梭菌对肉鸡肌肉品质的影响

Table 3-13 Effect of *C. butyricum* on meat quality in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
胸肌							
亮度 (L^*)	56.8	54.0	57.5	59.4	55.3	1.6	0.1562
红度 (a^*)	11.1	11.1	10.6	10.0	10.4	0.7	0.7995
黄度 (b^*)	12.2 ^{ab}	11.1 ^b	11.1 ^b	12.8 ^{ab}	13.9 ^a	0.7	0.0240
pH_{45min}	6.19 ^b	6.49 ^a	6.12 ^b	6.27 ^{ab}	6.48 ^a	0.09	0.0119
pH_{24h}	5.98	5.96	6.04	6.06	6.01	0.03	0.2033
失水率 (%)	30.4	28.8	29.6	31.1	33.0	1.2	0.1479
剪切力 (N)	28.2	25.7	23.8	23.9	27.1	2.7	0.7779
肌内脂肪 (%)	1.35	1.40	1.54	1.43	1.45	0.14	0.2544
腿肌							
亮度 (L^*)	59.3	58.6	60.2	58.2	58.0	1.3	0.7344

红度 (a*)	14.0	14.5	12.4	13.1	13.0	0.6	0.1742
黄度 (b*)	10.3	9.8	9.7	12.0	12.9	1.0	0.1027
pH _{45min}	6.41 ^c	6.60 ^a	6.53 ^{ab}	6.45 ^{bc}	6.55 ^{ab}	0.04	0.0049
pH _{24h}	6.58	6.69	6.67	6.61	6.78	0.08	0.3774
肌肉脂肪 (%)	4.29	4.20	4.33	4.37	4.25	0.18	0.9022

pH_{45min} (屠宰后 45 min), pH_{24h} (屠宰后 24 h, 放 4℃)

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 (P<0.05)

3.5.3 脂肪酸含量

丁酸梭菌对 42 天肉鸡胸肌脂肪酸含量的影响

由表 3-14 可看出, 添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡胸肌一些脂肪酸含量有显著影响 (P<0.05)。丁酸梭菌对胸肌 SFA C8:0 和 C18:0 有显著影响 (P<0.05), 但对于其它 SFA 和总 SFA 没有显著影响 (P>0.05)。添加丁酸梭菌各组 and 抗生素组肉鸡胸肌 C8:0 含量显著低于对照组 (P<0.05); 丁酸梭菌中剂量组肉鸡胸肌 C18:0 含量显著高于对照组、丁酸梭菌低剂量组和抗生素组 (P<0.05)。丁酸梭菌对 MUFA C20:1n-9 有显著影响 (P<0.05), 但对于其它 MUFA 和总 MUFA 没有显著影响 (P>0.05)。添加丁酸梭菌低剂量组和中剂量组肉鸡胸肌 C20:1n-9 含量显著高于对照组 (P<0.05)。添加丁酸梭菌对 PUFA C20:2n-6、C20:3n-6、C20:3n-3、C20:4n-6 (ARA)、C20:5n-3 (EPA)、C22:6n-3 (DHA) 和总 PUFA 的含量有显著影响 (P<0.05)。丁酸梭菌中剂量组肉鸡胸肌 ARA 含量显著高于其余各组 (P<0.05), 丁酸梭菌中剂量和高剂量组肉鸡胸肌 ARA 含量显著高于对照组 (P<0.05); 丁酸梭菌中剂量组肉鸡胸肌 EPA 含量显著高于对照组和抗生素组 (P<0.05); 丁酸梭菌各组肉鸡胸肌 DHA 含量显著高于对照组 (P<0.05), 与抗生素组差异不显著 (P>0.05); 丁酸梭菌中剂量组和高剂量组的总 PUFA 含量显著高于对照组 (P<0.05)。添加丁酸梭菌各组肉鸡胸肌 PUFA/SFA 比率 (P<0.05) 显著高于对照组 (P<0.05), 其中丁酸梭菌中剂量组的 PUFA/SFA 比率显著高于其余各组 (P<0.05)。

表 3-14 丁酸梭菌对肉鸡胸肌脂肪酸含量的影响

Table 3-14 Effect *C. butyricum* on fatty acid contents of breast meat in broilers

胸肌长链脂肪酸 (mg/g)	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
C8:0	0.188 ^a	0.113 ^b	0.111 ^b	0.125 ^b	0.125 ^b	0.013	0.0019
C14:0	0.155	0.157	0.165	0.189	0.168	0.018	0.6914
C15:0	0.020	0.027	0.016	0.034	0.018	0.006	0.2711

C16:0	8.18	9.03	10.68	9.34	9.31	0.85	0.3929
C17:0	0.041	0.049	0.048	0.065	0.041	0.006	0.0649
C18:0	3.66 ^b	4.29 ^b	5.39 ^a	4.47 ^{ab}	4.31 ^b	0.32	0.0166
C20:0	0.064	0.132	0.106	0.085	0.083	0.020	0.2094
ΣSFA	12.31	13.80	16.52	14.31	14.06	1.17	0.2048
C14:1	0.017	0.016	0.004	0.016	0.015	0.007	0.6861
C16:1	1.09	1.05	1.22	1.03	1.07	0.17	0.9427
C18:1 _t	0.169	0.166	0.209	0.210	0.163	0.020	0.2673
C18:1 _c	9.01	10.50	13.31	11.39	10.76	1.35	0.3024
C20:1 _{n-9}	0.112 ^c	0.190 ^{ab}	0.209 ^a	0.152 ^{abc}	0.145 ^{bc}	0.021	0.0277
C22:1 _{n-9}	0.018	0.051	0.042	0.043	0.047	0.009	0.1230
ΣMUFA	10.42	11.97	14.99	12.84	12.20	1.54	0.3710
C18:2 _{t-9,t-12}	0.008	0.032	0.020	0.016	0.006	0.007	0.0917
C18:2 _c	7.94	9.81	12.77	10.69	10.64	1.05	0.0552
C18:3 _{n-6}	0.022	0.031	0.013	0.023	0.021	0.006	0.3856
C18:3 _{n-3}	0.456	0.606	0.769	0.676	0.693	0.089	0.1965
C20:2 _{n-6}	0.233 ^b	0.374 ^a	0.424 ^a	0.327 ^{ab}	0.341 ^a	0.036	0.0106
C20:3 _{n-6}	0.070 ^c	0.130 ^b	0.195 ^a	0.110 ^b	0.100 ^{bc}	0.011	<.0001
C20:3 _{n-3}	0.415 ^c	0.573 ^b	0.725 ^a	0.512 ^{bc}	0.540 ^{bc}	0.048	0.0016
C20:4 _{n-6}	1.20 ^c	1.80 ^{bc}	3.35 ^a	2.24 ^b	2.22 ^b	0.21	<.0001
C20:5 _{n-3}	0.100 ^c	0.143 ^{ab}	0.181 ^a	0.123 ^{bc}	0.123 ^{bc}	0.014	0.0047
C22:6 _{n-3}	0.201 ^b	0.341 ^a	0.366 ^a	0.301 ^a	0.293 ^a	0.026	0.0010
ΣPUFA	10.60 ^c	13.86 ^{bc}	18.04 ^a	15.67 ^{ab}	14.98 ^{ab}	1.37	0.0103
PUFA/SFA	0.86 ^d	1.00 ^c	1.13 ^a	1.06 ^{bc}	1.07 ^b	0.02	<.0001

c = cis (顺式); t = trans (反式)

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 (P<0.05)

丁酸梭菌对肉鸡 42 天腿肌脂肪酸含量的影响

由表 3-15 可看出, 添加丁酸梭菌对 42 天肉鸡腿肌一些脂肪酸含量有显著影响 (P<0.05)。丁酸梭菌对肉鸡腿肌所有 SFA 和 MPFA 均没有显著影响 (P>0.05)。丁酸梭菌对肉鸡腿肌 PUFA C18:2_{t-9,t-12}、C20:3_{n-6}、C20:3_{n-3} 和 C20:5_{n-3} (EPA) 的含量有显著影响 (P<0.05)。对照组和

添加丁酸梭菌各组肉鸡腿肌 C18:2*t*-9,*t*-12、C20:3*n*-6 含量显著高于抗生素组 ($P<0.05$)。对照组、丁酸梭菌低剂量和中剂量组肉鸡腿肌 C20:3*n*-3 和 EPA 显著高于抗生素组 ($P<0.05$), 与丁酸梭菌高剂量组差异不显著 ($P>0.05$)。

表 3-15 丁酸梭菌对肉鸡腿肌脂肪酸含量的影响

Table 3-15 Effect *C. butyricum* on fatty acid contents of thigh meat in broilers

腿肌长链脂 肪酸 (mg/g)	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	<i>P</i> 值
C8:0	0.053	0.069	0.058	0.078	0.078	0.008	0.0871
C12:0	0.026	0.014	0.007	0.010	0.018	0.007	0.3037
C14:0	0.317	0.298	0.282	0.277	0.273	0.032	0.8660
C15:0	0.059	0.053	0.053	0.052	0.052	0.006	0.8735
C16:0	14.89	13.97	14.00	12.74	12.36	1.49	0.7518
C17:0	0.118	0.137	0.101	0.169	0.087	0.032	0.4256
C18:0	7.02	6.43	6.96	6.53	5.80	0.46	0.3515
C20:0	0.129	0.116	0.140	0.109	0.104	0.018	0.5969
C21:0	0.262	0.254	0.427	0.099	0.000	0.112	0.0937
ΣSFA	22.87	21.34	22.03	20.07	18.77	2.00	0.6260
C14:1	0.051	0.051	0.050	0.036	0.040	0.013	0.8877
C16:1	2.43	2.20	2.17	1.77	1.87	0.36	0.7030
C17:1	0.027	0.025	0.022	0.017	0.007	0.005	0.1083
C18:1 <i>t</i>	0.230	0.200	0.223	0.194	0.321	0.045	0.2993
C18:1 <i>c</i>	18.68	16.47	17.49	15.79	14.96	2.40	0.8291
C20:1 <i>n</i> -9	0.233	0.200	0.264	0.250	0.173	0.027	0.1286
C22:1 <i>n</i> -9	0.034	0.041	0.045	0.045	0.033	0.007	0.5814
ΣMUFA	21.68	19.18	20.27	18.10	17.40	2.80	0.8268
C18:2 <i>t</i> -9, <i>t</i> -12	0.035 ^a	0.033 ^a	0.046 ^a	0.038 ^a	0.010 ^b	0.006	0.0034
C18:2 <i>c</i>	16.41	15.85	17.28	15.76	14.99	1.81	0.9246
C18:3 <i>n</i> -6	0.057	0.043	0.073	0.046	0.041	0.011	0.2616
C18:3 <i>n</i> -3	0.990	0.993	1.078	0.960	0.982	0.153	0.9857
C20:2 <i>n</i> -6	0.358	0.380	0.373	0.362	0.287	0.041	0.5251
C20:3 <i>n</i> -6	0.131 ^b	0.140 ^{ab}	0.151 ^{ab}	0.157 ^a	0.101 ^c	0.008	0.0003

C20:3n-3	0.592 ^a	0.574 ^a	0.636 ^a	0.561 ^{ab}	0.463 ^b	0.036	0.0248
C20:4n-6	2.25	2.09	2.36	2.24	1.97	0.14	0.3483
C20:5n-3	0.128 ^a	0.122 ^a	0.136 ^a	0.115 ^{ab}	0.093 ^b	0.009	0.0327
C22:6n-3	0.366	0.385	0.390	0.377	0.302	0.032	0.3040
ΣPUFA	21.32	20.61	22.53	20.61	19.24	2.13	0.8650
PUFA/SFA	0.93	0.97	1.02	1.01	1.03	0.03	0.1599

c = cis (顺式); t = trans (反式)

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 (P<0.05)

3.5.4 血脂含量

由表 3-16 可看出, 添加丁酸梭菌对 21 天和 42 天肉鸡血清胆固醇含量和 21 天血清高密度脂蛋白胆固醇含量有显著影响 (P<0.05), 但对 21 天血清甘油三酯、低密脂蛋白胆固醇含量以及 42 天血清甘油三酯、低密脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇含量没有显著影响 (P>0.05)。丁酸梭菌中剂量组肉鸡 21 天血清胆固醇含量显著低于对照组和抗生素组 (P<0.05); 丁酸梭菌中剂量组 21 天肉鸡血清高密度脂蛋白含量显著低于对照组和丁酸梭菌低剂量组 (P<0.05); 添加丁酸梭菌各组 42 天肉鸡血清胆固醇含量显著低于对照组 (P<0.05), 与抗生素组差异不显著 (P>0.05)。

