

日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽和盲肠菌群多样性的影响

常双双^{1, 2}, 李萌¹, 厉秀梅¹, 石玉祥², 张敏红¹, 冯京海¹

(¹中国农业科学院北京畜牧兽医研究所/动物营养学国家重点实验室, 北京 100193; ²河北工程大学农学院, 河北邯郸 056021)

摘要:【目的】应激可改变畜禽脑肠轴功能, 同时改变肠道菌群结构, 其中热应激是影响畜禽健康最为主要的环境影响因素之一。研究日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽和盲肠菌群多样性的影响, 为肉鸡健康养殖提供理论依据。【方法】选取 22d 健康、体重相近爱拔益加(AA)肉鸡 120 只, 随机分成 2 个处理组, 每组 6 个重复, 每个重复 10 只鸡(公母各 5 只)。将 2 个处理组的肉鸡转入环境控制舱, 在环境温度为 21℃, 相对湿度为 60%的条件下适应 7d。29d 时开始正式试验, 试验组环境温度采用 24h 循环变温(26℃—29℃—32℃—29℃—26℃), 相对湿度为 60%; 对照组环境温度为 21℃, 相对湿度为 60%, 试验条件维持至试验结束, 共计 14d。分别于试验第 7 天和 14 天, 每组随机选取 6 只肉鸡(公母各半, 每个重复 1 只肉鸡), 肉鸡采用静脉采血, 采用 ELISA 测定血清中 5-HT、VIP、SP 的含量。同时用无菌收集盲肠内容物, 将同一处理组的 6 个样品迅速混匀, 装置无菌离心管中, 液氮速冻, -80℃保存备用。采用 16S rDNA 的 PCR-DGGE 分子技术, 结合共性和特异性条带割胶回收 DNA 进行克隆和测序, 分析日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽和盲肠菌群多样性的影响。【结果】(1) 试验第 7 天时, 日循环变化偏热环境组肉鸡血清 5-HT 含量显著高于对照组($P<0.05$); 而对照组和日循环变化偏热环境组肉鸡 VIP 和 SP 并无显著差异。试验第 14 天时, 日循环变化偏热环境组肉鸡血清 VIP 含量显著低于对照组($P<0.05$), 对照组和日循环变化偏热环境组肉鸡血清 5-HT 和 SP 并无显著差异。(2) 试验第 7 天, 日循环变化偏热环境组肉鸡盲肠细菌条带数低于对照组, 第 14 天日循环变化偏热环境组与对照组细菌条带数相同, 但日循环变化偏热环境组肉鸡盲肠菌群多样性下降。(3) 对照组和日循环变化偏热环境组肉鸡盲肠共性菌群为 *Clostridium josui*、*Bacteroides vulgatus*、*Parabacteroides johnsonii*、*Bacteroides dorei* 和 *Ruminococcus flavefaciens*; 而日循环变化偏热环境组利于 *Parabacteroides johnsonii* 和 *Bacteroides dorei* 的生长, 抑制 *Intestinimonas butyriciproducens* 和 *Subdoligranulum variabile* 的定植。【结论】(1) 日循环变化偏热环境组与对照组相比, 试验第 7 天肉鸡血清 5-HT 的含量增加; 试验第 14 天肉鸡血清 VIP 的含量下降; SP 无显著差异。(2) 日循环变化偏热环境影响肉鸡盲肠菌群结构和多样性。

关键词: 肉鸡; 偏热环境; 脑肠肽; 肠道菌群

Effects of the Daily Cycle Variation of the Moderate Ambient Temperatures on the Serum Brain Gut Peptide and the Diversity of Caecal Microflora in Broilers

CHANG ShuangShuang^{1,2}, LI Meng¹, LI XiuMei¹, SHI YuXiang², ZHANG MinHong¹, FENG JingHai¹

(¹State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193;

² College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan 056021, Hebei)

收稿日期: 2018-02-21; 接受日期: 2018-09-12

基金项目: 国家重点研发计划课题“肉禽舒适环境的适宜参数及限值研究”(2016YFD0500509); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS07)

联系方式: 常双双, Tel: 15733078872; E-mail: 2403486624@qq.com. 通信作者张敏红, Tel: 010-62895517; E-mail: zmh66@126.com

