



周子琳,李盛,沈丹,等. 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部炎症损伤的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):323-333.  
ZHOU Zilin,LI Sheng,SHEN Dan, et al. Effects of pulmonary microbiota intervention on PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammatory injury in broilers[J].  
Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(2):323-333.

## 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部炎症损伤的影响

周子琳,李盛,沈丹,李春梅\*

(南京农业大学动物科技学院家畜环境控制与智慧生产研究中心,江苏 南京 210095)

**摘要:**[目的]本试验旨在研究肺部菌群对 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部炎症损伤的影响,并利用盲肠肠球菌处理肺泡上皮细胞,探究肺部盲肠肠球菌在 PM<sub>2.5</sub> 诱发肺部炎症损伤中的作用。[方法]选取 45 只 19 日龄雄性 AA 肉鸡随机分为 3 组:对照组、PM<sub>2.5</sub> 组(PM)和肺部菌群干预组(ABX-PM)。从 21 日龄开始,ABX-PM 组肉鸡气管滴注抗生素消减肺部菌群,每天滴注 1 次,连续滴注 3 d,其他 2 组肉鸡气管滴注无菌生理盐水。在 24 和 26 日龄时,分别向 PM 组和 ABX-PM 组肉鸡气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 悬浮液诱导肺部炎症损伤,对照组肉鸡气管滴注无菌生理盐水。在最后一次气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 24 h 后对肉鸡进行称重,并采集肺组织、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)和血清样品。检测 BALF 和血清内炎症因子水平、肺组织内紧密连接(tight junctions,TJ)蛋白基因表达水平以及肠球菌属和盲肠肠球菌相对含量,并进行盲肠肠球菌相对含量与炎症因子水平的相关性分析。另外,体外培养 A549 细胞并分为 2 组,对照组加入不含盲肠肠球菌的 DMEM/F12 培养基,处理组加入含有 1×10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 盲肠肠球菌的 DMEM/F12 培养基。处理 6 h 后,检测 2 组细胞炎症因子、TJ 及细胞凋亡相关基因表达水平。[结果]与对照组相比,PM 组肉鸡 BALF 和血清 IL-8 水平显著升高,而 ABX-PM 组差异不显著;与对照组相比,PM 组肉鸡肺组织 *occludin* 及 *claudin-1* mRNA 表达水平显著降低,*claudin-5* mRNA 表达水平显著升高,而 ABX-PM 组差异不显著;PM 组肉鸡肺部肠球菌属和盲肠肠球菌的相对含量显著高于对照组和 ABX-PM 组;肺部盲肠肠球菌相对含量与 BALF 内 IL-1β、IL-6、IL-8 水平和血清内 IL-1β 水平呈显著正相关关系。体外细胞试验结果显示,与对照组相比,处理组 A549 细胞 *tnf-α*、*il-1β*、*il-6* 及 *il-8* mRNA 表达水平显著升高,*il-10* mRNA 表达水平显著降低;处理组 A549 细胞 *zo-1* 及 *claudin-1* mRNA 表达水平显著降低;处理组 A549 细胞 *bax/bcl-2* mRNA 表达水平的比值及 *caspase-3* mRNA 表达水平显著升高,*bcl-2* mRNA 表达水平显著降低。[结论]肺部菌群干预降低了 PM<sub>2.5</sub> 诱导的盲肠肠球菌增殖,减轻了肉鸡肺部炎症损伤程度,表明肺部菌群参与 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部炎症损伤的过程;另外,盲肠肠球菌能够诱导体外肺泡上皮细胞炎症反应,提示肺部菌群失衡加剧肺部炎症损伤。

**关键词:**肺部菌群;肺部炎症;肉鸡;盲肠肠球菌;肺泡上皮细胞

中图分类号:S852

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)02-0323-11

## Effects of pulmonary microbiota intervention on PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammatory injury in broilers

ZHOU Zilin,LI Sheng,SHEN Dan,LI Chunmei\*

(Research Center for Livestock Environmental Control and Smart Production, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**[Objectives] This study aimed to investigate the effect of the pulmonary microbiota on PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammatory injury in broilers and to explore the role of *Enterococcus cecorum* on PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammatory injury using *E. cecorum*-treated alveolar epithelial cells. [Methods] A total of forty-five male AA broilers (19-day-old) were randomly divided into three groups: the control group, the PM<sub>2.5</sub> group (PM), and the pulmonary microbiota-intervened group (ABX-PM). From 21 days of age, broilers in the ABX-PM group were intratracheally instilled with antibiotics once a day for three days. Meanwhile, broilers in the other two groups were simultaneously instilled with sterile saline. At 24 and 26 days of age, broilers in the PM and ABX-PM groups were intratracheally instilled with PM<sub>2.5</sub> suspension to induce lung inflammatory injury, and broilers in the control group were simultaneously instilled with sterile saline. Twenty-four hours after the last intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub>, we weighed the broilers and collected lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and serum samples. We measured the levels of inflammatory factors in BALF and serum. Besides, we measured the gene expression levels of tight junctions (TJ) protein, the relative content of

收稿日期:2023-03-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32072781)