表 3-16 丁酸梭菌对肉鸡血脂含量的影响

Table 3-16 Effect *C. butyricum* on serum lipid in broilers

项目	对照组	低剂量菌组	中剂量菌组	高剂量菌组	抗生素组	集合标准误	P 值
21 天							
CHOL	3.78 ^a	3.51 ^{abc}	3.25 ^c	3.42 ^{bc}	3.65 ^{ab}	0.10	0.0111
TG	0.74	0.72	0.75	0.68	0.67	0.03	0.4359
HDLC	2.35 ^a	2.28 ^{ab}	2.05 ^c	2.10 ^{bc}	2.23 ^{abc}	0.07	0.0233
LDLC	1.27	1.24	1.23	1.20	1.27	0.05	0.8976
42 天							
CHOL	3.37 ^a	3.05 ^b	2.96 ^b	2.90 ^b	3.09 ^{ab}	0.1	0.0287
TG	0.41	0.37	0.30	0.32	0.36	0.03	0.1437
HDLC	2.06	1.93	1.81	1.88	2.02	0.07	0.1216
LDLC	1.06	1.01	0.98	1.04	1.05	0.06	0.8519

单位: mM

CHOL: 总胆固醇, TG: 甘油三酯, HDLC: 高密度脂蛋白胆固醇, LDLC: 低密度脂蛋白胆固醇

同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 (P<0.05)

4 讨论

4.1 生长性能

近些年, 很多研究已表明益生菌可提高鸡的生长性能并改善营养物质的利用率^[66, 113, 114]。Yang 等 (2012)^[44]和 Zhang 等 (2014)^[48]发现添加丁酸梭菌可显著提高肉鸡平均日增重, 添加丁酸梭菌组肉鸡的平均日增重与抗生素组差异不显著。Zhao 等 (2013)^[66]研究结果显示, 日粮中添加丁酸梭菌可以提高肉鸡的生产性能, 丁酸梭菌组肉鸡有更高的平均日采食量和平均日增重。本研究发现了类似的结果, 与对照组相比, 饲料添加丁酸梭菌显著提高了肉鸡的平均日增重, 而且丁酸梭菌供应组与抗生素组没有显著差异。本研究和上述研究共同表明了饲料中添加丁酸梭菌可改善肉鸡的生长性能并且可以作为抗生素的替代品。但是, 也有研究发现了相反的结果, Zhang 等 (2011)^[115]研究结果发现饲料中添加丁酸梭菌对肉鸡的生长性能没有效果。上述研究的不一致可能是由于试验饲料、鸡品种、生长阶段或是使用的益生菌株等的差异造成的。丁酸梭菌提高生长性能的机制可能是由于其在肠道内改善了肠道的微生态环境, 从而增加了消化酶的活力以及 SCFA 的含量^[66, 116]。

4.2 肠道健康

益生菌在动物机体内发挥作用的一个重要机制就是调节肠道的微生态平衡, 从而影响肠道的消化吸收。丁酸梭菌具有促生长和防治肠道疾病的作用, 常用来防治由多种因素引起的人和动物的腹泻、肠炎等疾病^[52]。本研究发现丁酸梭菌可改善肉鸡十二指肠的形态结构, 提高肉鸡 21 天盲肠食糜乙酸、丁酸和总 SCFA 含量。温美丽 (2011) 研究发现丁酸梭菌可治疗小鼠急性溃疡性结肠炎, 该作用可能由于丁酸梭菌增加了 ITF 的表达, 但却抑制 TNF- α 和 NF- κ B 的表达^[117]。Isono 等 (2007) 研究表明丁酸梭菌培养物的上清 (主要为丁酸) 可下调人结肠上皮细胞 TLR4 mRNA 的表达水平^[55]。Okamoto 等 (2000) 研究发现饲喂丁酸梭菌可增加大鼠盲肠和结肠中乳酸菌的比率, 并能增加盲肠中 SCFA 的含量^[101]。Kamiya 等 (1997) 报道了丁酸梭菌对艰难梭菌引起的小鼠盲肠炎的预防效果非常有效^[118]。

4.3 免疫功能

各种动物模型研究已证明了益生菌有益于机体的免疫功能及免疫反应相关的疾病防治, 益生菌可增强先天免疫或通过 toll 样受体调节信号转导途径调控病原体诱导的炎症反应^[119]。众所周知, 免疫球蛋白因其在免疫功能中的重要作用通常被用来评价机体的免疫状态。一些研究发现添加丁酸梭菌可提高小鼠、肉鸡和细胞的 IgA, IgG 和 IgM 含量^[43-45]。丁酸梭菌还可提高小肠黏膜 IgA 的含量, 抑制微生物的附着, 提高动物机体自身的免疫功能^[46]。傅思武等 (2000) 的研究发现, 丁酸梭菌-婴儿型双歧杆菌二联活菌制剂可以提高小鼠体液免疫能力^[47]。Yang 等 (2012) 研究表明日粮中添加丁酸梭菌可提高肉鸡血清中 IgA, IgG 和 IgM 的含量^[44]。Zhang 等 (2014) 研究了丁酸梭菌对大肠杆菌 K88 感染肉鸡免疫功能的影响, 发现丁酸梭菌可以提高

血清 IgA、IgM、IgY、补体成分 C3 和 C4 以及肠黏膜 IgA 的含量^[48]。本研究发现饲料中添加丁酸梭菌可提高肉鸡血清中 IgM 的含量,本研究与上述研究共同表明了丁酸梭菌有益于机体的免疫功能。

4.4 抗氧化能力

近些年来,越来越多的研究发现益生菌具有抗氧化的功能,一些研究发现益生菌自身能产生 GSH、SOD 和 TrxR 等抗氧化酶或非酶抗氧化剂,通过改善肠道内环境或产生代谢产物调节氧化还原电位而清除自由基和抗脂质过氧化,降低氧化应激,如乳酸菌和双歧杆菌等^[26, 27, 32, 33]。然而,目前关于益生菌抗氧化作用的机理还不清楚,可能是由于微生物细胞内的抗氧化成分、氧化还原调控系统或其有益的代谢产物所起的作用。目前很少有关于丁酸梭菌对肉鸡抗氧化能力的研究报告。丁酸梭菌可以产生 SOD 和 NADH 氧化酶,还可发酵葡萄糖和纤维素等碳水化合物产生丁酸和氢气,已有研究表明这些有益物质可通过增加抗氧化酶的活力和降低 ROS 代谢物而调节氧化应激^[4, 5, 96]。Zhang 等(2011)的研究发现丁酸钠可缓解皮质酮诱导肉鸡产生的氧化应激,丁酸钠显著增加胸肌中过氧化氢酶(CAT)的活性并降低 MDA 的含量^[97]。Hamer 等(2009)发现丁酸处理可显著增加健康人结肠黏膜 GSH 的含量并降低尿酸的含量,可改善人结肠黏膜的抗氧化能力^[4]。Ohsawa 等(2007)的研究首次发现了氢气可作为抗氧化剂选择性的清除机体和细胞中的羟自由基^[5]。因此,丁酸梭菌的抗氧化作用可能部分是由于其代谢物丁酸和氢气的抗氧化作用。而且,一些研究表明益生菌的抗氧化作用可能是由于益生菌可刺激免疫系统从而降低炎症反应,或通过抑制肠道病原菌降低炎症反应以及与炎症反应相关的氧化应激^[27, 33]。但是,丁酸梭菌降低氧化应激反应的确切机制还需要进一步研究。

4.5 肉品质

影响肉鸡肉品质的因素很多,主要包括品种、日龄、日粮、饲养环境、屠宰方式、胴体贮存条件和烹饪方法等,这些因素对鸡肉品质和风味都有不同程度的影响^[72, 78]。当前家禽的饲养主要采用集约化的养殖方式,使用的品种较为单一,肉品中营养素的含量取决于日粮中营养物质的水平。

产肉性状受活体重、腹脂率、全净膛率、胸肌率和腿肌率的影响。一些研究发现益生菌对胴体性能和肉品质有一定的影响。Suo 等(2012)发现植物乳杆菌 ZJ316 可改善猪肉的品质,乳酸菌处理组的 pH_{45min}、剪切力、黏性、咀嚼性、黏性和恢复力都有所提高^[120]。Endo 和 Nakano(1999)报道了饲料中添加益生菌(芽孢杆菌,乳酸菌,链球菌,梭菌,酵母菌和假丝酵母)改善了肉鸡的胴体性能和肉质^[87]。李菊等(2007)的研究发现,饲料中添加 0.5% 乳酸菌发酵液显著提高了胸肌率、肉色、脂肪酸含量(C16:1 和 C20:3)、肌苷酸和风味氨基酸含量^[121]。本研究发现添加丁酸梭菌显著影响了胸肌率、腹脂率、pH_{45min} 和 b* 值。添加丁酸梭菌组肉鸡有更好的肉质组成,更高的胸肌产量和更低的腹脂率,这将有损于肉鸡的产肉性能,能产生更大的经济效益。肉鸡体内沉积过多的腹脂和皮下脂肪,会诱发肉鸡腹水症和猝死症等代谢疾病,对消费者的饮食健康也会产生不利影响,同时还会对养禽业造成巨大浪费。所以研究者在不断地

研究如何增加肉鸡肌肉产量,同时又能减少腹脂和皮下脂肪沉积的方法。关于丁酸梭菌改善肉鸡胴体组成的确切机理还有待进一步研究。但是有研究者发现,益生菌产生的脂肪酶可以把体内多余的脂肪转化为能量而消耗掉,且可抑制脂肪的合成。通过上述途径提高了鸡体内脂肪的转化和利用效率,最终减少了脂肪的沉积,增加了能量的利用率,从而增加肌肉的沉积。张日俊等(2005)在日粮中添加乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌组成的微生态制剂发现,添加益生菌提高了肉鸡血清脂肪酶活性并降低了血清中甘油三酯和总胆固醇含量以及腹脂率^[90]。

本研究发现添加 5×10^8 或 1×10^9 CFU/kg 的丁酸梭菌降低了肉鸡血清胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量。之前的研究者也发现了类似的结果,这些研究表明丁酸梭菌可降低饲喂胆固醇小鼠血液和肝脏的胆固醇水平,并能增加胆酸的排出^[28-30]。此外,一些研究发现乳酸菌或芽孢杆菌可降低肉鸡血清、蛋黄、肝脏和屠体中的胆固醇含量^[88, 89, 122-124]。关于益生菌降低胆固醇的机制目前仍不清楚,但是一些研究发现这种效果可能是由于益生菌可以结合胆固醇到细胞壁上,阻止胆固醇的合成以及通过酶的作用降解胆固醇^[88, 125, 126]。而且,脂肪组织的生长依赖于血清脂类的含量,因为它们是脂类代谢的主要底物^[97],添加丁酸梭菌降低腹脂的效果可能与血清脂类的减少有关,丁酸梭菌可能增强了体内脂类代谢。

4.6 脂肪酸

畜禽产品中脂肪酸的含量和组成很大程度上依赖于日粮中脂肪酸的组成,对于单胃动物家禽这一点更易做到。很多研究发现鸡肉组织中脂肪酸的组成和含量可通过日粮进行调控^[74, 85]。人类营养学家推荐我们应该食用更多的 PUFA,因为 PUFA 具有多种生物学功能,食用适当比例的 PUFA 可预防心脑血管疾病、糖尿病、肝肾功能损害、过敏性疾病以及癌症等^[127, 128]。本研究发现日粮中添加丁酸梭菌可增加肉鸡胸肌和腿肌中一些 PUFA 的含量以及 PUFA/SFA 的比率,特别是一些功能性脂肪酸 ARA、EPA 和 DHA 等。Yang 等(2010)的研究也发现了相似的结果,该研究报道了日粮中添加丁酸梭菌可增加肉鸡胸肌中 ARA 和总 n-3 脂肪酸的含量^[129]。而且,也有研究发现添加其它种类的益生菌(乳酸杆菌和荚膜红细菌)增加了肉鸡肝脏和肌肉中 ARA 和 UFA/SFA 的比率^[123, 130]。本实验室蔡军(2014)的研究发现,芽孢杆菌 LFB112 在添加量为 10^7 CFU/kg 日粮时,对肉鸡肌肉品质和肠道宏基因组层次上的菌群结构呈现明显的优化作用,可改善肉色和肌肉脂肪酸组成等肉品质指标,可增加肌肉中多种 PUFA 的含量^[131]。孙建广等(2010)研究表明,日粮中添加发酵乳酸杆菌可显著提高猪肉中 C18:2、C20:2、C20:4 和总 PUFA 的含量,改善猪肉风味^[86]。上述这些结果将对消费者产生极大的吸引力,因为肉品中更多的 PUFA/SFA 将对人体产生有益的影响,能够有助于预防心脑血管等疾病^[132],同时有助于肉品风味物质的形成。