Abstract: 【Objective】 Stress can alter the function of brain - gut axis and the structure of intestinal flora, among which heat stress is one of the most important environmental factors affecting the health of livestock and poultry. This study was carried out to investigate the effects of the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures on the serum brain gut peptide and the diversity of caecal microflora in broilers, and to provide a theoretical basis for the healthy broiler breeding mode. **【Method】** The study included trials with Arbor Acres (AA) broilers. At the 22d, 120 broilers with equal average body weights were selected, randomly divided into 2 treatments \times 6 replicates of 10 birds each (male and female half and half). The pretest period lasted for 7 days and broilers were kept at 21°C and 60% relative humidity. When the chickens were aged 29 days, formal tests began. The environmental temperature was changed by 24h cycle (26 -29, -32, -26, -29), and the relative humidity was set to 35%, 60%, 85%, respectively. Both kept constant until the end of the experiment. The trial period lasted for 14 days. On day 21 and 42, one birds from each replicate were randomly selected and killed. The broiler was sampled with jugular vein. The contents of 5-HT, VIP and CCK in serum of broilers were measured with Elisa kit. Meanwhile cecal contents were aseptically collected, placed in a centrifugal tube, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. The effect of different humidity on serum brain gut peptide and bacterial diversity in the caecal digesta of broilers at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures was studied by using 16S r DNA-based denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **【Result】** (1) At the 7d, the content of Serum 5-HT at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures was higher than control group ($P<0.05$); the content of serum 5-HT and VIP in the control group and were no significant difference; at the 14d, the content of serum VIP in broilers at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures was lower than the control group ($P<0.05$); the content of serum 5-HT and SP in the control group and were no significant difference. (2) At the 7d, the bacteria bands at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures were lower than the control group; at the 14d, the bacteria bands at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures and the control group were same, but broiler cecal microflora diversity decreased at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures. (3) Common microflora of broiler cecum included *Clostridium josui*, *Bacteroides vulgatus*, *Parabacteroides johnsonii*, *Bacteroides dorei* and *Ruminococcus flavefaciens*; The daily cycle variation of the moderate ambient temperatures was beneficial to the growth of *Parabacteroides johnsonii* and *Bacteroides dorei*, and inhibited the colonization of *Intestinimonas butyriciproducens* and *Subdoligranulum variabile*. **【Conclusion】** Compared with the control group, at the 7d, the content of serum 5-HT in broilers increased at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures, and at the 7d, the serum VIP content in broilers decreased at the daily cycle variation of the moderate ambient temperatures, and there was no significant difference in SP between the two groups; The daily cycle variation of the moderate ambient temperatures affected the cecal microflora structure and diversity in broilers.

Key words: broiler; moderate temperatures; serum brain gut peptide; caecal microflora

0 引言

【研究意义】 应激可改变脑肠轴功能和肠道菌群结构^[1], 其中热应激是影响畜禽健康最为主要的环境影响因素之一。**【前人研究进展】** 笔者所在课题组近年来初步探讨了偏热环境对肉鸡生理、行为、物质代谢、肠道菌群和生产性能等方面的影响。研究发现, 26 和 30°C 偏热处理影响肉鸡休息行为且 30°C 偏热处理显著升高肉鸡体核温度^[2]; 持续偏热处理 (26 和 31°C) 影响肉鸡糖脂代谢及禽类解偶联蛋白 (av UCP) mRNA 表达, 降低肉鸡生长性能, 且不同偏热程度对肉鸡影响程度不同^[3]; 持续偏热处理 (26 和 31°C) 与 21°C 相比, 降低肉鸡盲肠菌群多样性^[4]。脑肠肽是一类同时存在于中枢神经系统和胃肠道的胃肠肽类激素, 以旁分泌、自分泌或内分泌等形式作用于胃肠效应细胞^[5], 调控着肠道运动、感觉、分泌等

功能, 由血液所携带的脑肠肽是胃肠道向脑内传递的重要化学信号。现已发现 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、血管活性肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、P 物质 (substance P, SP) 等脑肠肽与胃肠活动相关^[6]。脑肠肽影响肠道菌群的多样性, VIP 可以改善肠道微环境, 促进肠道有益菌的定植^[7]。反过来, 肠道菌群及其代谢产物也影响脑肠肽的分泌^[8], 如产芽孢细菌 (SP) 及其代谢产物短链脂肪酸 (SCFA)^[9-10] 可以影响 5-HT 的产生; 肠道菌群紊乱可导致 5-HT 水平的失衡, 而利用益生菌制剂后可以明显缓解 5-HT 的失衡^[11]。可见, 脑肠肽分泌与肠道菌群多样性之间存在着相互影响的关系。另外也发现, 不同变温模式对脑肠肽和菌群的影响不一样, 如长期热应激 (31 \pm 1.5°C) 影响胆囊收缩素 (CCK) 的表达^[12]。急性热应激 (35 \pm 1°C) 发生时, 脑肠肽 (如促生长素 Ghrelin 和 CCK) 在对食欲的调节发挥重要的作用,