\*通信作者:李春梅,教授,主要从事养殖环境与畜禽健康相关研究,E-mail:chunmeili@njau.edu.cn。

*Enterococcus* spp. and *E. cecorum* in the lung tissue, and the correlation between the relative content of *E. cecorum* and inflammatory factor levels. In addition, type II alveolar epithelial cells (A549) were cultured and divided into two groups. The control group was treated with DMEM/F12 medium without *E. cecorum*, while the *E. cecorum* treatment group was treated with DMEM/F12 medium containing  $1 \times 10^4$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> *E. cecorum*. We compared the gene expression levels of inflammatory factors, TJ, and apoptosis between the two groups after 6 h of treatment. [Results] The levels of IL-8 in BALF and serum, as well as the mRNA expression levels of *occludin* and *claudin-1* in lung tissue, were significantly higher in the PM group than those in the control group. The *claudin-5* mRNA expression level was significantly lower in the PM group than the control group, but the above indicators were not statistically different in the ABX-PM group compared to the control group. The relative contents of *Enterococcus* spp. and *E. cecorum* in the PM group were significantly higher than those in the control and ABX-PM groups. The relative content of *E. cecorum* was significantly positively correlated with the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 in BALF and IL-1 $\beta$  in serum. In the cellular experiment, the mRNA expression levels of *tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$* , *il-6*, and *il-8* were significantly higher, while the mRNA expression level of *il-10* was significantly lower in the *E. cecorum* treatment group than those in the control group. The mRNA expression levels of *zo-1* and *claudin-1* in the *E. cecorum* treatment group were significantly higher than those in the control group. The ratio of *bax/bcl-2* mRNA expression levels and the mRNA expression level of *caspase-3* were significantly higher, while the mRNA expression level of *bcl-2* was significantly lower in the *E. cecorum* treatment group than those in the control group. [Conclusions] The pulmonary microbiota intervention reduced PM<sub>2.5</sub>-induced proliferation of *E. cecorum*, and alleviated the degree of lung inflammatory injury in broilers, indicating the involvement of pulmonary microbiota in the process of PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammation injury in broilers. Moreover, *E. cecorum* could induce an inflammatory response in alveolar epithelial cells, which suggested that the imbalance of pulmonary microbiota aggravated lung inflammation injury.

**Keywords:** pulmonary microbiota; lung inflammation; broiler; *Enterococcus cecorum*; alveolar epithelial cells

封闭式集约化养殖模式导致舍内高浓度的直径小于或等于 2.5  $\mu$ m 的细颗粒物 (fine particulate matter, PM<sub>2.5</sub>) 严重威胁畜禽呼吸道健康。由于粒径极小, PM<sub>2.5</sub> 能够穿过呼吸道并沉积在支气管和肺泡处。其表面吸附的大量有机化合物、重金属和微生物等物质, 不仅危害肺部健康, 甚至可以穿过气血屏障进入血液循环, 进一步影响机体免疫功能<sup>[1]</sup>。饲养在高浓度 PM<sub>2.5</sub> 环境下的肉鸡极易患肺炎和气管炎等呼吸道疾病, 导致死亡率升高<sup>[2]</sup>。因此, 阐明 PM<sub>2.5</sub> 诱发肉鸡肺部炎症损伤的机制对于维持畜禽呼吸道健康以及防治呼吸道疾病具有重要意义。

PM<sub>2.5</sub> 进入呼吸道后可以刺激肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞和内皮细胞分泌多种促炎症细胞因子和趋化因子, 进而引发炎症损伤<sup>[3]</sup>。除这些途径外, 肺部菌群的发现为揭示 PM<sub>2.5</sub> 诱发肺部炎症损伤的机制提供了新思路。随着非培养法测序技术的发展, 目前已证明健康的肺部也存在多样化的细菌群落, 且肺部菌群与宿主免疫系统之间维持动态平衡<sup>[4]</sup>。肺部菌群失衡会破坏这种稳态, 降低宿主免疫功能。此外, 肺部炎症、哮喘、慢性阻塞性肺病和肺癌等呼吸道疾病发生时往往伴随着肺部菌群失衡<sup>[5]</sup>。近期研究发现, PM<sub>2.5</sub> 在诱导肺部炎症损伤的同时, 肺部菌群的组成和结构也发生了明显改变<sup>[6-7]</sup>, 提示肺部菌群可能在 PM<sub>2.5</sub> 引起肺部炎症损伤的过程中发挥重要作用。

本课题组前期研究结果发现, 鸡舍来源的 PM<sub>2.5</sub> 不仅诱导肉鸡发生肺部炎症损伤, 肺部菌群的组成和结构也出现明显紊乱<sup>[7]</sup>。肉鸡肺部肠球菌属 (*Enterococcus* spp.) 相对丰度在暴露于 PM<sub>2.5</sub> 后显著上升, 其中盲肠肠球菌 (*E. cecorum*) 相对丰度升高最为显著, 由 2.32% 升高至 10.25% (数据未发表)。盲肠肠球菌最初在鸡的肠道中被分离、鉴定, 是雏鸡肠道菌群的主要组成部分, 但其同时是一种致病力极强的条件致病菌, 能够引起肉鸡关节炎和脊柱炎等多种疾病<sup>[8]</sup>。呼吸道感染盲肠肠球菌能够引起家禽的肺炎和气囊炎, 且该传染模式导致的发病率及死亡率要明显高于口服、静脉接种等其他传染模式<sup>[9]</sup>, 这些提示肺部盲肠肠球菌丰度的升高可能在 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部发生炎症损伤中发挥重要作用, 值得进一步探索。

本研究采用气管滴注抗生素方法干预肉鸡肺部菌群, 降低肉鸡肺部菌群整体丰度, 通过对比正常肺部菌群肉鸡与肺部菌群干预肉鸡在 PM<sub>2.5</sub> 暴露后肺部炎症损伤的程度, 明确肺部菌群对 PM<sub>2.5</sub> 诱导肉鸡肺部炎症损伤的影响, 并进一步利用 II 型肺泡上皮细胞, 探究盲肠肠球菌对肺泡上皮细胞炎症反应的影响。本研究为防治肉鸡呼吸道疾病提供了科学依据, 为畜禽产业安全高效生产奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