PUFA 在不同组织的沉积有一定的差异,丁酸梭菌对肉鸡胸肌中各种 PUFA 的影响比腿肌更大,胸肌中有更多的 PUFA 差异显著。蔡军(2014)的研究也发现了类似的现象,芽孢杆菌对胸肌中各种脂肪酸的影响大于对腿肌中脂肪酸的影响^[131]。组织沉积的差异可能是由于在这些组织中脂肪酸的作用不同,或是它们的磷脂组成不同,PUFA 易在磷脂中沉积,胸肌的脂类主要由磷脂组成,而腿肌主要由甘油三酯组成,这个事实可能解释日粮中添加益生菌影响了更多胸肌中的长链 PUFA 的原因^[78, 85]。

目前对于丁酸梭菌调控肌肉 PUFA 组成和含量的确切机制仍然不清楚。但是, 很多研究已经证明了益生菌可通过维持肠道微生态平衡和肠道健康而影响 PUFA 的消化和吸收^[114, 129]。本研究也发现日粮中添加丁酸梭菌可改善十二指肠的形态结构和增加盲肠中 SCFA 的含量, 从而有益于肠道的健康和营养物质的消化吸收, 增加了从肠道消化吸收而沉积到肌肉中的 PUFA 的含量。

最近, 很多研究提出肌肉中增加的 PUFA 含量可能是由于饲料中抗氧化剂的保护效果^[94, 95, 133]。更高水平的抗氧化酶可以降低脂质过氧化的速率, 这就意味着降低了 PUFA 过氧化的降解^[95]。我们的研究结果表明日粮中添加丁酸梭菌可增强肉鸡血清、肝脏和肠道的抗氧化能力, 提高了一些抗氧化酶的活力和非酶抗氧化剂的含量, 并能抑制脂质的氧化 (MDA 含量降低), 因此保护了易于过氧化的 PUFA, 从而使饲料中的 PUFA 能经过肠道的消化吸收, 血液的转运以及肝脏的代谢, 更多的沉积到肉鸡肌肉中。在过去的十来年, 许多研究已经表明益生菌具有缓解氧化应激的作用, 这当中研究得最多的是乳酸菌和双歧杆菌^[26, 27, 32, 33]。但到目前为止, 很少有关于丁酸梭菌抗氧化效果的研究。我们的研究发现丁酸梭菌可以提高小鼠和肉鸡的抗氧化能力。Endo 等 (2013) 的研究支持我们的结果, 该研究发现丁酸梭菌可诱导大鼠核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 及其调控的抗氧化酶的表达并能缓解肝脏的氧化应激^[107]。而且, 丁酸梭菌可产生丁酸和氢气, 很多研究已经发现丁酸可以改善结肠的健康并能提高肠道抗氧化能力^[3, 4, 50]; 近几年的研究揭示了氢气可以通过选择性清除机体中的羟自由基而起到抗氧化的作用, 是一种重要的生理调节因子, 具有抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡和抑制肿瘤的作用^[5, 7]。Zhang 等 (2011) 的研究也证明了日粮中添加丁酸钠可缓解皮质酮诱导的氧化应激并能增加肉鸡胸肌中 ARA 的含量^[97]。所以, 丁酸梭菌的抗氧化效果可能部分是由于其产生的抗氧化酶或代谢产物丁酸和氢气在降低氧化应激方面的作用。而且, 一些研究发现益生菌的抗氧化作用还可能是由于刺激免疫系统降低了炎症反应或增加肠道有益菌的数量而降低致病菌的数量从而降低炎症^[27, 33, 107, 134]。但是, 丁酸梭菌在抗氧化方面作用的确切机理还有待进一步研究。

5 小结

本研究表明添加丁酸梭菌不仅可以提高肉鸡的生长性能, 还可以通过增强肉鸡肠道健康、免疫功能和抗氧化能力而改善肉鸡的肉品质。提高了肉鸡的胸肌率并降低了腹脂率; 增加了肉鸡胸肌和腿肌中一些 PUFA 的含量, 特别是一些功能性脂肪酸的含量, 如 ARA、EPA 和 DHA 等; 降低了肉鸡血清中胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量。

试验四 丁酸对 HCT116 细胞抗氧化能力和存活率的影响

摘要: 丁酸梭菌的主要代谢产物丁酸具有抗氧化和抗癌以及维持肠道健康的作用。然而, 目前关于丁酸缓解氧化应激和抗癌的作用机制尚不明确。细胞内 GSH 氧化还原电位是影响细胞功能(包括增殖、凋亡和死亡, 特别是在线粒体内)的重要因素。本试验研究了丁酸对结直肠癌细胞 HCT116 存活率、线粒体超氧化物和 GSH 氧化还原电位、谷氨酸半胱氨酸连接酶调节亚基(GCLM)和催化亚基(GCLC)及谷胱甘肽还原酶(GSR)的基因表达量、GSR 活力、细胞核组蛋白去乙酰化酶(HDAC)和核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)活力的影响。结果表明相对低含量的丁酸(0.5 mM)显著上调了 GSR 和 GCLM 的表达, 而相对高含量的丁酸(5 mM)显著下调了 GSR 和 GCLM 的表达。此外, 0.5 mM 的丁酸缓解了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤, 而 5 mM 的丁酸加剧了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤和死亡, 这些效果受 Nrf2-抗氧化反应元件(ARE)信号通路的调控。

1 前言

丁酸是 SCFA 的一种, 动物体内丁酸主要来源于胃肠道细菌对膳食纤维的酵解。丁酸梭菌存在于人和动物肠道中, 其主要代谢产物有乙酸和丁酸, 由于丁酸在调节肠道健康和疾病方面具有广泛的作用, 对肠道细胞抗氧化、抗炎和抗癌都有一定的效果, 可通过抑制结直肠癌细胞的增殖和促进细胞凋亡而达到抗癌的效果, 所以在各种 SCFA 中丁酸的研究备受关注^[50, 57, 135-138]。

近年来, 一些研究发现丁酸具有抗氧化的作用。Hamer 等(2009)首次在人体上进行了丁酸的抗氧化试验, 该研究发现丁酸处理可显著增加健康人结肠黏膜 GSH 的含量并降低尿酸的含量, 可改善人结肠黏膜的抗氧化能力^[4]。Liang 等(2013)研究了丁酸钠对严重烧伤诱导的大鼠急性肺损伤的影响, 发现丁酸钠可抑制烧伤后大鼠肺髓过氧化物酶和 MDA 含量的增加, 保护肺损伤^[139]。Orchel 等(2006)发现 1 mM 的丁酸钠可提高结肠癌细胞系 Caco-2 谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 而 10 mM 的丁酸却降低该酶的活性但提高了 SOD 和碱性磷酸酶的活性^[140]。目前, 对于丁酸缓解氧化应激的作用机制仍不清楚。由于丁酸的化学结构, 它不可能作为自由基清除剂而起到抗氧化的效果; 但是, 丁酸可能通过影响酶性和非酶性抗氧化剂以及 DNA 修复系统而起到抗氧化的作用^[50]。

结直肠癌的发病率不管在男性还是女性中都在常见的癌症中排在前三位, 但是结直肠癌也是被认为最可防控的癌症之一^[141, 142]。结肠中的细菌发酵纤维素产生的 SCFA 丁酸具有抗结直肠癌的作用^[143]。而且, 研究已经证明了丁酸是组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的抑制剂, 它可以表观地调节许多基因的表达, 包括细胞增殖和凋亡的基因^[58, 144]。研究发现添加 HDAC 抑制剂后提高了 ROS 自由基的水平, 而自由基清除剂可抑制 HDAC 抑制剂引起的凋亡效果^[145]。还有些研究发现丁酸诱导的结肠癌细胞的死亡与细胞 GSH 含量的降低和随丁酸剂量依赖式增加的 ROS 水平有关^[146-150]。

谷胱甘肽在细胞中以还原态(GSH)和氧化态(GSSG)的形式出现, 是细胞内最重要的非酶性抗氧化剂之一^[151]。由于 GSH 在细胞保护机制中的重要角色, 因此在氧化应激中诱导其

合成和循环的酶扮演着重要的角色，谷氨酸半胱氨酸连接酶（GCL）是合成 GSH 过程中的限速酶，该酶由调节亚基（GCLM）和催化亚基（GCLC）组成；而谷胱甘肽还原酶（GSR）可将氧化的 GSSG 重新还原为 GSH，对维持细胞的氧化还原平衡具有重要的意义，特别是在线粒体中（图 4-1）^[152]。GSH 的耗竭能降低细胞的增殖率和抑制癌细胞的生长，这可能是由于细胞内氧化还原状态和氧化应激防御能力下降造成的^[147]。最近的研究发现核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 可通过影响 GSH 的从头合成和 GSH 的循环(通过 GSR)，从而调节 GSH 的稳态^[153, 154]。然而，关于丁酸如何影响这些过程的研究还非常有限。因此，本研究旨在研究丁酸对 HCT116 细胞 GSH 系统、氧化应激和细胞存活率的影响。

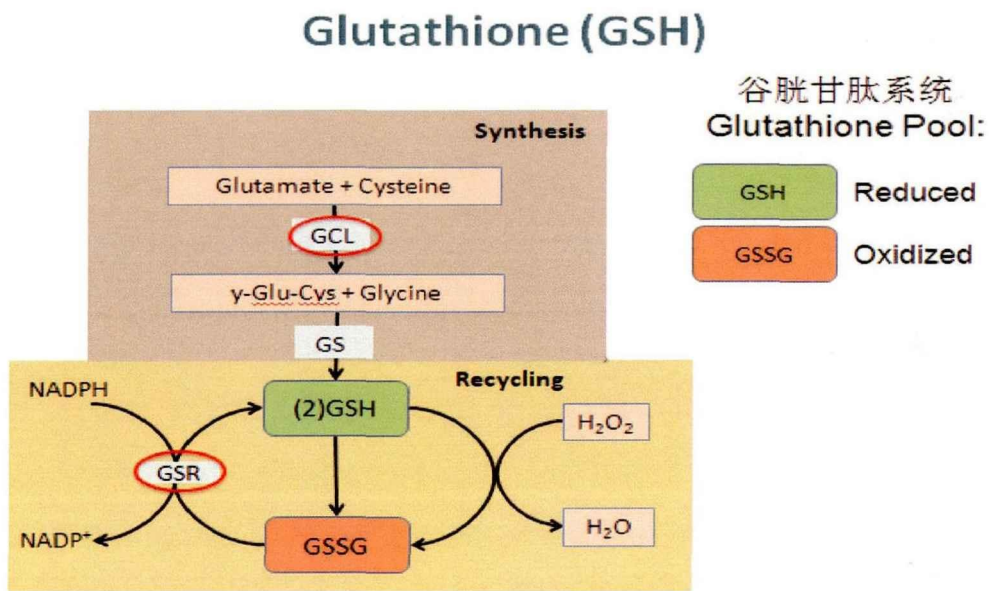


图 4-1 GSH 抗氧化系统

Figure 4-1 GSH antioxidant system

2 材料与方法

2.1 试验材料

人结肠上皮细胞 HCT116 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA, USA)。丁酸钠 (NaB) 和抗霉素 A (AMA) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。

2.2 细胞培养

HCT116 细胞培养在含 10% 胎牛血清和双抗 (50 mg/L 链霉素, 50000 U/L 青霉素) 的 McCoy's 5A 培养基 (伊利诺伊大学, Urbana, IL, USA) 中, 置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞培养时需使用 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS) (Lonza, Walkersville, MD, USA)、Hank's 缓冲液溶液 (HBSS) 和胰蛋白酶 (Mediatech, Manassas, VA, USA)。

2.3 细胞处理

试验通过添加 50 μM AMA 诱导 HCT116 细胞的氧化应激, 分别研究细胞在正常情况和氧化应激情况下不同剂量丁酸钠 (0.5 或 5 mM) 的效果, 共 6 个处理组: 分别为空白对照组、低剂量丁酸钠组 (0.5 mM NaB)、高剂量丁酸钠组 (5 mM NaB)、氧化应激组 (AMA)、氧化应激+低剂量丁酸钠组 (AMA+0.5 mM NaB) 和氧化应激+高剂量丁酸钠组 (AMA+5 mM NaB)。试验时细胞处理时间为 24 h, 每个处理做 3 个重复。处理前需接种适当密度的细胞并换上新鲜的培养基, 培养 48 h 到达一定密度后再对细胞进行处理。

2.4 测定指标

2.4.1 细胞存活率

细胞存活率用 LIVE/DEAD 细胞活性/细胞毒性试剂盒进行测定 (Invitrogen, NY, USA)。HCT116 细胞按上述试验分组处理 24 h, 然后用含 1 μM 溴乙吡啶二聚体 (EthD-1) 和 1 μM 钙黄绿素-AM 的溶液处理 30 min。钙黄绿素-AM 用 485 nm 激发波长, EthD-1 用 530 nm 激发波长。吸收荧光分别在 530 nm (钙黄绿素-AM) 和 645 nm (EthD-1) 波长条件下获得。