尤其是腺胃、十二指肠和空肠中增加 Ghrelin 是导致采食量降低的重要原因^[13]。【本研究切入点】目前有关环境温度对肉鸡肠道菌群的影响大多集中于 32℃ 以上且通常采用恒温模式，但实际养殖过程中多数情况下环境温度都不是恒定的；近年来，主要研究热应激下脑肠肽（CCK 与 Ghrelin 等）对机体摄食行为的控制作用，而有关环境温度对肉鸡血清脑肠肽 5-HT、VIP 和 SP 影响的相关研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本试验通过检测肉鸡血清脑肠肽的含量与盲肠菌群 16SrDNA DGGE 图谱分析，探讨日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽和盲肠菌群多样性的变化。

1 材料与方法

研究于 2016 年 10—11 月在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室昌平基地的人工环境控制舱完成。

1.1 试验动物与饲养管理

选取 22d 健康、体重相近爱拔益加（AA）肉鸡 120 只，随机分成 2 个处理组，每组 6 个重复，每个重复 10 只鸡（公母各 5 只）。试验在动物营养学国家重点实验室的环境控制舱内进行，温、湿度自动控制（精度±1℃、±7%），无风、24 h 光照。试验肉鸡均采用单层平养，所选用笼具为动物营养学国家重点实验室研发的单层平养笼具^[14]，自由采食与饮水，常规免疫。试验动物所用饲料与文献[2-4]的试验配方一致。

1.2 试验设计

将 2 个处理组的肉鸡转入环境温度为 21℃、相对湿度为 60%的环境控制舱适应 7d。29d 时开始正式试验，试验组环境温度采用 24h 循环变温（26℃-29℃-32℃-29℃-26℃）见表 1，相对湿度为 60%；对照组环境温度恒定为 21℃，相对湿度为 60%，试验条件维持至试验结束，共计 14d。

表 1 环境温度变化时间表
Table 1 Ambient temperature change schedule

| 时间 Time | 温度 Temperature (℃) |
|---------------|--------------------|
| 8: 00-11: 00 | 26 |
| 11: 00-14: 00 | 29 |
| 14: 00-17: 00 | 32 |
| 17: 00-20: 00 | 29 |
| 23: 00-08: 00 | 26 |

1.3 测定指标与方法

1.3.1 血液采集与测定方法 分别于试验第 7 和 14 天，每组随机选取 6 只肉鸡（公母各半，每个重复 1 只肉鸡），肉鸡采用静脉采血，静置 2h 后，3 000r/min 低温离心 10min 吸取血清，至-80℃冰箱保存。

采用酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA），委托北京方程生物科技有限公司测定血清中 5-HT、VIP、SP 的含量。

1.3.2 肠道样品的采集与测定方法

1.3.2.1 盲肠样品的收集 分别于试验第 7 和 14 天，每组随机选取 6 只肉鸡（公母各半，每个重复 1 只肉鸡）剪断颈静脉处死，全身消毒后剖开腹腔，分离肠道，结扎回盲交界处，剪下盲肠迅速移至超净工作台，用无菌剪刀剪开肠壁，收集盲肠内容物，将同一处理组的 6 个样品迅速混匀，装置无菌离心管中，液氮速冻，-80℃保存备用。

1.3.2.2 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增 以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列，引物信息见表 2。

表 2 引物信息
Table 2 Primer information

| 引物 Primer | 序列 Sequence |
|--------------|--|
| 338F | CCTACGGGAGGCAGCAG |
| 518R | ATTACCGCGGCTGCTGG |
| GC338F | CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGCG GGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG |

PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL；dNTPMixture（2.5 mmol·L⁻¹）3.2 μL；ExTaq（5 U·μL⁻¹）0.4 μL；GC-338F（20 μmol·L⁻¹）1 μL；518R（20 μmol·L⁻¹）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 扩增程序为：94℃预变性 5 min；94℃变性 1 min，55℃复性 45 s，72℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72℃延伸 10 min。

PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNAGel Extraction Kit 纯化回收。

PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T-gradient，凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc2000 凝胶成像系统。

1.3.2.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳（DGGE）分析

取 10 μL PCR 的产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。采用变性梯度为 35%—55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 150V 60℃下电泳 5h。

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 完毕后、采用银染法染色、步骤如下：

- a) 固定液（乙醇 50 mL、冰醋酸 2.5 mL、定容 500 mL）固定 15 min；
 - b) Milli-Q 纯水清洗、20 s 和 2 min 各一次；
 - c) 银染液（硝酸银 1 g、37%甲醛 0.75 mL、定容 500 mL）染色 15 min；
 - d) Milli-Q 纯水清洗、20 s 和 2 min 各一次；
 - e) 显色液（氢氧化钠 7.5 g、37%甲醛 2.5 mL、定容 500 mL）显色 5—7 min；
- 最后用终止液（乙醇 50 mL、冰醋酸 2.5 mL、定容 500 mL）终止反应。