硫酸链霉素 (S8290)、恩诺沙星 (E8761)、头孢噻唑钠 (SC9960)、琼脂粉 (A8190) 及三抗 (青霉素、链

霉素、庆大霉素,P1410)购自索莱宝公司;炎症因子 IL-1 $\beta$  (H002-1-2)、IL-6 (H007-1-1)、IL-8 (H008) ELISA 试剂盒及 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (G020-1-1) 购自南京建成公司;脑心浸液肉汤 (brian heart infusion, BHI) 培养基 (HB8297-1) 购自青岛海博公司;DMEM/F12 培养基 (11320033) 及 0.25% Trypsin-EDTA (25200072) 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 (TBD21HY) 购自天津灏洋公司;二甲基亚砜 (DMSO, BS087) 购自 Biosharp 公司;Trizol (R401-01) 购自南京诺唯赞公司;TIANamp 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (DP304) 购自北京天根公司;ABScript III RT Master Mix for qPCR with gDNA Remove (RK20429) 和 ABScript II One Step SYBR Green RT-qPCR (RK20404) 试剂盒购自 ABclonal 公司。

## 1.2 PM<sub>2.5</sub>的收集与制备

PM<sub>2.5</sub>收集自江苏省扬州市某平养肉鸡舍中,使用环境空气颗粒物采样器将鸡舍空气内的 PM<sub>2.5</sub>收集于特氟隆纤维膜表面,在制备 PM<sub>2.5</sub>前将纤维膜于-20 °C 条件下保存。将纤维膜剪为小块后浸泡在装有超纯水的烧杯中,将烧杯置于超声波振荡仪内,频率为 80 Hz,振荡 30 min。使用 6 层无菌纱布过滤振荡后的液体,再于 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 30 min。收集沉淀并利用真空冷冻干燥器干燥过夜,称重干燥后的 PM<sub>2.5</sub>,并将 PM<sub>2.5</sub>溶于无菌生理盐水中,配制成 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 PM<sub>2.5</sub>悬浮液,保存于 4 °C 备用。

## 1.3 肺部菌群干预试验

采用 1 日龄雄性 AA 肉鸡,试验期间根据肉鸡饲养标准手册调节温度、相对湿度及光照等环境条件,所有肉鸡自由采食和饮水,饲喂的商品饲料符合 NRC (2012) 标准。肉鸡饲养至 19 日龄时,选取 45 只健康状态良好、体重相近 [(1.19±0.06) kg] 的肉鸡随机均分为 3 组:对照组 (Con)、PM<sub>2.5</sub>组 (PM) 和肺部菌群干预组 (ABX-PM),每只鸡佩戴脚环标记。在 21 日龄时,肺部菌群干预组肉鸡气管滴注抗生素 (抗生素滴注浓度为 5.25 mg·kg<sup>-1</sup> 恩诺沙星、13.13 mg·kg<sup>-1</sup> 硫酸链霉素和 2.10 mg·kg<sup>-1</sup> 头孢噻唑钠),每天气管滴注 1 次,连续滴注 3 d,每次滴注间隔 24 h,其他 2 组肉鸡同时气管滴注等体积的无菌生理盐水。在 24 和 26 日龄时,PM<sub>2.5</sub>组和肺部菌群干预组的肉鸡气管滴注 2.10 mg·kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> (即每只鸡每次气管滴注 2.5 mg PM<sub>2.5</sub>),对照组肉鸡同时气管滴注等体积的无菌生理盐水。2 次气管滴注间隔 48 h,在最后一次气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 24 h 后采集样品。PM<sub>2.5</sub>的气管滴注剂量根据肉鸡潮气量 (13.7 mL)、呼吸频率 (54.4 次·min<sup>-1</sup>)<sup>[10]</sup> 和本课题组前期研究确定的全身暴露浓度 (2 mg·m<sup>-3</sup>,共暴露 28 h)<sup>[7]</sup> 计算得到,2.5 mg PM<sub>2.5</sub>可诱导肉鸡肺部炎症损伤。因此,每次气管滴注 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 PM<sub>2.5</sub>悬液 0.5 mL,即每次气管滴注 2.5 mg PM<sub>2.5</sub>,共滴注 2 次。

## 1.4 肉鸡样品采集

肺部菌群干预试验期间每天称量并记录料重,用于计算采食量。在最后一次气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 24 h 后对肉鸡称重及采样。每组随机选取 6 只鸡采集翅下静脉内血液,室温静置后于 4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min,吸取血清并保存于-80 °C 备用。每组随机选取 8 只肉鸡麻醉后屠宰,采集肺组织,剪碎后放入无菌冻存管内,保存于-80 °C,用于后续试验。在每组剩余的未采集肺组织样品的肉鸡中随机选取 6 只用于收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。在 30 mL 注射器的头部连接软管,制成灌洗针。麻醉肉鸡,去除其颈部皮肤和肌肉后在气管处剪开一个小口,将灌洗针插入小口内,向肺中缓慢注入 30 mL 预冷的无菌生理盐水。反复抽吸 3 次后将 BALF 收集在无菌 50 mL 离心管中,保存于-80 °C 备用。

## 1.5 BALF 及血清中细胞因子水平的测定

使用 ELISA 试剂盒测定 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平及血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 水平,操作步骤参考说明书进行。在测定 BALF 中炎症因子水平前,将 BALF 于 4 °C、4 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 15 min,以去除 BALF 内黏液和组织。