2.4.2 线粒体超氧化物

线粒体超氧化物用活细胞 MitoSOX™ 红指示剂进行测定 (Invitrogen)。处理过的细胞在含 5% 胎牛血清和 10 mM 葡萄糖的 DPBS 溶液中 (添加与试验组相同剂量的 AMA 和 NaB 溶液), 置于 37°C、5% CO_2 的培养箱中孵育 30 min, 然后用 DPBS 溶液洗涤 3 次, 用荧光显微镜检测各组细胞线粒体超氧化物的产生情况。

2.4.3 GSH 氧化还原电位

HCT116 细胞培养、转染、荧光筛选和氧化还原基因 (Mito-Grx1-roGFP2 探针) 的表达参照 Kolossov 等的方法进行^[155, 156]。稳定转染了 Grx1-roGFP2 探针的活细胞使用 μ -Slide 8 孔培养板 (Ibidi, Munich, Germany) 培养于不含酚红的 DMEM 培养基中, 按各组试验分组处理 24 h, 然后用 DPBS (含 5% 胎牛血清和 10 mM 葡萄糖) 洗涤细胞两次。参照 Kolossov 等的方法进行细胞的拍照和图片分析^[155, 156]。

2.4.4 实时荧光定量 PCR

细胞总 RNA 采用 RNeasy mini 试剂盒方法进行提取 (Qiagen, Valencia, CA, USA)。探针和引物购自 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), 包括 *GSR* (Hs00167317_m1), *GCLC* (Hs00155249_m1), *GCLM* (Hs00157694_m1) 和 *GUS β* (Hs99999908_m1) 基因。采用 TaqMAN PCR Master Mix (Applied Biosystems) 进行实时荧光定量 PCR 分析, 使用 ABI PRISM 7900 荧

光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行测定。

反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 然后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 重复 40 个循环。在扩增目的基因的同时扩增内参基因 β -葡萄糖醛酸苷酶 (*GUS β*), 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量和倍数改变^[157]。

2.4.5 GSR 活性

采用 HT GSR 分析试剂盒的方法检测 GSR 活性 (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)。

2.4.6 HDAC 和 Nrf2 活性

采用 EpiQuik 细胞核提取试剂盒 (Epigentek, Brooklyn, NY, USA) 进行细胞核提取, 然后分别用组蛋白去乙酰化酶 HDAC 活性/抑制直接分析试剂盒 (Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA) 和 Nrf2 核转录因子分析试剂盒 (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) 分析 HDAC 和 Nrf2 活性。

2.5 统计分析

采用 SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) 统计软件中的一般线性模型进行单因素方差分析。方差分析差异显著者, 以最小显著差异 (LSD) 法比较平均数间的差异。结果用平均值 \pm SE 表示, $P < 0.05$ 作为统计显著水平。

3 结果

3.1 细胞存活率

丁酸对 HCT116 细胞存活率的影响如图 4-2 所示, 5 mM NaB、AMA 和 AMA + 5 mM NaB 组细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0.05$); 但对照组、0.5 mM NaB 和 AMA + 0.5 mM NaB 组之间的细胞存活率没有显著差异 ($P > 0.05$)。

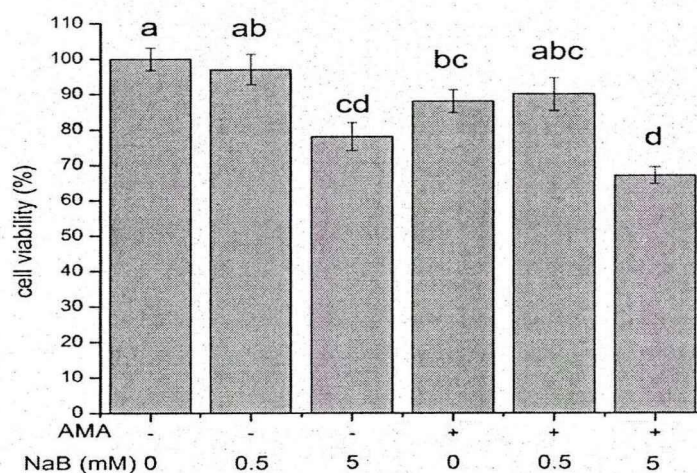


图 4-2 丁酸钠对 HCT116 细胞存活率的影响

Figure 4-2 Effect of NaB on viability in HCT116 cells

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

3.2 线粒体超氧化物

抗霉素 A 是线粒体呼吸链复合物 III 的抑制剂, 可通过产生超氧化物诱导细胞的氧化应激^[158]。采用 MitoSOX™ 红检测活细胞线粒体超氧化物的产生情况 (图 4-3)。与对照组相比, 添加抗霉素 A 增加了 AMA、AMA + 0.5 mM NaB 和 AMA + 5 mM NaB 组细胞的超氧化物水平, 5 mM NaB 组轻微地增加了超氧化物的水平。但 0.5 mM NaB 组没有发现显著的超氧化物产生。

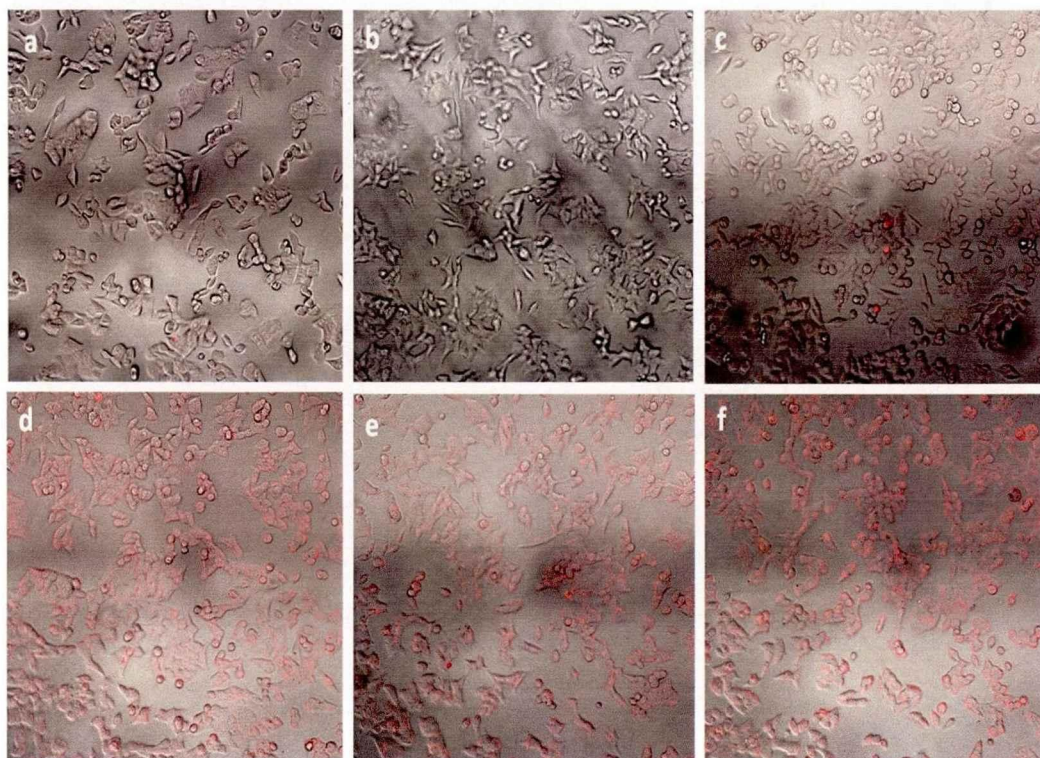


图 4-3 丁酸钠对 HCT116 细胞线粒体超氧化物的影响

Figure 4-3 Effect of NaB on the mitochondrial superoxide in HCT116 cells

a, 0 mM NaB (对照组) ; b, 0.5 mM NaB; c, 5 mM NaB; d, AMA; e, AMA + 0.5 mM NaB; f, AMA + 5 mM NaB

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

3.3 线粒体 GSH 氧化还原电位

结果列于图 4-4 和表 4-1。由图 4-4 和表 4-1 可知，在非氧化应激的条件下，对照组 (-309 mV)、0.5 mM NaB (-308 mV) 和 5 mM NaB (-302 mV) 组细胞之间的氧化还原电位没有显著差异。但在 AMA 诱导的氧化应激条件下，与对照组相比 (-309 mV)，AMA 组增加了细胞线粒体的氧化 (-280 mV)；AMA + 0.5 mM NaB 组降低了 AMA 诱导的 Grx1-roGFP2 探针的氧化 (-293 mV)，从而轻微地缓解了 AMA 诱导的氧化应激，而 AMA + 5 mM NaB 组增加了 AMA 诱导的探针的氧化 (-246 mV)，从而增强了 AMA 诱导的氧化应激。

表 4-1 丁酸钠和抗霉素 A 对线粒体 GSH 氧化还原电位的影响

Table 4-1 Alterations of mitochondrial matrix glutathione redox potentials in response to NaB or AMA

AMA (50 μM)	-	-	-	+	+	+
NaB (mM)	0	0.5	5	0	0.5	5
E_{GSH}	-309 mV	-308 mV	-302 mV	-280 mV	-293 mV	-246 mV

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

HCT116 细胞线粒体氧化还原电位 (E_{GSH}) 用 Grx1-roGFP2 探针检测，采用 Nernst 方程计算

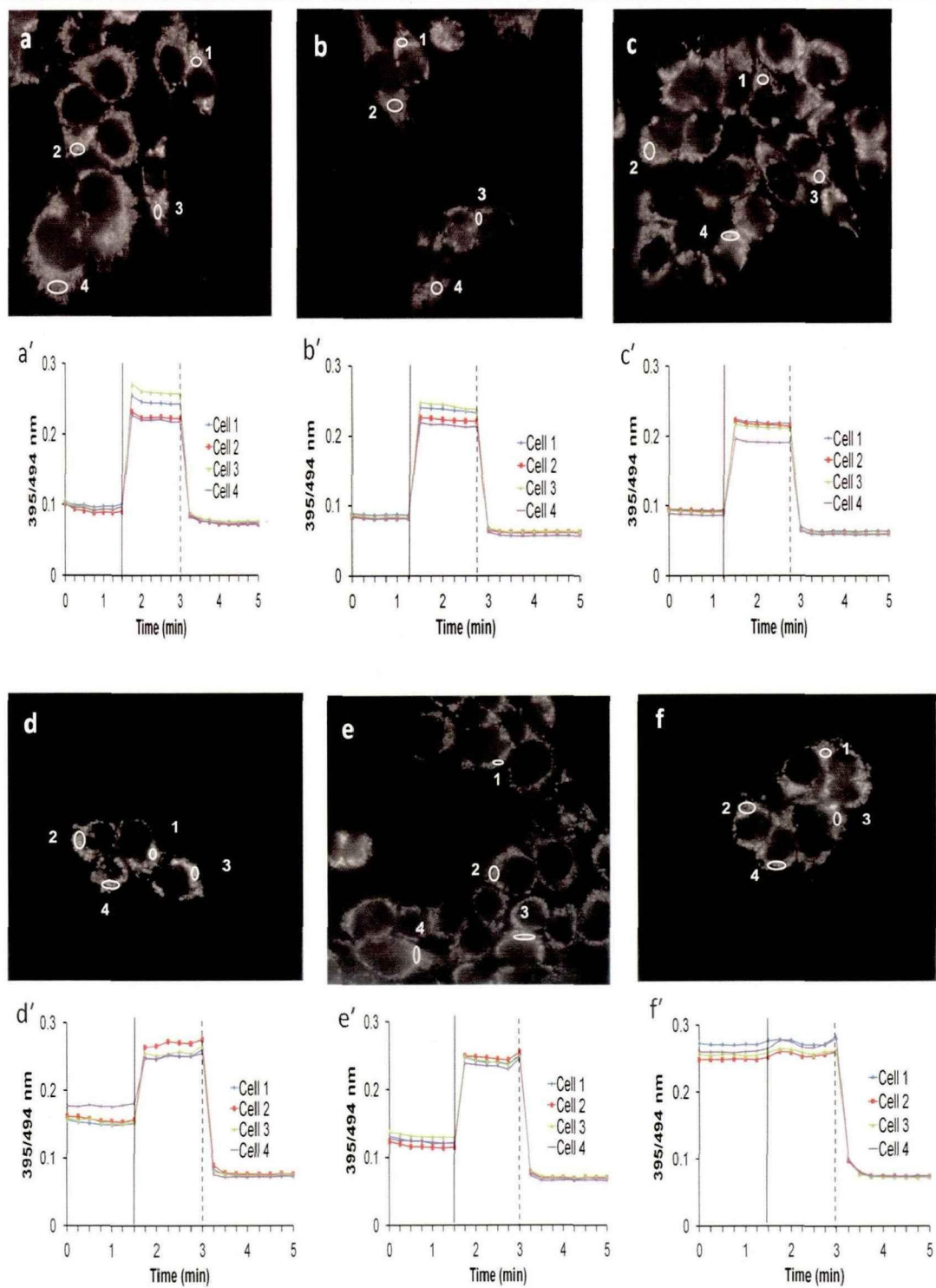


图 4-4 丁酸钠对 HCT116 细胞线粒体 GSH 氧化还原电位的影响

Figure 4-3 Effect of NaB on mitochondrial glutathione redox potentials in HCT116 cells