表 3 日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽的影响

Table 3 Effect of diurnal variation moderate ambient temperatures on brain gut peptide in broiler chicken .

| 项目 Items | 时间 Time (d) | 温度 Temperature | | P 值 P value |
|-------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|
| | | 21℃ | 26℃-29℃-32℃-29℃-26℃ | |
| 5-羟色胺 5-HT | 7 | 176.63±12.86b | 255.92±49.78a | <0.05 |
| | 14 | 206.31±23.30 | 209.76±29.39 | 0.8259 |
| 血管活性肽 VIP | 7 | 161.87±31.12 | 127.85±23.77 | 0.0592 |
| | 14 | 197.85±18.07a | 73.51±22.16b | <0.05 |
| P 物质 SP | 7 | 6.42±0.91 | 5.44±1.08 | 0.1293 |
| | 14 | 8.70±0.54 | 8.68±1.20 | 0.9607 |

同列数据无字母或相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)
In the same column, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$),while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$)

而对照组和日循环变化偏热环境组肉鸡 VIP 和 SP 并无显著差异。试验第 14 天时，日循环变化偏热环境组肉鸡血清 VIP 含量显著低于对照组 ($P<0.05$)，对照组和日循环变化偏热环境组肉鸡血清 5-HT 和 SP 并无显著差异。

2.2 日循环变化偏热环境对肉鸡肠道菌群多样性的影响

2.2.1 肉鸡肠道菌群 PCR-DGGE 扩增指纹图谱 通过肉鸡肠道菌群 PCR-DGGE 指纹图谱(图 1)可以看出，试验第 7 天，日循环变化偏热环境组较对照组细菌条带数减少 2 条；试验第 14 天，对照组和日循环化偏热环境组细菌条带数相同。

2.2.2 肉鸡肠道菌群结构多样性分析 由表 4 可以

1.3.2.4 DGGE 图谱中优势电泳条带的序列测定 DGGE 凝胶条带回收后，以 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆测序。测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型。每个回收条带选取 3 个克隆进行了序列测定。

1.4 数据处理

试验数据使用 SAS9.2 统计分析软件进行单因素分析 (One-way ANOVA)， $P<0.05$ 为差异显著；采用软件 Quantity One 分析 DGGE 图谱多样性。

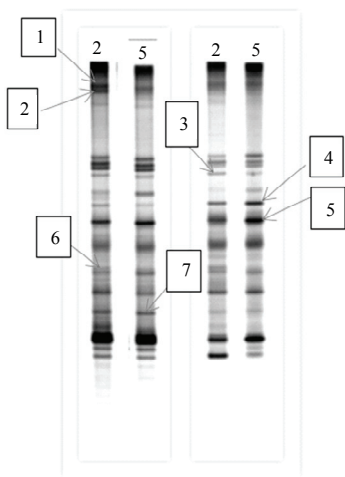
2 结果

2.1 日循环变化偏热环境对肉鸡血清脑肠肽的影响

由表 3 可以看出，试验第 7 天时，日循环变化偏热环境组肉鸡血清 5-HT 含量显著高于 21℃组($P<0.05$)；

看出，试验第 7 天，对照组和日循环化偏热环境组细菌间的相似系数为 79.9%；试验第 14 天，对照组和日循环化偏热环境组细菌间的相似系数为 66.1%；试验第 14 天与第 7 天相比，日循环化偏热环境组细菌间相似系数下降。

2.2.3 肉鸡肠道特异性菌群和共性菌群分析 从肉鸡肠道菌群 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱中分别割胶回收了 2 条特异性条带和 5 条共性条带，由图 1 和表 5 可以看出，试验第 7 天和 14 天肉鸡盲肠内容物中均检测出共性条带：1 号菌条带 (*Clostridium josui*)、3 号菌条带 (*Bacteroides vulgatus*)、4 号菌条带 (*Parabacteroides johnsonii*)、5 号菌条带 (*Bacteroides dorei*) 和 7 号菌条带 (*Ruminococcus*



左图编号 2 代表为试验第 7 天对照组；编号 5 为试验第 7 天日循环变化偏热环境组；右图编号 2 为试验第 14 天对照组；第二个编号 5 为试验第 14 天日循环变化偏热环境组

The left Bands number 2 represents the control group on the 7th day of the experiment; the number 5 represents the heat treatment group on the 7th day of the experiment; the right figure Bands 2 represents the control group on the 14th day of the experiment; the number 5 represents the heat treatment group on the 14th day of the experiment

图 1 肉鸡盲肠内容物 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles generated from chicken cecal contents