## 1.6 肺组织细菌总 DNA 提取及盲肠肠球菌相对含量测定

使用 DNA 提取试剂盒提取肺部菌群总 DNA,操作步骤参考说明书进行。查找文献内肠球菌属 (*Enterococcus* spp.) 和盲肠肠球菌 (*E. cecorum*) 引物序列,经过 primer-BLAST 验证后由上海生工生物工程有限公司合成引物。采用 SYBR Green RT-qPCR 试剂盒进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 反应,反应程序根据试剂盒说明书进行设置。反应结束后,以 16S rDNA 为对照,用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算不同处理组肉鸡肺部肠球菌属和盲肠肠球菌的相对含量。具体基因引物序列如表 1 所示。

表 1 细菌荧光实时定量 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR of bacteria

基因 Genes	引物序列 Primer sequences(5'→3')	参考文献 References
<i>16S</i>	ACTCTACGGGAGGCAGCAG/GGACTACHVGGGTWTCTAAT	[7]
<i>Enterococcus</i>	GGACGNAAGTCTGACCGA/TTAAGAAACCGCCTGCGC	[11]
<i>E. cecorum</i>	TTCCATTTACCGCATGCTAGATGGAT/ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG	[12]

### 1.7 盲肠肠球菌生长曲线测定

盲肠肠球菌(CICC 21607)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。挑取盲肠肠球菌单菌落接种于 1 mL BHI 培养基中,于 37 °C 培养过夜。将菌液  $D_{600}$  值调节为 0.5 后按 1:100 的比例将菌液接种在新鲜的 100 mL BHI 培养基中。分别在培养 0、1.5、3、5、7、9、11、13、15 和 17 h 时取菌液,测定  $D_{600}$  值并绘制生长曲线。

### 1.8 A549 细胞培养及 MTT 试验

A549 细胞培养采用 DMEM/F12 完全培养基(含 10% 胎牛血清,另添加  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三抗),培养于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下,湿度设置为 70%~80%。根据培养基颜色变化程度进行细胞换液,当培养瓶内细胞融合度达到 90% 时,进行细胞传代。

进行 MTT 试验时,按照每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度将 A549 细胞接种于 96 孔板,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。吸出孔内培养基,用 37 °C 预热的 PBS 溶液轻轻冲洗孔内细胞 2 次后,加入含有不同浓度盲肠肠球菌( $0.1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 DMEM/F12 完全培养基,分别处理 4、6 和 8 h 后吸出孔内原有培养基,用 37 °C 预热的 PBS 溶液轻轻冲洗孔内细胞 3 次。冲洗后每孔加入 DMEM/F12 完全培养基(添加  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三抗)并加入  $50 \mu\text{L} 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MTT,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 4 h。孵育完成后吸出孔内液体,加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO,于摇床上显色 10 min 后检测  $D_{570}$  值。

### 1.9 盲肠肠球菌处理 A549 细胞试验

按照每孔  $3 \times 10^5$  个细胞的密度将 A549 细胞接种于 6 孔板中,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养至细胞融合度达到 80% 以上。吸出培养基,用 37 °C 预热的 PBS 溶液轻轻冲洗孔内细胞 2 次后,处理组(EC)加入含有  $1 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  盲肠肠球菌的 DMEM/F12 完全培养基,对照组(Con)加入不含盲肠肠球菌的 DMEM/F12 完全培养基,分别处理 6 h。每组设置 3 个生物学重复。完成处理后用 4 °C 预冷的 PBS 溶液轻轻冲洗孔内细胞 3 次,收集细胞样品用于后续试验。

### 1.10 RNA 的提取及基因表达水平测定

采用传统 Trizol 试剂法提取肉鸡肺组织及细胞样品总 RNA,并按照反转录试剂盒说明书的标准操作过程将 RNA 反转录为 cDNA,于 -80 °C 保存备用。采用 SYBR Green RT-qPCR 试剂盒检测肉鸡肺组织紧密连接(tight junctions, TJ)相关基因及 A549 细胞炎症因子、TJ 和细胞凋亡相关基因表达量。查找 NCBI 内收录的目的基因引物序列,经过 primer-BLAST 验证后由上海生工生物工程有限公司进行引物合成。RT-qPCR 反应程序根据试剂盒说明书进行设置,反应结束后,以  $\beta$ -actin 为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算 mRNA 相对表达水平。具体基因引物序列如表 2 所示。

表 2 肉鸡肺组织及 A549 细胞荧光实时定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for RT-qPCR of broiler lung tissue and A549 cells

物种 Species	基因 Genes	引物序列 Primer sequences(5'→3')	基因序列号 Accession No.
鸡	$\beta$ -actin	TGCTGTGTTCCCATCTATCG/TTGGTGACAATACCGTGTCA	NM_205518.2
<i>Gallus</i>	<i>occludin</i>	TCGCCTCCATCGTCTACATC/GTCTTACCCACTCCTCCA	XM_046904540.1
<i>gallus</i>	<i>zo-1</i>	CGTAGTCTGGCATTATTCTG/TGGGCACAGCCTCATTCT	XM_046925214.1
	<i>claudin-1</i>	CATACTCCTGGGTCTGGTTGGT/GACAGCCATCCGCATCTTCT	NM_001013611.2
	<i>claudin-4</i>	ATCGCCCTGTCCGTCATC/ACCACGCAATTCATCCACAG	XM_040687592.2
	<i>claudin-5</i>	GTCCCGCTCTGCTGGTTC/CCCTATCTCCCGTCTCTGG	NM_204201.2
人	$\beta$ -actin	GATCTTCATFTGTGGTGGTG/GGGAATTCGTGCGTGACATT	NM_001101.5
<i>Homo</i>	<i>tnf-<math>\alpha</math></i>	AACATCCAACCTTCCCAAACG/GACCCCTAAGCCCCAATTCTC	NM_000594.4
<i>sapiens</i>	<i>il-1<math>\beta</math></i>	AGCTACGAATCTCCGACCAC/CGTTATCCCATGTGTGCAAGAA	NM_000576.3
	<i>il-6</i>	GGCTATTCAGACAGCAGGGAGT/TGCTGTAAAGAGGACTGGGAAA	XM_005249745.6
	<i>il-8</i>	TTGGCAGCCTTCTGATTTC/TATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA	NM_001354840.3