上述图片是不同处理 HCT116 细胞线粒体 Grx1-roGFP2 探针的代表图片，各处理分别为 a, 0 mM NaB (对照组) ; b, 0.5 mM NaB;

c, 5 mM NaB; d, AMA; e, AMA + 0.5 mM NaB; f, AMA + 5 mM NaB ; AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

坐标图 (a'-f') 表示分别用 2 mM diamide (垂直实线) 和 10 mM DTT (垂直虚线) 相继处理后不同时间点的 395/494 nm 比率

3.4 基因表达

由图 4-5 可见,0.5 mM NaB 组细胞的 *GSR* 和 *GCLM* 基因表达量显著高于对照组,而 5 mM NaB 组细胞的 *GSR* 和 *GCLM* 基因表达量显著低于对照组 ($P<0.05$)。但不同剂量的 NaB 酸对细胞 *GCLC* 基因表达量没有显著影响 ($P>0.05$)。

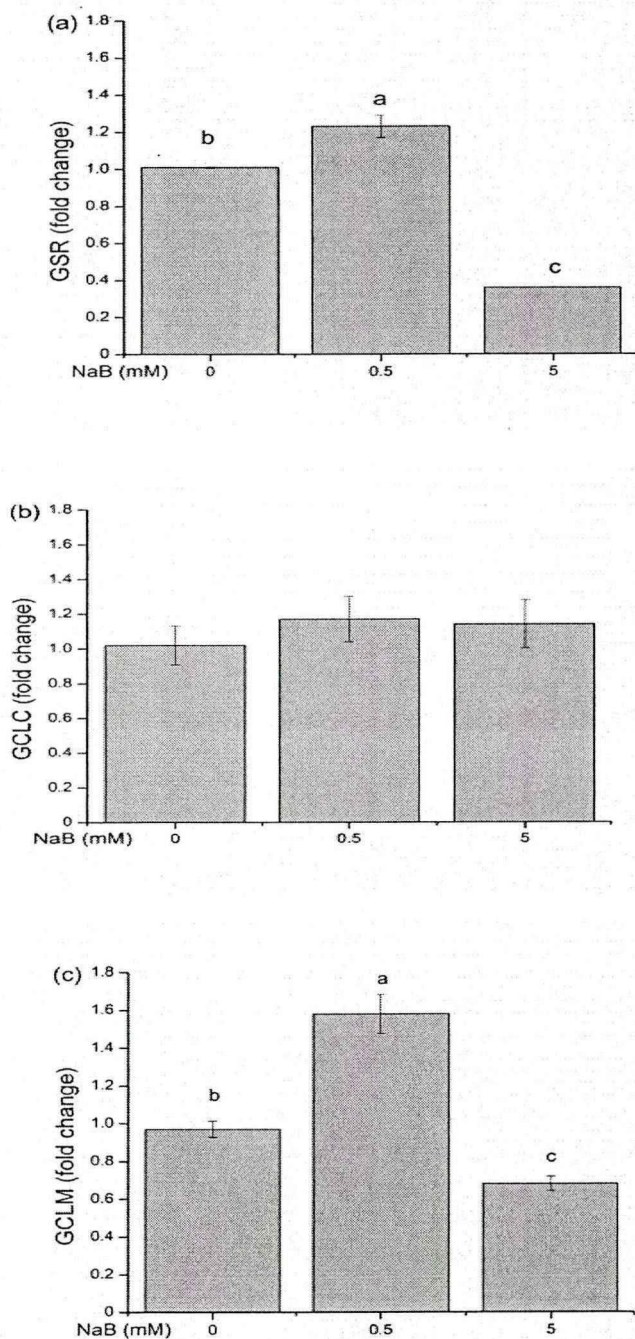


图 4-5 丁酸钠对 HCT116 细胞 *GSR* (a), *GCLC* (b) 和 *GCLM* (c) 基因表达的影响

Figure 4-5 Effect of NaB on expression of *GSR* (a), *GCLC* (b) and *GCLM* (c) in HCT116 cells. NaB 表示丁酸钠

如图 4-6 所示，与对照组相比，AMA 显著增加了 *GSR*，*GCLC* 和 *GCLM* 基因的表达量，但氧化应激各组细胞基因的表达量随着丁酸含量的增加呈现剂量依赖式降低 ($P<0.05$)，而且 AMA + 5 mM NaB 组 *GSR* 的表达量降到了对照组表达量的几乎一半，表明细胞对 AMA 诱导的氧化损伤出现了适应性反应失调，GSSG 还原成 GSH 的循环出现了障碍。

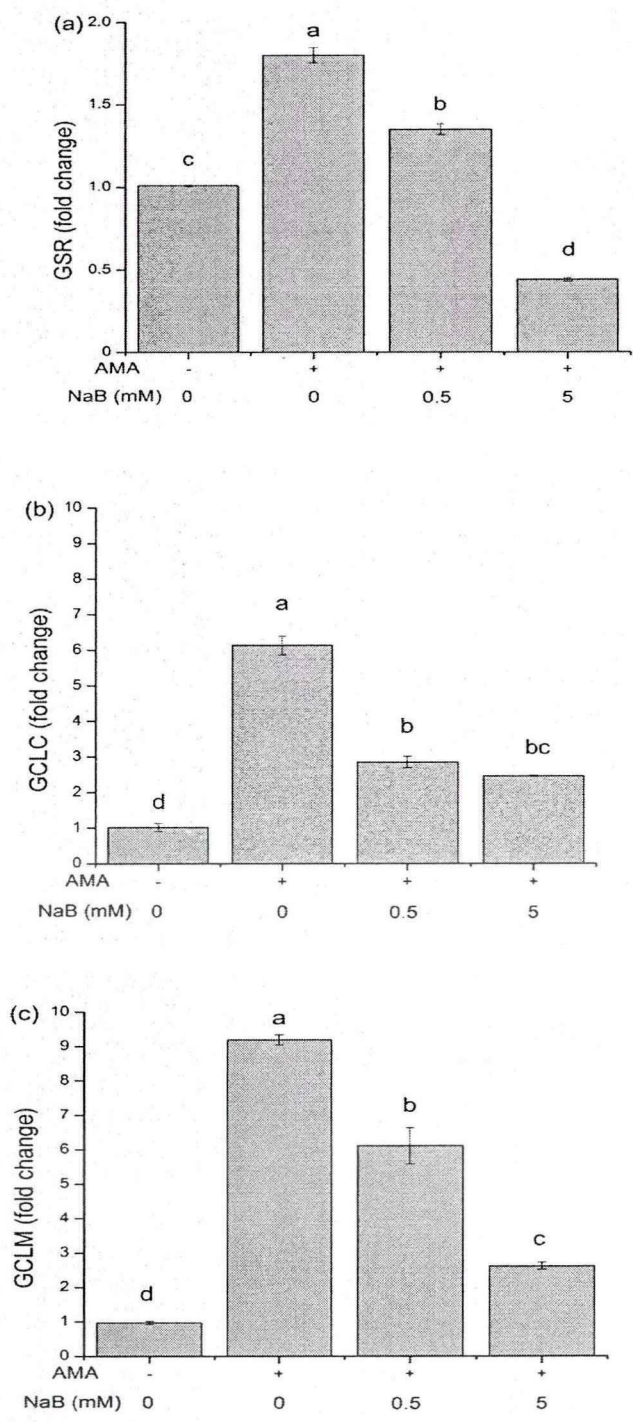


图 4-6 丁酸钠对 AMA 诱导的氧化应激 HCT116 细胞 *GSR* (a), *GCLC* (b) 和 *GCLM* (c) 基因表达的影响

Figure 4-6 Effect NaB on expression of *GSR* (a), *GCLC* (b) and *GCLM* (c) on AMA-induced oxidative stress in

HCT116 cells. AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

3.5 GSR 活性

AMA 组细胞 GSR 活性显著高于对照组 ($P<0.05$, 图 4-7), 但 5 mM NaB 和 AMA + 5 mM NaB 组细胞 GSR 活性却显著低于对照组 ($P<0.05$)。对照组、0.5 mM NaB 和 AMA + 0.5 mM NaB 组之间 GSR 活性没有显著差异 ($P>0.05$)。

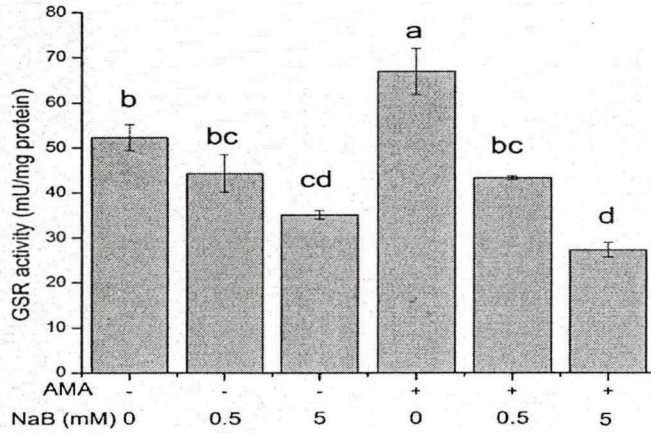


图 4-7 丁酸钠对 HCT116 细胞 GSR 活力的影响

Figure 4-7 Effect of NaB on GSR activity in HCT116 cells

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

3.6 HDAC 活性

如图 4-8 所示, 5 mM NaB 和 AMA + 5 mM NaB 组 HDAC 活性显著低于除对照组外的其余各组 ($P<0.05$)。但对照组、0.5 mM NaB、AMA 和 AMA + 0.5 mM NaB 组细胞之间 HDAC 活性没有显著差异 ($P>0.05$)。

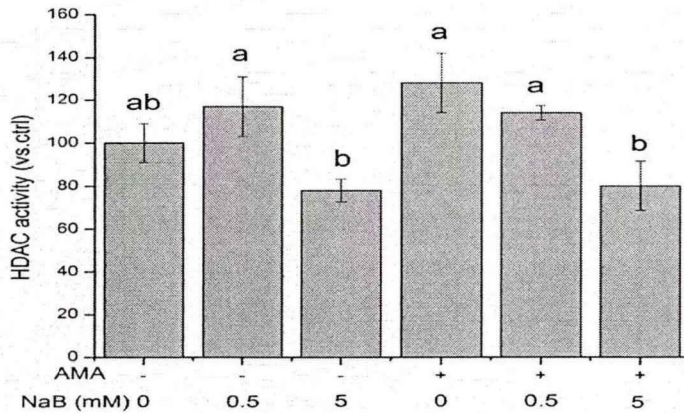


图 4-8 丁酸钠对 HCT116 细胞 HDAC 活力的影响

Figure 4-8 Effect of NaB on HDAC activity in HCT116 cells

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

3.7 Nrf2 活性

如图 4-9 所示, 0.5 mM NaB 处理显著增加了细胞核 Nrf2 活性 ($P<0.05$); 但 5 mM NaB 处理没有显著增加 Nrf2 的细胞核转位 ($P>0.05$)。在 AMA 诱导的氧化应激条件下, 细胞核 Nrf2 活性显著增加 ($P<0.05$), 而 AMA + 5 mM NaB 组显著降低了 Nrf2 活性的增加 ($P<0.05$), 细胞没有发生 Nrf2 的核转位。

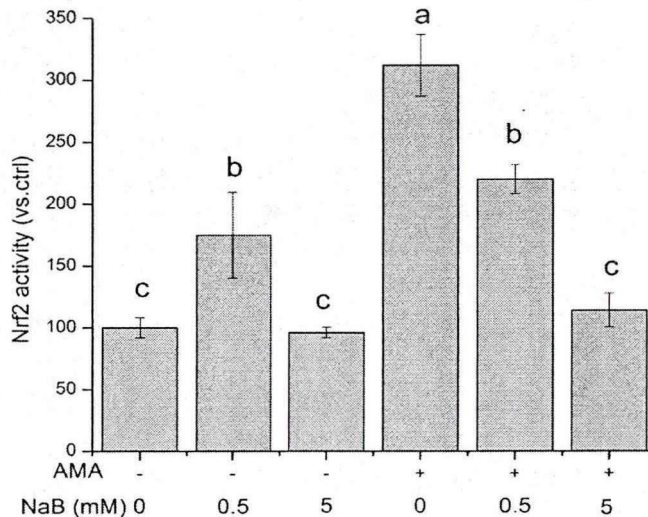


图 4-9 丁酸钠对 HCT116 细胞 Nrf2 活力的影响

Figure 4-9 Effect of NaB on Nrf2 activity in HCT116 cells

AMA 表示抗霉素 A; NaB 表示丁酸钠

4 讨论

丁酸在调节肠道健康和疾病方面具有广泛的作用, 对细胞抗氧化、抗炎和抗癌都有一定的效果。但是, 很多研究也表明丁酸对细胞增殖、凋亡和分化具有不同的甚至矛盾的效果, 这些不同的效果取决于多种因素, 如丁酸作用于组织和细胞的水平, 代谢底物的可用性以及细胞内环境的状况等^[159]。