表 5 DGGE 图谱中条带的基因片段序列比对

Table 5 Comparison of genomic sequences of bands from DGGE profiles

| 条带编号 | GenBank 数据库中最相近的菌种名称 | 登录号 | 相似度 |
|-----------|---|---------------|----------------|
| Band name | NCBI BLAST matches | Access number | Similarity (%) |
| 1 | <i>Clostridium josui</i> | NR_112037.1 | 91% |
| 2 | <i>Intestinimonas butyriciproducens</i> | NR_118554.1 | 97% |
| 3 | <i>Bacteroides vulgatus</i> | NR_074515.1 | 99% |
| 4 | <i>Parabacteroides johnsonii</i> | NR_041464.1 | 99% |
| 5 | <i>Bacteroides dorei</i> | NR_041351.1 | 99% |
| 6 | <i>Subdoligranulum variabile</i> | NR_028997.1 | 90% |
| 7 | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | NR_025931.1 | 93% |

从测序结果可见，7 条菌群序列均分布于厚壁菌门（*Firmicutes*）和拟杆菌门（*Bacteroidetes*），与 GenBank 数据库中细菌的同源性绝大多数都在 90% 以上。

3 讨论

3.1 对肉鸡血清脑肠肽的影响

脑肠肽可以直接作用于中枢神经系统，由血液所携带的脑肠肽是胃肠道向脑内传递的重要化学信号，这些信号物质可以通过脑干的最后区直接入脑而作用

表 4 戴斯系数比较 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 4 Resemblance coefficient of PCR-DGGE map (%)

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------|------|------|------|------|
| 1 | 100 | 79.9 | 52 | 68.9 |
| 2 | 79.9 | 100 | 53.4 | 64.6 |
| 3 | 52 | 53.4 | 100 | 66.1 |
| 4 | 68.9 | 64.6 | 66.1 | 100 |

1: 试验第 7 天对照组；2: 试验第 7 天日循环变化偏热环境组；3: 试验第 14 天对照组；4: 试验第 14 天日循环变化偏热环境组

1: Control group 7 d; 2: Treatment group 7 d; 3: Control group 14 d; 4: Treatment group 14 d

flavefaciens)；日循环变化偏热环境处理后，肠道菌群发生变化，试验第 14 天较第 7 天，日循环化偏热环境组 1、3 和 7 号菌条带丰富度下降而 4 号和 5 号菌条带丰富度显著增加；且试验第 14 天日循环化偏热环境组并未检测出 2 号菌条带（*Intestinimonas butyriciproducens*）和 6 号菌条带（*Subdoligranulum variabile*）

化而引起肠道菌群的变化。

血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 是一种非胆碱能非肾上腺素能抑制系统的神经递质, 对胃肠活动起抑制性调节作用, 引起全胃肠环形肌松弛^[16]。研究报道, 血管活性肠肽分泌神经元可刺激胰液和肠液分泌, 保护肠黏膜, 调节胃肠吸收^[17]。此外还能改善肠黏膜组织微循环及内环境, 为肠上皮细胞提供营养物质和氧, 并清除过多的氧自由基等有害物质^[18]。有研究表明, VIP 含量减少, 对肠道动力的抑制作用减小, 致使肠道蠕动增强, 改变肠道内环境。本试验结果得出, 试验第 7 天和 14 天, 日循环变化偏热环境组肉鸡血清 VIP 均低于对照组。从以上相关研究结果可以认为, 本试验血管活性肠肽的下降可能将导致肠道内环境及菌群结构的变化。

P 物质 (substance P, SP) 本身又是一种速激肽, 可增加胃肠蠕动, 强烈促消化道平滑肌收缩, 加强结肠的集团推进运动, 刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质, 使胃肠道的血管扩张, 通透性增高, 血浆外渗, 并参与炎症过程和免疫反应^[19]。该研究结果发现, 试验第 7 和 14 天, 两组肉鸡血清 SP 并无显著差异。

3.2 对肉鸡盲肠菌群多样性的影响

早先研究表明肉鸡盲肠肠道内含有复杂的微生物菌群^[20-23], 主要以厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为主, 其次为变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*)^[24-25]。而家禽在生长发育过程中, 温度过高改变家禽肠道微生物菌群结构^[26]。研究报道, 持续偏热环境 (26℃和 31℃) 下肉鸡盲肠细菌条带数和菌群多样性下降^[4]。本研究通过对肉鸡盲肠微生物进行图谱条带和多样性分析得出, 第 7 天日循环变化偏热环境组较对照组, 肉鸡盲肠细菌条带数下降, 第 14 天日循环变化偏热环境组和对照组细菌条带数相同但细菌间相似性下降, 结果表明日循环变化偏热环境影响肉鸡盲肠菌群平衡, 且随着偏热环境时间的增加, 对菌群结构的影响增大。