续表 2 Table 2 continued

物种 Species	基因 Genes	引物序列 Primer sequences(5'→3')	基因序列号 Accession No.
	<i>il-10</i>	TTTAAGGGTTACCTGGGTTGC/TTGATGCTCTGGGCTCTGGTTC	NM_000572.3
	<i>occludin</i>	TTTGTGGGACAAGGAACACA/TCATTCACCTTGGCCATTGGA	XM_047416594.1
	<i>zo-1</i>	ATAAAGTGCTGGCTTGGTCTGTTTG/GCACTGCCACCCATCTGTA	XM_047432991.1
	<i>claudin-1</i>	GCAGATCCAGTGCAAAGTCT/CATACACTTTCATGCCAACGG	NM_001317185.2
	<i>e-cadherin</i>	CGAGAGCTACACGTTACCGG/GGGTGTGCGAGGGAAAAATAGG	XM_040687592.2
	<i>bcl-2</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA/ACCTACCCAGCCTCCGTTAT	NM_000657.3
	<i>bax</i>	AGCGACTGATGTCCCTGTCT/CTCAGCCCATCTTCTCCAG	XM_047439168.1
	<i>caspase-3</i>	AGTAGATGGTTTGAGCCTGAGC/GTATGGAGAAATGGGCTGTAGG	XM_047416239.1

注:*β-actin*:β-肌动蛋白基因 β-actin gene;*occludin*:闭合蛋白基因 Occludin gene;*zo-1*:闭锁小带蛋白 1 基因 Zonula occludens 1 gene;*claudin-1*:密封蛋白 1 基因 Claudin-1 gene;*claudin-4*:密封蛋白 4 基因 Claudin-4 gene;*claudin-5*:密封蛋白 5 基因 Claudin-5 gene;*tnf-α*:肿瘤坏死因子 α 基因 Tumor necrosis factor-α gene;*il-1β*:白介素 1β 基因 Interleukin-1β gene;*il-6*:白介素 6 基因 Interleukin-6 gene;*il-8*:白介素 8 基因 Interleukin-8 gene;*il-10*:白介素 10 基因 Interleukin-10 gene;*e-cadherin*:钙黏附蛋白 E 基因 E-cadherin gene;*bcl-2*:B 淋巴细胞瘤 2 基因 B-cell lymphoma-2 gene;*bax*:Bcl-2 关联 X 蛋白基因 Bcl2-associated X gene;*caspase-3*:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 基因 Caspase-3 gene. 下同 The same as follows.

1.11 数据统计与分析

试验数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,2 组数据间采用独立样本 *t* 测验进行差异显著性分析,2 组以上数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)法和 Duncan's 多重比较法进行差异显著性分析。使用 SPSS 23.0 软件进行相关性分析,计算选用 Spearman 法。试验结果以平均值±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )的形式表示。

2 结果与分析

2.1 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡生长性能的影响

由表 3 结果可见:与对照组相比,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡体重和平均日增重在气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后显著降低( $P < 0.05$ );肺部菌群干预组肉鸡与对照组差异不显著( $P > 0.05$ ),但显著高于 PM<sub>2.5</sub>组( $P < 0.05$ )。

表 3 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡生长性能的影响

Table 3 Effects of pulmonary microbiota intervention on growth performance of PM<sub>2.5</sub> exposed broilers

项目 Items	Con	PM	ABX-PM	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
体重/kg Body weight	1.58±0.02 <sup>a</sup>	1.51±0.25 <sup>b</sup>	1.59±0.12 <sup>a</sup>	0.018
平均日增重/g Average daily gain	56.30±1.65 <sup>a</sup>	45.93±2.75 <sup>b</sup>	58.31±2.50 <sup>a</sup>	0.001
平均日采食量/g Average daily feed intake	120.89±2.84	117.50±4.63	121.10±2.39	0.714
料重比 Feed/gain	2.15±0.14	2.52±0.20	2.12±0.11	0.208

注:1)Con:对照组 Control group;PM:PM<sub>2.5</sub>组 PM<sub>2.5</sub> group;ABX-PM:肺部菌群干预组 Pulmonary microbiota-intervened group;2)同行数据的肩标字母不同表示处理组间差异显著( $P < 0.05$ )。Different shoulder letters in the same row indicate significant differences among treatment groups( $P < 0.05$ ). 下同。The same below.

2.2 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡 BALF 及血清炎症因子水平的影响

如图 1 所示:与对照组相比,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡 BALF 内 IL-8 水平在气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后显著升高( $P = 0.02$ ),IL-6 水平呈上升趋势( $P = 0.08$ );而肺部菌群干预组肉鸡 BALF 中 IL-8 水平与对照组差异不显著( $P > 0.05$ ),而 PM<sub>2.5</sub>组呈下降趋势( $P = 0.07$ )。检测肉鸡血清中炎症因子水平结果(图 1-D、E)显示,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡血清内 IL-8 水平在滴注 PM<sub>2.5</sub>后显著高于对照组( $P = 0.04$ ),IL-1β 水平呈上升趋势( $P = 0.05$ ),而肺部菌群干预组肉鸡血清中 IL-8 水平与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。

2.3 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡肺组织紧密连接相关基因表达的影响

由图 2 可知,与对照组相比,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡肺组织 *occludin* ( $P = 0.04$ )及 *claudin-1* ( $P = 0.01$ ) mRNA 表达水平在气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后显著降低,*claudin-5* mRNA 表达水平显著升高( $P = 0.02$ ),而肺部菌群干预组与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。