研究者建议采用丁酸作为癌症的抑制剂。丁酸是正常结肠细胞的主要能源物质和生存因子, 但是对于转化的细胞系, 丁酸却能抑制细胞的增殖并促使细胞循环终止、分化和凋亡^[160]。事实上, 丁酸对于正常的结肠细胞和结肠癌细胞的相反的效果被称为“丁酸悖论”, 该效果可能与“瓦博格效应”(Warburg Effect) 有关^[58, 161]。研究表明肿瘤细胞的生长随着丁酸含量的增加而受到抑制, 继而引起细胞凋亡和自噬, 这与其抗癌的效果一致^[162, 163]。体外研究表明丁酸(>0.5 mM) 诱导结直肠癌细胞的凋亡^[164], 这与我们的研究结果一致, 表明了相对高含量的丁酸(5 mM) 显著降低细胞的存活率, 而低含量的丁酸(0.5 mM) 没有抑制细胞生长。而且, 我们发现 5 mM 的丁酸增强而 0.5 mM 的丁酸轻微地缓解抗霉素 A 诱导的细胞死亡。之前的研究也报道了类似的结果, 该研究表明 2 mM 丁酸处理后的细胞对甲萘醌诱导的氧化应激比未用丁酸处理的细胞

更加敏感, 丁酸处理过的细胞死亡率增加^[146]。

丁酸作为一种 HDAC 抑制剂能激活死亡受体和内源凋亡信号通路^[146]。由于瓦博格效应, 癌细胞主要依靠葡萄糖有氧糖酵解提供能量, 而不是有氧氧化^[161]。因此, 不被代谢的丁酸进入细胞核内作为 HDAC 抑制剂, 从而表现地调节基因的表达, 启动凋亡基因表达而不是增殖基因表达^[58, 145]。而且, 一些研究发现丁酸和其它 HDAC 抑制剂诱导的细胞死亡伴随着细胞 ROS 水平的提高和 GSH 含量的降低^[146, 147, 165]。因此, 丁酸可能通过调节 HDAC 活性和胞内氧化还原平衡而抑制癌细胞的生长。本研究结果与之前的研究一致, 表明了相对高含量的丁酸 (5 mM) 抑制 HDAC 活性和细胞生长^[166]。与我们的研究结果一致, 最近的一个研究发现高剂量丁酸 (5, 7.5 和 10 mM) 显著地增加细胞的死亡率和降低人成神经细胞瘤细胞克隆的形成^[167]。但是, 当用低剂量的丁酸 (0.5 mM) 处理细胞时, 细胞内丁酸的含量可能没有到达作为 HDAC 抑制剂的水平^[57]。而且, 研究发现肠道内丁酸的含量是呈梯度变化的, 肠腔中丁酸的含量 ≥ 5 mM, 当到达隐窝基底细胞时丁酸含量约为 0.5 mM, 这是由于细菌的密度和发酵在肠腔是最高的, 而丁酸扩散至隐窝的过程中会被黏膜层逐渐稀释^[57, 58]。因此, 丁酸对正常结肠细胞和结直肠癌细胞矛盾的效果可能由于丁酸在体内外的水平不同, 以及丁酸含量从肠腔到隐窝的梯度变化, 该变化对结肠上皮细胞的稳态和更新循环具有十分重要的作用^[57]。

核转录因子 Nrf2 是细胞抵抗氧化应激的主要调节因子, 超过 200 种抗氧化酶和解毒酶受 Keap1-Nrf2 通路的调节^[168]。因此, 当 Nrf2 与细胞质中的抑制因子 Keap1 解离后, 会转位到细胞核内, 结合到抗氧化反应元件 (ARE) 的目的基因的启动子上, 启动相关基因的表达, 这对细胞的抗氧化和解毒反应具有广泛的影响^[154, 169]。GCLM 和 GCLC 的增强子区都包含 ARE, 它们在 GCL 的诱导和表达过程中具有最重要的作用^[153]。之前的研究表明 Nrf2 可以通过影响 GSH 的从头合成和调节 GSR 而调节 GSH 稳态和氧化还原状态^[153, 154]。然而, 到现在为止, 关于丁酸通过 Nrf2 影响 GSH 稳态和氧化还原状态的研究非常有限。本研究表明 0.5 mM 的丁酸可通过增加 Nrf2 的核转位显著地上调 *GCLM* 和 *GSR* 基因的表达; 而 5 mM 的丁酸显著地下调 *GCLM* 和 *GSR* 基因的表达以及 GSR 活力, 并且没有影响 Nrf2 的核转位。相似的研究发现 1 mM 的丁酸培养细胞增加了谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 而 10 mM 的丁酸培养细胞却降低该酶的活性^[140]。此外, 抗霉素 A 诱导的 *GSR/GCLC/GCLM* 基因的表达量以剂量依赖式的方式被丁酸阻止, 这与抗霉素 A 诱导细胞氧化应激时 Nrf2 的改变一致。上述结果表明抗氧化基因的表达受 Nrf2 的调节。然而, 在细胞处于氧化应激和正常状态条件下, 0.5 mM 和 5 mM 处理组 *GCLC* 基因的表达量没有差异。这与之前的研究一致, 该研究表明复合物增加细胞内 GSH 时, 与 *GCLC* 相比, 诱导了更多的 *GCLM*, *GCLM* 缺失小鼠不能增加 GCL 的活性和 GSH 的含量, 表明上调 GCL 活性时必须要有 *GCLM* 的参与^[170]。

线粒体中的各种抗氧化剂和解毒酶中, GSH 是主要的氧化还原平衡的保护剂之一, 它能抵抗因氧化应激导致的线粒体功能失调和细胞死亡^[171]。线粒体是细胞内氧气消耗和 ROS 产生的主要场所, 因此对 GSH 阻止的氧化损伤具有很高的依赖性, 而且, 线粒体内不能从头合成 GSH, 只能依靠 GSR 将 GSSG 还原成 GSH 以及 GSH 从细胞质穿过膜进入线粒体, 因此在线粒体内通过 GSSG 和 GSH 之间转化维持氧化还原状态显得更加重要^[172]。然而, 本研究发现抗霉素 A 诱导氧化应激的高剂量丁酸组 GSR 的表达和活性在所有组中是最低的并且低于对照组, 表明线粒体对抗霉素 A 诱导的氧化应激产生了适应性失调, 因此导致了线粒体的损伤和细胞死亡^[173, 174]。

而且, 我们采用基因编码的氧化还原敏感绿色荧光蛋白并将其融合到人谷氧还蛋白 (Grx1-roGFP2) 中, 从而实现了实时监测细胞线粒体内 GSH 的氧化还原电位。本研究结果表明线粒体呼吸链复合物 III 的抑制剂抗霉素 A 通过制造超氧化物诱导了线粒体的氧化应激。而且, 低剂量的丁酸组轻微缓解了抗霉素 A 诱导的氧化应激, 降低了线粒体探针的氧化; 而高含量的丁酸组细胞对抗霉素 A 诱导的氧化应激更加敏感, 导致了线粒体探针的完全氧化; 这些结果进一步表明了高剂量的丁酸增强了线粒体的氧化损伤。目前关于丁酸对线粒体氧化还原状态影响的研究非常有限。Kirlin 等 (1999) 发现 5 mM 的丁酸处理 16 h 和 48 h 可分别导致 HT29 细胞产生 22 mV 和 60 mV 的氧化, 该结果通过测定细胞内的 GSH 和 GSSG 得到^[175]。Li 等 (2004) 报道了相对高含量的丁酸诱导了大鼠结肠癌细胞对氧化应激的抵抗能力降低以及细胞内 GSH 含量的显著降低^[147]。

5 小结

综上所述, 本研究表明相对低含量的丁酸 (0.5 mM) 显著上调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达, 而相对高含量的丁酸 (5 mM) 显著下调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达。而且, 0.5 mM 的丁酸缓解了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤, 而 5 mM 的丁酸加剧了抗霉素 A 诱导的氧化损伤和细胞死亡, 这些效果受 Nrf2-ARE 信号通路的调控。该结果支持结肠隐窝细胞生理水平的丁酸含量增加 GSH 的产生并且保护细胞缓解氧化损伤的破坏, 而高含量的丁酸可能一定程度上能促进结肠细胞的更新循环并降低结直肠癌的风险。

第三章 结论与建议

1 本研究的主要结论

- 1.1 筛选得到了一株淀粉酶和纤维素酶活力高、产酸能力和抗逆性强的丁酸梭菌 (CGMCC No. 8187)。
- 1.2 丁酸梭菌可通过降低小鼠血清肾上腺皮质激素皮质酮含量而显著提高肝脏和结肠黏膜的抗氧化能力;并能显著降低小鼠血清胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量。
- 1.3 日粮中添加丁酸梭菌可提高肉鸡的 ADG, 改善肠道健康和免疫功能, 提高肉鸡的胸肌率并降低腹脂率, 降低血清中总胆固醇的含量。
- 1.4 日粮中添加丁酸梭菌可提高肉鸡十二指肠、空肠和回肠黏膜、血清和肝脏的抗氧化能力, 提高胸肌和腿肌中一些 PUFA 的含量。
- 1.5 相对低含量的丁酸 (0.5 mM) 显著上调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达, 而相对高含量的丁酸 (5 mM) 显著下调了 *GSR* 和 *GCLM* 的表达。而且, 0.5 mM 的丁酸缓解了抗霉素 A 诱导的细胞氧化损伤, 而 5 mM 的丁酸加剧了抗霉素 A 诱导的氧化损伤和细胞死亡, 这些效果受 Nrf2-ARE 信号通路的调控。

2 研究的创新点

- 2.1 建立了以丁酸梭菌特异性序列简单快速鉴定丁酸梭菌的方法。
- 2.2 丁酸梭菌可通过提高肉鸡抗氧化能力改善肉鸡肌肉中 PUFA 的组成和含量, 提供了改善畜禽肌肉健康价值和风味品质的新方法。
- 2.3 揭示了丁酸可通过 Nrf2-ARE 信号通路调控 HCT116 细胞的抗氧化能力和存活率。

3 有待于进一步研究和解决的问题

- 3.1 丁酸梭菌对 PUFA 代谢通路的调控研究。
- 3.2 丁酸梭菌降低腹脂和胆固醇的机理研究。

参考文献

- [1] 张卫辉. 丁酸钠对肉鸡免疫反应和抗氧化功能调控作用研究: [博士学位论文]. 江苏: 南京农业大学, 2011.
- [2] Kawasaki S, Nakagawa T, Nishiyama Y, et al. Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in Clostridia. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998,86(4):368-372.
- [3] Courtois F, Seidman E G, Delvin E, et al. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003,77(3):744-750.
- [4] Hamer H M, Jonkers D M, Bast A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr*, 2009,28(1):88-93.
- [5] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature Medicine*, 2007,13(6):688-694.
- [6] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008,377(4):1195-1198.
- [7] Huang C, Kawamura T, Toyoda Y, et al. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free Radical Research*, 2010,44(9):971-982.
- [8] 康白, 李华军. 微生物学现代理论与应用. 上海: 上海科学技术出版社, 2013.
- [9] 何明清. 动物微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [10] 张日俊. 现代饲料生物技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [11] Parker R.. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 1974(29):4-8.
- [12] Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*, 1991,32(4):439-442.
- [13] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014,11(8):506-514.
- [14] 熊德鑫. 厌氧菌分离和鉴定方法. 南昌: 江西科学技术出版社, 1986.
- [15] Ley R E, Turnbaugh P J, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006,444(7122):1022-1023.
- [16] 张日俊. 动物微生物制剂(益生菌)的标准、评价规程、功能和发展趋势. *饲料工业*, 2015(04): 1-7.
- [17] Delzenne N M, Neyrinck A M, Backhed F, et al. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol*, 2011,7(11):639-646.
- [18] 孔青. 丁酸梭菌培养与发酵动力学以及调节腹泻小鼠肠道菌群平衡的研究:[博士学位论文], 浙江: 浙江大学, 2006.
- [19] Cai Y, Suyanandana P, Saman P, et al. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol*, 1999,45(4):177-184.
- [20] 郭兴华. 益生菌基础与应用. 北京: 北京科学技术出版社, 2002.