据报道, 肉鸡暴露于 34—38℃下, 热应激导致拟杆菌属、柔嫩梭菌属、颤螺菌属、梭菌属、考拉杆菌属、萨特氏菌属、*Dorea* 丰度比例降低; 而毛螺旋菌科和瘤胃菌科的瘤胃球菌属、厌氧原体属、*Anaerotruncus*、*Blautia*、*Eubacterium*、*Butyricimonas* 丰度比例增加^[27]。本研究发现试验第 14 天日循环变化偏热环境组 *Clostridium josui*、*Bacteroides vulgatus* 和

Ruminococcus flavefaciens 丰度下降而 *Parabacteroides johnsonii* 和 *Bacteroides dorei* 丰度显著增加, 同时日循环变化偏热环境组不利于 *Intestinimonas butyriciproducens* 和 *Subdoligranulum variabile* 的定植。*Parabacteroides* 和 *Bacteroides* 属于拟杆菌门, 拟杆菌门是肠道革兰氏阴性菌中数量最大的一类细菌, 产降解植物细胞壁的酶, 参与植物细胞壁的降解, 从而与肠道的消化功能有关。*Clostridium josui*、*Ruminococcus flavefaciens* 和 *Subdoligranulum variabile* 属于厚壁菌门, 研究表明, 后肠微生物区系中的优势菌群是厚壁菌门, 其含量大约占 60%—70%, 其中丁酸盐产生菌对肠上皮细胞的发育具有重要作用^[28], 而宿主肠道内丁酸盐产生菌大多来自厚壁菌门中的柔嫩梭菌类群 (*Clostridium leptum*, *Clostridial clusters IV*) 和球状梭菌类群 (*Clostridium coccoides*, *Clostridial clusters XIVa*)。瘤胃球菌 (*Ruminococcus faecis*) 是最重要的一种可水解纤维素的细菌, 它通过一系列可被纤维素衍生物抑制的作用机制吸附在纤维素上, 进而参与纤维素的降解消化, 在肠道的消化功能上起到重要作用^[29]。*Intestinimonas butyriciproducens* 在肉鸡肠道内的作用机制有待进一步研究探讨。

3.3 盲肠菌群多样性与脑肠肽分泌的关系

肠道内既定植着 400—1 000 种细菌, 总数达一百万亿, 是人体自身细胞总数的 10 倍^[30-31], 这些细菌具有维持宿主肠道微生态平衡、调节肠道动力、提高免疫功能、影响营养物质的吸收等多种重要的生理功能^[32-36]; 同时肠道也是人体最大的内分泌器官, 能分泌胃泌素、胃动素、胆囊收缩素等多种肽类激素。有研究表明^[7-11], 肠道菌群结构和种类与脑肠肽分泌之间存在相互影响的关系。5-HT 的产生受到肠道菌群及其代谢产物影响, 特别是产芽孢细菌 (SP) 和短链脂肪酸 (SCFA)^[8-9]。宿主肠道内 SCFA 丁酸盐产生菌大多来自厚壁菌门中的柔嫩梭菌类群, 而丁酸盐产生菌对肠上皮细胞的发育具有重要作用; 来自健康老鼠和人类微生物群的固有的 SP 促进结肠 EC 产生 5-HT^[37]。据报道, 在生命早期缺乏菌群的时候, 会导致血浆色氨酸水平的升高^[38]。还有研究表明双歧杆菌可以影响色氨酸的代谢^[39], 口服婴儿双歧杆菌可诱导大鼠神经递质多巴胺、5-HT 血浆浓度升高^[40]。肠道菌群紊乱可导致 5-HT 水平的失衡, 而利用益生菌制剂后可以明显缓解 5-HT 失调的症状^[11]。反过来, 脑肠肽也会影响菌群的多样性。VIP 可以改善肠道微环境, 减少脂多糖对肠黏膜的损伤, 促进有益菌的定

植使菌群比例恢复正常^[7]。以上结果说明,本试验得出的 5-HT 和 VIP 含量的变化与肉鸡菌群多样性的变化是有关的,但是 5-HT 含量的增加和 VIP 含量降低与细菌菌群结构变化 (*Parabacteroides johnsonii* 和 *Bacteroides dorei* 的增加,以及 *Intestinimonas butyriciproducens* 和 *Subdoligranulum variabile* 的减少)的确切关系还需进一步研究。

4 结论

4.1 日循环变化偏热环境升高血清 5-HT 含量,降低血清 VIP 含量。

4.2 日循环变化偏热环境降低肉鸡盲肠细菌多样性,改变菌群结构,促进 *Parabacteroides johnsonii* 和 *Bacteroides dorei* 的生长,抑制 *Intestinimonas butyriciproducens* 和 *Subdoligranulum variabile* 的定植。且随着日循环偏热环境作用时间的延长,肉鸡盲肠菌群相似性差异增大。