2.4 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡肺部盲肠肠球菌含量的影响

由图 3 可知:气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡肺组织内肠球菌属( $P = 0.02$ )及盲肠肠球菌( $P < 0.01$ )相对含量显著高于对照组。肺部菌群干预组肉鸡肺组织内肠球菌属和盲肠肠球菌相对含量与对照组无显著差异( $P > 0.05$ ),但极显著低于 PM<sub>2.5</sub>组( $P < 0.01$ )。

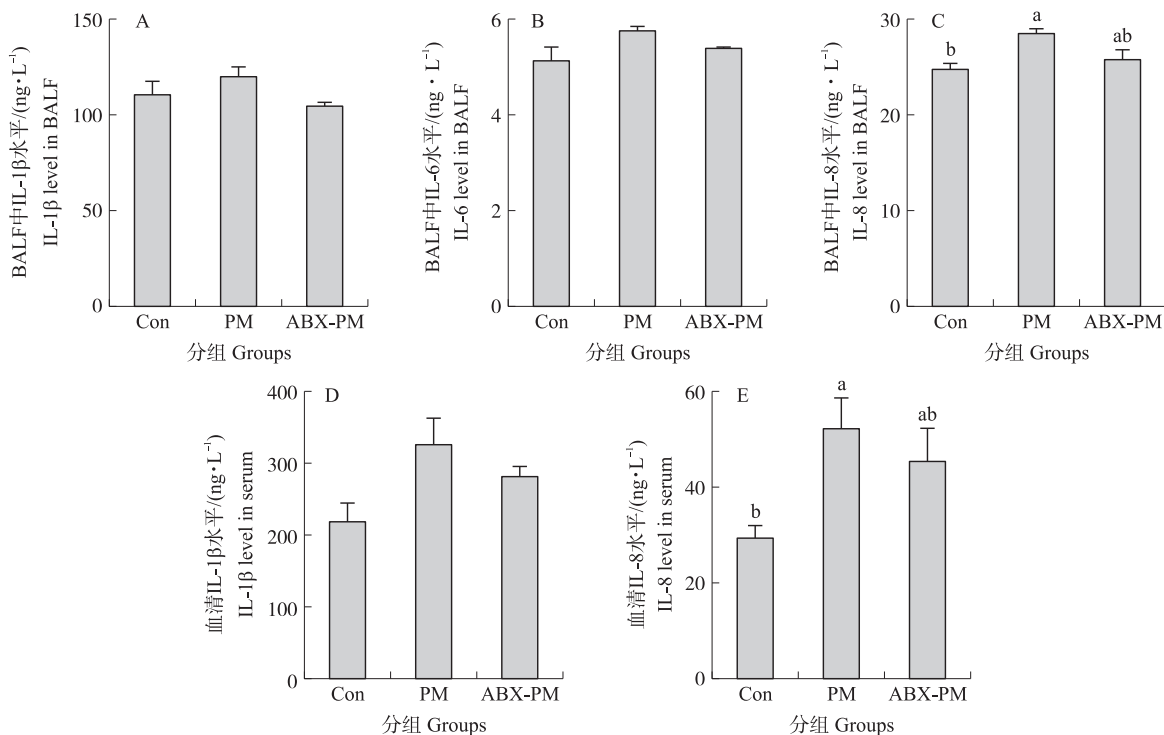


图 1 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub> 暴露肉鸡支气管肺泡灌洗液 (BALF) (A—C) 及血清 (D、E) 中炎症因子水平的影响

Fig. 1 Effects of pulmonary microbiota intervention on inflammatory factor levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (A—C) and serum (D, E) of PM<sub>2.5</sub> exposed broilers

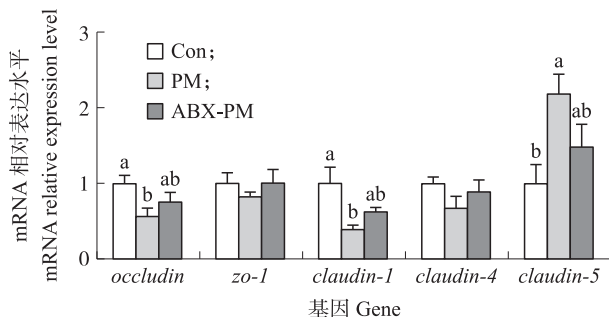


图 2 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub> 暴露肉鸡肺组织紧密连接相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of pulmonary microbiota intervention on the expression of genes related to tight junction in lung tissue of PM<sub>2.5</sub> exposed broilers

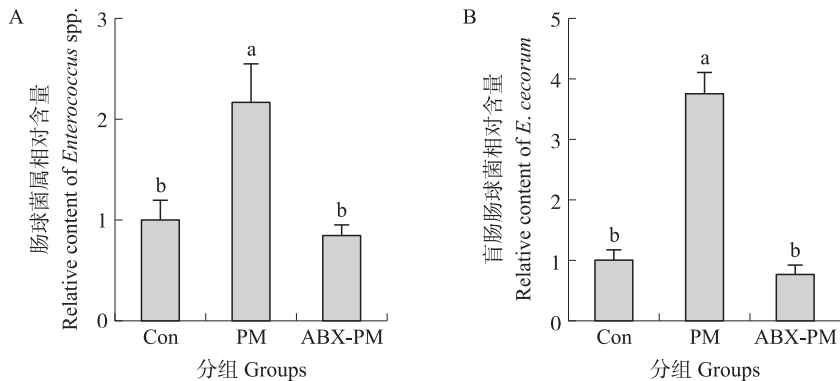


图 3 肺部菌群干预对 PM<sub>2.5</sub> 暴露肉鸡肺部肠球菌属 (A) 和盲肠肠球菌 (B) 相对含量的影响

Fig. 3 Effects of pulmonary microbiota intervention on the relative content of *Enterococcus* spp. (A) and *E. cecorum* (B) in lung tissue of PM<sub>2.5</sub> exposed broilers