- [21] Roth A, Fischer M, Hamid M E, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 1998,36(1):139-147.
- [22] Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol*, 1999,37(3):852-857.
- [23] Takewaki S, Okuzumi K, Ishiko H, et al. Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol*, 1993,31(2):446-450.
- [24] Blackwood K S, He C, Gunton J, et al. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol*, 2000,38(8):2846-2852.
- [25] Dauendorffer J, Guillemain I, Aubry A. Identification of *Mycobacterium* species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA Gyrase genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,41 (3):1311-1315.
- [26] Truusalu K, Naaber P, Kullisaar T, et al. The influence of antibacterial and antioxidative Probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2004,16(4):180-187.
- [27] Martarelli D, Verdenelli M C, Scuri S, et al. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Current Microbiology*, 2011,62(6):1689-1696.
- [28] Hosomi M, Tanida N, Shimoyama T. The role of intestinal bacteria in gallstone formation in animal model. A study on biliary lipid composition and bile acid profiles in bile, small intestinal contents and feces of *Clostridium butyricum* Miyairi No. 588 monocontaminated mice. *Gastroenterol Jpn*, 1982,17(4):316-323.
- [29] Kobashi K, Takeda Y, Itoh H, et al. Cholesterol-lowering effect of *Clostridium butyricum* in cholesterol-fed rats. *Digestion*, 1983,26(4):173-178.
- [30] Seo M, Inoue I, Tanaka M, et al. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 improves high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Dig Dis Sci*, 2013,58(12):3534-3544.
- [31] 冯于明. 动物免疫营养. 北京, 科学出版社, 2011.
- [32] Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013,97(2):809-817.
- [33] Chauhan R, Vasanthakumari A S, Panwar H, et al. Amelioration of colitis in mouse model by exploring antioxidative potentials of an indigenous probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* Lfl. *Biomed Res Int*, 2014,2014:206732.
- [34] 白明, 孟祥晨. 益生菌抗氧化活性及菌体抗氧化相关成分的分析. *食品与发酵工业*, 2009(05): 6-11.
- [35] Bruno-Barcena J M, Andrus J M, Libby S L, et al. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal *lactobacilli* provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl Environ Microbiol*, 2004,70(8):4702-4710.
- [36] Serrano L M, Molenaar D, Wels M, et al. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb Cell Fact*, 2007,6:29.
- [37] 秦顺义, 黄克和, 高建忠. 富硒益生菌对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响. *营养学报*, 2006(05): 423-426.
- [38] 王芳, 罗红霞, 朱建成, 等. 益生菌抗癌功能及作用机制研究进展. *食品工业科技*, 2009(12): 462-465.

- [39] Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 1999,10(12):411-417.
- [40] Carr F J, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 2002,28(4):281-370.
- [41] Kuroiwa T, Iwanaga M, Kobari K, et al. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy. *Kansenshogaku Zasshi*, 1990,64(11):1425-1432.
- [42] 刘婷婷, 滑静, 王晓霞, 等. 丁酸梭菌对蛋用仔公鸡肠道菌群、形态结构及黏膜免疫相关细胞的影响. *动物营养学报*, 2012(11): 2210-2221.
- [43] Wang G R, Chen H Y, Chen C H, et al. Immunopotentiating activity of *Clostridium butyricum* in mice. *Proc Natl Sci Coun Repub China B*, 1996,20(4):101-109.
- [44] Yang C M, Cao G T, Ferket P R, et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poult Sci*, 2012,91(9):2121-2129.
- [45] Murayama T, Mita N, Tanaka M, et al. Effects of orally administered *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 on mucosal immunity in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995,48(3-4):333-342.
- [46] 易中华. 饲用微生态制剂丁酸梭菌的研究与应用进展. *饲料研究*, 2012(02): 14-17.
- [47] 傅思武, 陆俭, 肖在滢, 等. 酪酸梭菌—婴儿型双歧杆菌二联活菌制剂的研究. *中国微生态学杂志*, 2000(01): 11-14.
- [48] Zhang L, Cao G T, Zeng X F, et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult Sci*, 2014,93(1):46-53.
- [49] Vandak D, Telgarsky M, Sturdik E. Influence of growth factor supplements on butyric acid production from sucrose by *Clostridium butyricum*. *Folia Microbiologica*, 1995,40(6):669-672.
- [50] Hamer H M, Jonkers D, Venema K, et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2008,27(2):104-119.
- [51] Junghare M, Subudhi S, Lal B. Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012,37(4):3160-3168.
- [52] Imase K, Takahashi M, Tanaka A, et al. Efficacy of *Clostridium butyricum* preparation concomitantly with *Helicobacter pylori* eradication therapy in relation to changes in the intestinal microbiota. *Microbiology and Immunology*, 2008,52(3):156-161.
- [53] Seki H, Shiohara M, Matsumura T, et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatr Int*, 2003,45(1):86-90.
- [54] 吴小平, 刘德良, 凌奇荷. 酪酸菌对大鼠右旋葡聚糖硫酸钠结肠炎的治疗作用. *中华消化杂志*, 2003(05): 305.
- [55] Isono A, Katsuno T, Sato T, et al. *Clostridium butyricum* TO-A culture supernatant downregulates TLR4 in human colonic epithelial cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 2007,52(11):2963-2971.
- [56] 李佳荃, 汤展宏, 凌鸿英. 丁酸梭菌对小鼠移植瘤的抑制作用. *广西医科大学学报*, 2003(01): 77-79.
- [57] Bultman S J. Molecular pathways: gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clin Cancer Res*,

- 2014,20(4):799-803.
- [58] Donohoe D R, Collins L B, Wali A, et al. The warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell*, 2012,48(4):612-626.
- [59] Maulik N, Das D K. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*, 2002,33(8):1047-1060.
- [60] Gunther S, Ruhe C, Derikito M G, et al. Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Lett*, 2007,250(1):25-35.
- [61] Nonaka Y, Iwagaki H, Kimura T, et al. Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice. *Int J Cancer*, 1993,54(6):983-986.
- [62] Dole M, Wilson F R, Fife W P. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science*, 1975,190(4210):152-154.
- [63] Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, et al. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol Ind Health*, 2010,26(4):203-216.
- [64] 杨静. 丁酸梭菌及其磷壁酸与肠道细胞互作的分子机制研究:[硕士学位论文]. 山东: 山东农业大学, 2014.
- [65] Zhang B, Yang X, Guo Y, et al. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on serum lipids and lipid-related gene expression in broiler chickens. *Animal*, 2011,5(12):1909-1915.
- [66] Zhao X, Guo Y, Guo S, et al. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013,97(14):6477-6488.
- [67] 王润之, 孙彦军, 陈文, 等. 酪酸菌对种鸭生产性能的影响. *河南农业科学*, 2009(10):143-145.
- [68] 刘婷婷, 张帅, 邓斐月, 等. 谷氨酰胺与丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、免疫功能、小肠形态和肠道菌群的影响. *动物营养学报*, 2011(06): 998-1005.
- [69] 宋增福. 丁酸梭菌C_2菌株对鲢鱼肠道微生态调控作用与机理研究:[博士学位论文]. 浙江: 浙江大学, 2006.
- [70] Hermier D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J Nutr*, 1997,127(5 Suppl):805S-808S.
- [71] Bedu E, Chainier F, Sibille B, et al. Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002,283(5):R1245-R1253.
- [72] 陈继兰. 鸡肉肌苷酸和肌肉脂肪含量遗传规律及相关候选基因的研究:[博士学位论文]: 北京: 中国农业大学, 2004.
- [73] 蒋瑞瑞. 烟酸对鸡脂肪代谢和肉品质的影响及作用机理:[博士学位论文]: 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [74] 杨欣. 丁酸梭菌与日粮油脂调控肉仔鸡肌肉品质的研究:[博士学位论文]: 北京: 中国农业大学, 2010.
- [75] 陈金文, 杨山, 文伯珍, 等. 血浆极低密度脂蛋白浓度的双向选择对肉鸡生长性能与血脂的影响. *中国兽医学报*, 1998(02): 199-202.
- [76] 杨凤. *动物营养学*. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [77] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学*. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [78] 李文娟. 鸡肉品质相关脂肪代谢功能基因的筛选及营养调控研究:[博士学位论文]: 中国农业科学院, 2008.

- [79] Okeudo N J, Moss B W. Interrelationships amongst carcass and meat quality characteristics of sheep. *Meat Science*, 2005,69(1):1-8.
- [80] 崔焕先. 肉鸡肌内脂肪形成的分子调控网络及相关基因研究: [博士学位论文]: 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [81] 袁华根. 鸡肉汤香味成分鉴定及日龄、性别和胴体部位对鸡肉风味的影响: [硕士学位论文]: 江苏: 南京农业大学, 2007.
- [82] 孙月娇. 不同饲养方式对肉鸡肌肉品质和挥发性风味物质形成的影响: [硕士学位论文]: 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [83] 姜琳琳, 刘华贵, 齐德生, 等. 鸡肉中挥发性风味物质的研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(10):25-26.
- [84] 孙艳发. 基于全基因组关联研究技术筛选鸡产肉和肉品质性状相关候选基因: [博士学位论文]: 江苏: 扬州大学, 2013.
- [85] 齐珂珂. 日粮 $\omega 6/\omega 3$ 比例对肉鸡脂肪酸组成及肉品质的影响: [博士学位论文]: 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [86] 孙建广, 张石蕊, 谯仕彦, 等. 发酵乳酸杆菌对生长肥育猪生长性能和肉品质的影响. *动物营养学报*, 2010(01): 132-138.
- [87] Endo T, Nakano M. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid metabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 1999,70(4):207-218.
- [88] Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, et al. Effects of *Lactobacillus* feed supplementation on cholesterol, fat content and fatty acid composition of the liver, muscle and carcass of broiler chickens. *Animal Research*, 2006,55(1):77-82.
- [89] Ramasamy K, Abdullah N, Jalaludin S, et al. Effects of *Lactobacillus* cultures on performance of laying hens, and total cholesterol, lipid and fatty acid composition of egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009,89(3):482-486.
- [90] 张日俊, 潘淑媛, 白永义, 等. 微生物饲料添加剂益生康对肉仔鸡营养代谢与免疫功能的调控机理. *中国农业大学学报*, 2005(03): 40-47.
- [91] Wilson B R, Pearson A M, Shorland F B. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976,24(1):7-11.
- [92] Circu M L, Aw T Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol*, 2012,23(7):729-737.
- [93] Benard O, Balasubramanian K A. Effect of oxidant exposure on thiol status in the intestinal mucosa. *Biochem Pharmacol*, 1993,45(10):2011-2015.
- [94] Kamboh A A, Zhu W Y. Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poult Sci*, 2013,92(2):454-461.
- [95] Jung S, Choe J H, Kim B, et al. Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers. *Meat Sci*, 2010,86(2):520-526.
- [96] Jahns F, Wilhelm A, Jablonowski N, et al. Butyrate modulates antioxidant enzyme expression in malignant and non-malignant human colon tissues. *Mol Carcinog*, 2015,54(4):249-260.
- [97] Zhang W H, Gao F, Zhu Q F, et al. Dietary sodium butyrate alleviates the oxidative stress induced by corticosterone exposure and improves meat quality in broiler chickens. *Poult Sci*, 2011,90(11):2592-2599.