References

- [1] SUN Y, ZHANG M, CHEN C C, III M G, SUN X, ELZAATARI M, HUFFNAGLE G B, YOUNG V B, ZHANG J J, HONG S C, MING Y. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology*, 2013, 144(7): 1478-1487.
- [2] 胡春红, 张敏红, 冯京海, 苏红光, 张少帅. 偏热刺激对肉鸡休息行为, 生理及生产性能的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2070-2076.
HU C H, ZHANG M H, FENG J H, SU H G, ZHANG S S. Effects of thermal stimulation on behavior of resting posture, physiology and performance in broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2070-2076. (in Chinese)
- [3] 甄龙, 石玉祥, 张敏红, 冯京海, 张少帅, 彭骞骞. 持续偏热环境对肉鸡生长性能, 糖脂代谢及解偶联蛋白 mRNA 表达的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2060-2069.
ZHEN L, SHI Y X, ZHANG M H, FENG J H, ZHANG S S, PENG Q Q. Effects of constant moderate temperatures on performance, glucose and lipid metabolism, expression of uncoupling protein of broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2060-2069. (in Chinese)
- [4] 彭骞骞, 王雪敏, 张敏红, 冯京海, 甄龙, 张少帅. 持续偏热环境对肉鸡盲肠菌群多样性的影响. *中国农业科学*, 2016, 49(01): 186-194.
PENG Q Q, WANG X M, ZHANG M H, FENG J H, ZHEN L, ZHANG S S. Effects of constant moderate temperatures on Cecal microflora diversity of broilers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(01): 186-194. (in Chinese)
- [5] 陆英杰, 连至诚. 胃肠激素对胃肠动力的影响. *免疫学杂志*, 2008 (z1): 94-96.
LU Y J, LIAN Z C. Effects of gastrointestinal hormones on gastrointestinal motility. *Immunological Journal*, 2008 (z1): 94-96. (in Chinese)
- [6] 陈倩. 隔药灸脐法对脾气虚型肠易激综合征患者血清脑肠肽影响的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2004.
CHEN Q. Clinical study on patient's blood serum brain-gut peptides with herbs-isolated umbilical moxibustion in treating Irritable Bowel Syndrome of Spleen Qi-deficiency Type[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2004. (in Chinese)
- [7] CAMPOS-SALINAS J, CAVAZZUTI A, O'VALLE F, FORTELAGO I, CARO M, BEVERLEY S M, DELGADO M. Therapeutic efficacy of stable analogues of vasoactive intestinal peptide against pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(21): 14583-14599.
- [8] LYTE M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(11): e1003726.
- [9] YANO J M, YU K, DONALDSON G P, SHASTRI G G, MA L, HSIAO E Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 2015, 161(2): 264-276.
- [10] REIGSTAD C S, SALMONSON C E, RAINEY III J F, LINDEN D R, SONIYENGURG J L, KASHYAP P C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, 2014, 29(4): 1395-1403.
- [11] SJÖGREN K, ENGBAHL C, Henning P. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012, 27(6): 1357-1367.
- [12] SONG Z, LIU L, SHEIKHAHMADI A, JIAO H C, LIN H. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *BioMed Research International*, 2012, 2012.
- [13] 姚泰, 吴博威. 生理学. 第六版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
YAO T, WU B W. *Physiology*. Sixth Edition. Beijing: People's Health Press, 2004. (in Chinese)
- [14] 张敏红, 苏红光, 冯京海. 采集用于建立肉鸡生活环境舒适性评价模型数据的方法和专用装置: 中国, CN103404447A[P]. 2015-11-18.