### 2.5 肉鸡肺部盲肠肠球菌相对含量与炎症因子水平的相关性分析

表 4 结果显示,肉鸡肺部盲肠肠球菌相对含量与 BALF 内 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 水平以及血清内 IL-1 $\beta$  水平呈显著正相关关系。肺部菌群干预试验结果表明,气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡出现肺部炎症且盲肠肠球菌相对含量大幅上升,而肺部菌群干预组肉鸡未表现出明显的肺部炎症和盲肠肠球菌相对含量升高的趋势。此外,肉鸡肺部盲肠肠球菌相对含量与炎症因子水平之间具有显著正相关关系,提示肺部盲肠肠球菌丰度的明显上升与 PM<sub>2.5</sub>诱导的肉鸡肺部炎症损伤密切相关。因此,试验接下来研究了盲肠肠球菌对肺泡上皮细胞炎症反应的影响。

表 4 肉鸡肺部盲肠肠球菌相对含量与 BALF 和血清中炎症因子水平的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of the relative content of *E. cecorum* in the lungs of broilers with BALF and serum inflammatory factor levels

指标 Index	BALF			血清 Serum	
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	IL-8
相关系数 <i>r</i>	0.93	0.73	0.85	0.71	0.57
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	<0.01	0.03	<0.01	0.01	0.05

### 2.6 盲肠肠球菌生长曲线

为确保试验处理期间处于盲肠肠球菌的生长对数期,需要测定盲肠肠球菌的生长曲线。将盲肠肠球菌接种于 IBH 培养基,在 37 °C 条件下培养。以培养时间为横坐标,菌液 D<sub>600</sub> 值为纵坐标绘制生长曲线。如图 4 所示,盲肠肠球菌于接种后 5 h 进入生长对数期,于接种后 11 h 达到平台期。

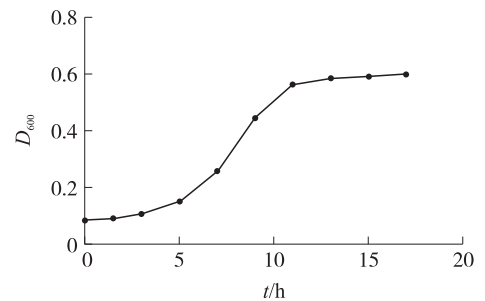


图 4 盲肠肠球菌的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of *E. cecorum*

### 2.7 盲肠肠球菌对 A549 细胞活力的影响

图 5 结果表明,处理 4 h 时,1 $\times$ 10<sup>8</sup> 和 1 $\times$ 10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 的盲肠肠球菌均极显著降低了 A549 细胞活力 (*P*<0.01)。处理 6 h 时,1 $\times$ 10<sup>7</sup>、1 $\times$ 10<sup>8</sup> 和 1 $\times$ 10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 的盲肠肠球菌均极显著降低了 A549 细胞活力 (*P*<0.01)。处理 8 h 时,1 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 的盲肠肠球菌显著降低了 A549 细胞活力 (*P*=0.03),其他 4 个浓度的盲肠肠球菌均极显著降低了 A549 细胞活力 (*P*<0.01)。后续试验选择盲肠肠球菌的处理浓度为 1 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>,处理时间为 6 h。

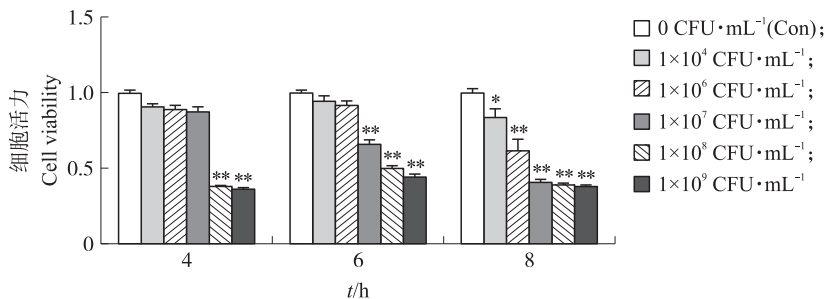


图 5 不同含量盲肠肠球菌对 A549 细胞活力的影响

Fig. 5 The effect of different contents of *E. cecorum* on the cell viability of A549 cells

\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01. The same below.

### 2.8 盲肠肠球菌对 A549 细胞炎症因子基因表达的影响

如图 6 所示,用 1 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>盲肠肠球菌处理 A549 细胞 6 h 后,细胞 *tnf- $\alpha$*  和 *il-1 $\beta$*  mRNA 表达水平极显著升高 (*P*<0.01),*il-6* (*P*=0.04) 及 *il-8* (*P*=0.02) mRNA 表达水平显著升高,*il-10* mRNA 表达水平极显著降低 (*P*<0.01)。

### 2.9 盲肠肠球菌对 A549 细胞紧密连接蛋白相关基因表达的影响

如图 7 所示,1 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>盲肠肠球菌处理 A549 细胞 6 h 后,A549 细胞 *zo-1* (*P*=0.03) 及 *claudin-1* (*P*=0.04) mRNA 表达水平显著降低。