- [98] 谢树贵. 酒窖底泥中丁酸梭菌的分离及特性研究: [硕士学位论文]: 湖北: 华中农业大学, 2007.
- [99] 李桂霞. 鸡源双歧杆菌定向选育和发酵参数研究: [硕士学位论文]: 北京: 中国农业大学, 2007.
- [100] Okamoto T, Sasaki M, Araki Y, et al. Therapeutic efficiency of *Clostridium butyricum* on rat DSS colitis. *Gut*, 1997,41:A227.
- [101] Okamoto T, Sasaki M, Tsujikawa T, et al. Preventive efficacy of butyrate enemas and oral administration of *Clostridium butyricum* M588 in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Journal of Gastroenterology*, 2000,35(5):341-346.
- [102] Zhang H Q, Ding T T, Zhao J S, et al. Therapeutic effects of *Clostridium butyricum* on experimental colitis induced by oxazolone in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2009,15(15):1821-1828.
- [103] Gao Q X, Qi L L, Wu T X, et al. *Clostridium butyricum* activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012,361(1-2):31-37.
- [104] Eid Y Z, Ohtsuka A, Hayashi K. Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. *British Poultry Science*, 2003,44(1):127-132.
- [105] Lin H, Deculypere E, Buyse J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) - 2. Short-term effect. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2004,139(4):745-751.
- [106] Johnson S A, Fournier N M, Kalynchuk L E. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioural Brain Research*, 2006,168(2):280-288.
- [107] Endo H, Niioka M, Kobayashi N, et al. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *Plos One*, 2013,8(5):e63388.
- [108] 郭春锋, 张兰威. 益生菌降胆固醇功能研究进展. *微生物学报*, 2010(12):1590-1599.
- [109] Harrison V C, Peat G. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am J Clin Nutr*, 1975,28(12):1351-1355.
- [110] Zhao X, Guo Y M, Liu H B, et al. *Clostridium butyricum* reduce lipogenesis through bacterial wall components and butyrate. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014,98(17):7549-7557.
- [111] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957,226(1):497-509.
- [112] Erwin E S, Marco G J, Emery E M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 1961,44(9):1768-1771.
- [113] Grimes J L, Rahimi S, Oviedo E, et al. Effects of a direct-fed microbial (primalac) on turkey poult performance and susceptibility to oral *Salmonella* challenge. *Poult Sci*, 2008,87(7):1464-1470.
- [114] Maragkoudakis P A, Mountzouris K C, Rosu C, et al. Feed supplementation of *Lactobacillus plantarum* PCA 236 modulates gut microbiota and milk fatty acid composition in dairy goats--a preliminary study. *Int J Food Microbiol*, 2010,141 Suppl 1:S109-S116.
- [115] Zhang B, Yang X, Guo Y, et al. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on the performance and the digestive tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr*, 2011,65(4):329-339.
- [116] Nakanishi S, Kataoka K, Kuwahara T, et al. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on microbiota and formation metabolism in colonic of azoxymethane-induced aberrant

- crypt foci in the rat colon. *Microbiology and Immunology*, 2003,47(12):951-958.
- [117] 温美丽. 酪酸梭菌对溃疡性结肠炎小鼠ITF, NF- κ B和TNF- α 表达的影响及意义: [硕士学位论文]: 山西: 山西医科大学, 2011.
- [118] Kamiya S, Taguchi H, Yamaguchi H, et al. Bacteriophylaxis using *Clostridium butyricum* for lethal caecitis by *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Reviews in Medical Microbiology*, 1997,8:S57-S59.
- [119] Vanderpool C, Yan F, Polk D B. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2008,14(11):1585-1596.
- [120] Suo C, Yin Y, Wang X, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet Res*, 2012,8:89.
- [121] 李菊, 张日俊. 益生菌对肉仔鸡生长性能、屠体性状及肉品质的影响. *动物营养学报*, 2007(04): 372-378.
- [122] Jin L Z, Ho Y W, Abdullah N, et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci*, 1998,77(9):1259-1265.
- [123] Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, et al. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Br Poult Sci*, 2003,44(1):139-144.
- [124] Li L, Xu C L, Ji C, et al. Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poult Sci*, 2006,85(2):364-368.
- [125] Klaver F A, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol*, 1993,59(4):1120-1124.
- [126] Laparra J M, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res*, 2010,61(3):219-225.
- [127] Raes K, De Smet S, Demeyer D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 2004,113(1-4):199-221.
- [128] Woods V B, Fearon A M. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*, 2009,126(1-3):1-20.
- [129] Yang X, Zhang B, Guo Y, et al. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poult Sci*, 2010,89(2):254-260.
- [130] Salma U, Miah A G, Maki T, et al. Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poult Sci*, 2007,86(9):1920-1926.
- [131] 蔡军. 芽孢杆菌LFB112的基因组学及其对鸡肉品质和肠道菌群调控的研究:[博士学位论文]: 北京: 中国农业大学, 2014.
- [132] Cao Y, Lu L, Liang J, et al. Omega-3 fatty acids and primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cell Biochem Biophys*, 2014, doi: 10.1007/s12013-014-0407-5
- [133] Chikunya S, Demirel G, Enser M, et al. Biohydrogenation of dietary n-3 PUFA and stability of ingested vitamin E in the rumen, and their effects on microbial activity in sheep. *Br J Nutr*, 2004,91(4):539-550.
- [134] Kong Q, He G Q, Jia J L, et al. Oral Administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in Mice. *Current Microbiology*, 2011,62(2):512-517.
- [135] Fung K Y C, Cosgrove L, Lockett T, et al. A review of the potential mechanisms for the lowering

- of colorectal oncogenesis by butyrate. *British Journal of Nutrition*, 2012,108(5):820-831.
- [136] Clarke J M, Topping D L, Bird A R, et al. Effects of high-amylose maize starch and butyrylated high-amylose maize starch on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats. *Carcinogenesis*, 2008,29(11):2190-2194.
- [137] McIntyre A, Gibson P R, Young G P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 1993,34(3):386-391.
- [138] Wong C S, Sengupta S, Tjandra J J, et al. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. *Dis Colon Rectum*, 2005,48(3):549-559.
- [139] Liang X, Wang R S, Wang F, et al. Sodium butyrate protects against severe burn-induced remote acute lung injury in rats. *Plos One*, 2013,8(7):e68786.
- [140] Orchel A, Gruchlik A, Weglarz L, et al. Influence of sodium butyrate on antioxidative enzymes activity in Caco-2 cell lines. *Acta Pol Pharm*, 2006,63(5):441-442.
- [141] Treasure T, Milosevic M, Fiorentino F, et al. History and present status of pulmonary metastasectomy in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2014,20(40):14517-14526.
- [142] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 2015, 136(5):E359-E386.
- [143] Gill R K, Dudeja P K. A novel facet to consider for the effects of butyrate on its target cells. Focus on "The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein". *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011,301(5):C977-C979.
- [144] Ooi C C, Good N M, Williams D B, et al. Structure-activity relationship of butyrate analogues on apoptosis, proliferation and histone deacetylase activity in HCT-116 human colorectal cancer cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2010,37(9):905-911.
- [145] Hagland H R, Soreide K. Cellular metabolism in colorectal carcinogenesis: Influence of lifestyle, gut microbiome and metabolic pathways. *Cancer Lett*, 2015,356(2 Pt A):273-280.
- [146] Bolden J E, Peart M J, Johnstone R W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2006,5(9):769-784.
- [147] Li X, Mikkelsen I M, Mortensen B, et al. Butyrate reduces liver metastasis of rat colon carcinoma cells in vivo and resistance to oxidative stress in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 2004,21(4):331-338.
- [148] Benard O, Balasubramanian K A. Modulation of glutathione level during butyrate-induced differentiation in human colon derived HT-29 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1997,170(1-2):109-114.
- [149] Giardina C, Inan M S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1998,1401(3):277-288.
- [150] Domokos M, Jakus J, Szeker K, et al. Butyrate-induced cell death and differentiation are associated with distinct patterns of ROS in HT29-derived human colon cancer cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010,55(4):920-930.
- [151] Tailor D, Hahm E R, Kale R K, et al. Sodium butyrate induces DRP1-mediated mitochondrial fusion and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mitochondrion*, 2014,16:55-64.
- [152] Jones D P, Brown L A, Sternberg P. Variability in glutathione-dependent detoxication in vivo and its relevance to detoxication of chemical mixtures. *Toxicology*, 1995,105(2-3):267-274.
- [153] Suh J H, Shenvi S V, Dixon B M, et al. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes

- age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004,101(10):3381-3386.
- [154] Harvey C J, Thimmulappa R K, Singh A, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009,46(4):443-453.
- [155] Kolossov V L, Spring B Q, Sokolowski A, et al. Engineering redox-sensitive linkers for genetically encoded FRET-based biosensors. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008,233(2):238-248.
- [156] Kolossov V L, Beaudoin J N, Hanafin W P, et al. Transient light-induced intracellular oxidation revealed by redox biosensor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013,439(4):517-521.
- [157] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001,25(4):402-408.
- [158] Aon M A, Cortassa S, Marban E, et al. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2003,278(45):44735-44744.
- [159] Sengupta S, Muir J G, Gibson P R. Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2006,21(1):209-218.
- [160] Sauer J, Richter K K, Pool-Zobel B L. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007,18(11):736-745.
- [161] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009,324(5930):1029-1033.
- [162] Lee D Y, Lee C I, Lin T E, et al. Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012,109(6):1967-1972.
- [163] Shao Y, Gao Z, Marks P A, et al. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004,101(52):18030-18035.
- [164] Kim Y H, Park J W, Lee J Y, et al. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2004,25(10):1813-1820.
- [165] Ungerstedt J S, Sowa Y, Xu W S, et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005,102(3):673-678.
- [166] Davie J R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *Journal of Nutrition*, 2003,133(7 Suppl):2485S-2493S.
- [167] Nor C, Sassi F A, de Farias C B, et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Molecular Neurobiology*, 2013,48(3):533-543.
- [168] Kwak M K, Wakabayashi N, Itoh K, et al. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway - Identification of novel gene clusters for cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 2003,278(10):8135-8145.
- [169] Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013,53:401-426.
- [170] Lavoie S, Chen Y, Dalton T P, et al. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem*, 2009,108(6):1410-1422.

- [171] Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012,17(12):1714-1727.
- [172] Griffith O W, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985,82(14):4668-4672.
- [173] Deganuto M, Pittis M G, Pines A, et al. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 2007,212(1):223-235.
- [174] Manoli I, Alesci S, Blackman M R, et al. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2007,18(5):190-198.
- [175] Kirlin W G, Cai J, Thompson S A, et al. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med*, 1999,27(11-12):1208-1218.

致 谢

本论文是在导师张日俊教授的悉心指导下完成的，从论文选题、试验设计到论文的写作都凝聚着导师的心血。在四年的学习和研究生活中，老师博学精深的知识结构、严谨的治学态度、废寝忘食的工作作风和对科学问题的深入探索都让我受益匪浅，值得我终生学习！同时也要感谢师母黄燕老师，对我们生活上的关怀、实验室各项工作的帮助以及数据统计分析等方面给予的巨大支持。

感谢伊利诺伊大学香槟校区 H. Rex Gaskins 教授对我博士论文细胞试验部分给予的指导与支持，Gaskins 教授在试验实施过程中多次与我深入细致的探讨以及在科研思路和方法上的引导使我受益匪浅！同时感谢 Gaskins 教授实验室陈小连、Ann Benefiel、Matthew T. Leslie、Nagendra P. Ponnuraj 和 Vladimir L. Kolossov 等对我试验方面的指导与帮助，还要感谢国家留学基金委对我提供的留学资助。

感谢实验室博士研究生蔡军、武如娟、赵龙妹、郑昭君、商婷婷、傅钰、卫旭彪、王庆、余占桥、李俊霞、马青山、韩冰和郭耀琪，硕士研究生尚雅静、刘旭辉、王昌虹、付文娟、杨亚晋、欧阳张智、马广、隋雯丽、胡聪和鄢新义等在生活和试验过程中给予的热心帮助。

感谢我的父母和家人四年来对我学业上的支持，生活上的关心和精神上的鼓励，使我能安心学习，顺利完成学业！

最后，再次向所有支持和帮助过我的老师、同学、朋友和家人们表示最诚挚的感谢和衷心的祝福！

廖秀冬

2015年5月

作者简介

个人信息:

姓名: 廖秀冬 性别: 男 民族: 汉族
 出生年月: 1985年5月 籍贯: 四川省广汉市

学习经历:

2011.8 至今 中国农业大学动物科技学院 动物营养与饲料科学专业 博士
 2013.9-2014.9 美国伊利诺伊大学香槟校区 动物营养与饲料科学专业 联合培养博士
 2010.4-2011.4 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养与饲料科学专业 联合培养硕士
 2008.9-2011.6 福建农林大学动物科学学院 动物营养与饲料科学专业 硕士
 2004.8-2008.6 西昌学院动物科学系 动物科学专业 学士

博士期间发表论文、参编著作及申请专利:

- 1) Liao X, Ma G and Zhang R et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune functions of broilers. *Poultry Science*, 2015, doi: 10.3382/ps/pev038.
- 2) Liao X, Wu R and Zhang R et al. Effects of *Clostridium butyricum* on antioxidant properties, meat quality and fatty acid composition of broiler birds. *Lipids in Health and Disease*, 2015, doi:10.1186/s12944-015-0035-0.
- 3) Liao X, Zhang R and Gaskins H R et al. Butyrate modulates oxidative stress and cell death in HCT116 colorectal cancer cells. *Cancer letters* (under review), 2015.
- 4) Liao X, Yan X and Zhang R et al. *Clostridium butyricum* alleviates oxidative stress induced by corticosterone exposure and decreases serum lipid in mice. *Experimental Biology and Medicine* (under review), 2015
- 5) 张日俊主编, 廖秀冬等参编, 健康养殖生物技术百问百答, 北京: 中国农业出版社, 2012
- 6) 张日俊和廖秀冬等. 一种新型多效丁酸梭菌及其在提高动物抗氧化能力和改善肉品质方面的应用 (专利公布号: CN 104277999 A), 2014