- ZHANG M H, SU H G, FENG J H, TANG X F. The method of collecting chickens living environment for establishing comfort evaluation model data and special equipment: China, CN103404447A [P]. 2015-11-18. (in Chinese)
- [15] WANG L, ZHOU L, TIAN R. Role of the area postrema of medullaoblongata in the regulation of canine interdigesting migrating motorcomple. *Chinese Medical Journal*, 2002, 115(3) : 384-388.
- [16] 崔莉红. 胃肠激素对结肠运动的调节作用. 医学综述, 2008, 14(3): 380-382.
- CUI L H. Effect of gastrointestinal hormones on colonic motility. *Medical Review*, 2008, 14(3): 380-382. (in Chinese)
- [17] NUSSDORFER G G, MALENDOWICZ L K. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo—pituitary—adrenal axis. *Peptides*, 1998, 19(8): 1443-1467.
- [18] 吴美玉, 胡团敏. 血管活性肠肽与消化系统疾病的研究进展. 世界华人消化杂志, 2012, 20(16): 1453-1457.
- WU M Y, HU T M. Research progress of vasoactive intestinal peptide and digestive system diseases. *World Chinese Journal of Digestology*, 2012, 20(16): 1453-1457. (in Chinese)
- [19] 陈晓敏, 张燕华, 吴跃龙. 肠易激综合征结肠黏膜 P 物质和血管活性肠肽变化的研究. 实用临床医药杂志, 2008, 12(11): 31-33.
- CHEN X M, ZHANG Y H, WU Y L. Changes of colonic substance P and vasoactive intestinal polypeptide in irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Medicine in Pratice*, 2008, 12(11): 31-33. (in Chinese)
- [20] BARNES E M, MEAD G C, BARNUML D A, HARRY E G. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British Poultry Science*, 1972, 13(3): 311-326.
- [21] BARNES E M. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *Journal of Applied Bacteriology*, 1979, 46(3): 407-419.
- [22] MEAD G C, ADAMS B W. Some observations on the caecal micro - flora of the chick during the first two weeks of life. *British Poultry Science*, 1975, 16(2): 169-176.
- [23] SALANITRO J P, FAIRCHILD I G, ZGORNICKI Y D. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Applied Microbiology*, 1974, 27(4): 678-687.
- [24] GONG J, SI W, FORSTER R J, HUANG R, YU H, YIN Y L, YANG C B, HAN Y M. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 59(1): 147-157.
- [25] 王丽凤. 益生菌 L. plantarum P-8 对肉鸡肠道菌群, 肠道免疫和生长性能影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- WANG L F. Effect of probiotic L. plantarum P-8 on gut microbiota, intestinal immunity and growth performance of broiler[D]. Hohhot: Agricultural University of the Inner Mongol, 2014. (in Chinese)
- [26] BURKHOLDER K M, THOMPSON K L, EINSTEIN M E, APPLGATE T J, PATTERSON J A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers. *Poultry Science*, 2008, 87(9): 1734-1741.
- [27] 杨梅梅. 中药复方与益生素对热应激下肉鸡肠道菌群及生长的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- YANG M M. Effect of Traditional Chinese Medicine Compound and probiotics on the intestinal bacteria and growth performance of broiler under heat stress[D]. Dissertation for Master degree. Guangzhou: Agricultural University of South China, 2016. (in Chinese)
- [28] PRYDE S E, DUNCAN S H, HOLD G L, STEWART C S, FLINT H J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 217: 133-139.
- [29] MORRIS E J, COLE O J. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *Microbiology*, 1987, 133(4): 1023-1032.
- [30] QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF K S, MANICHANH C, MENDE D R. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59.
- [31] LEY R E, PETERSON D A, GORDON J I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848.
- [32] BROWN E M, SADARANGANI M, FINLAY B B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology*, 2013, 14(7): 660.
- [33] TATTOLI I, PETITTA C, SCIROCCO A, AMMDSCATO F, CICENI A, SEVERI C E. Microbiota, innate immune system, and gastrointestinal muscle: ongoing studies. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2012, 46: S6-S11.
- [34] YU X Y, YIN H H, ZHU J C. Increased gut absorptive capacity in rats

- with severe head injury after feeding with probiotics. *Nutrition*, 2011, 27(1): 100-107.
- [35] SUN B, HU C, FANG H, ZHU L, GAO N, ZHU J. The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal smooth muscle contraction through PKC/MLCK/MLC signaling pathway in TBI mouse model. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128214.
- [36] TAN M, ZHU J C, DU J, ZHANG L M, YIN H H. Effects of probiotics on serum levels of Th1/Th2 cytokine and clinical outcomes in severe traumatic brain-injured patients: a prospective randomized pilot study. *Critical Care*, 2011, 15(6): R290.
- [37] TSAVKELOVA E A, KLIMOVA S Y, CHERDYNTSEVA T A, NETRUSOV A I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, 42(3): 229-235.
- [38] 白宇, 胡云霞, 陈俊伟, 于希忠, 方南元. 细菌-脑-肠轴理论体系的建立. 东南大学学报: 医学版, 2016, 35(5): 781-785.
- BAI Y, HU Y X, CHEN J W, YU X Z, FANG N Y. Establishment of a theory system of bacterial brain gut axis. *Journal of Southeast University: Medical Edition*, 2016, 35(5): 781-785. (in Chinese)
- [39] DESBONNET L, GARRETT L, CLARKE G, BIENENSTOCK J, DINAN T G. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, 2008, 43(2): 164-174.
- [40] DESBONNET L, GARRETT L, CLARKE G, KIELY B, CRYAN J F, DINAN T G. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 2010, 170(4): 1179-1188.
- (责任编辑 林鉴非)