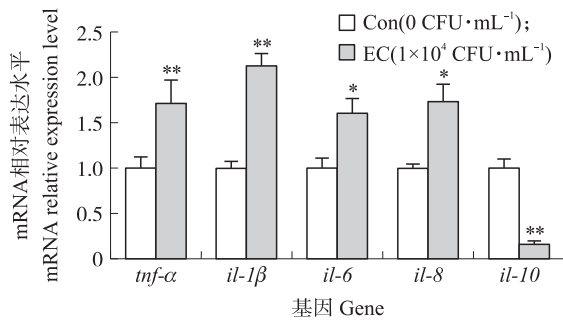


图6 盲肠肠球菌(EC)对A549细胞炎症因子基因表达的影响

Fig. 6 Effects of *E. cecorum* (EC) on inflammatory factor gene expression in A549 cells

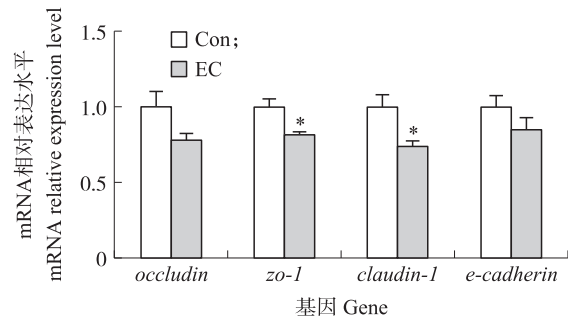


图7 盲肠肠球菌(EC)对A549细胞紧密连接蛋白相关基因表达的影响

Fig. 7 Effects of *E. cecorum* (EC) on tight junction protein gene expression in A549 cells

### 2.10 盲肠肠球菌对A549细胞凋亡相关基因表达的影响

如图8所示,  $1 \times 10^4$  CFU·mL<sup>-1</sup>盲肠肠球菌处理A549细胞6h后,A549细胞*bcl-2* mRNA表达水平显著降低( $P=0.02$ ),*bax/bcl-2* mRNA表达水平比值及*caspase-3* mRNA表达水平极显著升高( $P<0.01$ ),*bax* mRNA表达水平呈上升趋势( $P=0.07$ )。

## 3 讨论

随着集约化、规模化养殖模式的发展,畜禽舍空气污染引起的呼吸道疾病成为掣肘畜牧业安全高效生产的主要因素之一。PM<sub>2.5</sub>由于粒径小、来源广、成分复杂,是畜禽动物呼吸道疾病的重要诱因。近期研究发现,肺部菌群能够通过宿主-菌群双向调节参与肺部免疫稳态的成熟与维持,并在多种呼吸道疾病中发现肺部菌群紊乱的现象,说明肺部菌群在肺部疾病的发生和发展过程中可能发挥重要作用<sup>[13]</sup>。本课题组前期研究发现,PM<sub>2.5</sub>暴露能够诱发肉鸡肺部炎症损伤,并且伴随着肺部菌群组成和结构的紊乱,提示肺部菌群可能在PM<sub>2.5</sub>诱导肉鸡肺部炎症损伤中具有重要作用<sup>[7]</sup>。

在本研究中,我们首先进行了肺部菌群干预试验,利用气管滴注抗生素的方法,降低肉鸡肺部菌群整体丰度,通过对比正常肺部菌群肉鸡与肺部菌群干预肉鸡在PM<sub>2.5</sub>暴露后的肺部炎症损伤程度,探究肺部菌群对PM<sub>2.5</sub>诱导肉鸡肺部炎症损伤的影响。结果显示,PM<sub>2.5</sub>滴注提高了肉鸡支气管肺泡灌洗液(BALF)和血清内IL-6和IL-8的水平,而肺部菌群干预组肉鸡BALF和血清内炎症因子水平无明显变化。据以往的研究报道,畜禽舍内的PM<sub>2.5</sub>可以刺激肺泡上皮细胞和巨噬细胞分泌IL-1β、IL-6和IL-8等炎症细胞因子,诱导肺部炎症反应<sup>[14]</sup>。IL-1β是一种重要的促炎症介质,可以激活和募集免疫细胞,增强炎症反应,在PM<sub>2.5</sub>诱导的肺部损伤中发挥了重要作用<sup>[15]</sup>。IL-6能够抑制Treg细胞对免疫反应的调节功能,其浓度在机体发生感染或自身免疫时迅速升高<sup>[16]</sup>。IL-8是一种关键的中性粒细胞趋化因子,研究结果表明,IL-8是PM<sub>2.5</sub>诱导机体分泌数量最多的促炎症细胞因子<sup>[17]</sup>。在本试验中,肺部菌群干预能够降低肉鸡肺部上述促炎症因子的水平,表明肺部菌群能够影响PM<sub>2.5</sub>诱导的肉鸡肺部炎症反应。此外,研究发现PM<sub>2.5</sub>滴注影响了肉鸡生长性能,这与过去的研究结果一致<sup>[18]</sup>。而消灭肺部菌群则明显缓解了PM<sub>2.5</sub>对生产性能的不利影响,且肺部菌群干预组肉鸡的生长性能较对照组呈升高趋势,其可能原因是抗生素在体内发挥了一定的促生长作用<sup>[19]</sup>。值得注意的是,气管滴注抗生素和PM<sub>2.5</sub>均未影响肉鸡的采食量,表明能量摄入并非导致肉鸡体重下降的主要原因。在以往的研究中,呼吸道疾病的发生通常伴随着生长发育的减缓以及肺部炎症因子水平的上升,而炎症因子可以通过诱导外周组织中的白色脂肪米色化,促进能量消耗<sup>[20]</sup>。因此,我们认为PM<sub>2.5</sub>诱导的肺部炎症因子分泌可能是导致PM<sub>2.5</sub>组肉鸡体重降低的原因之一,而肺部菌群干预

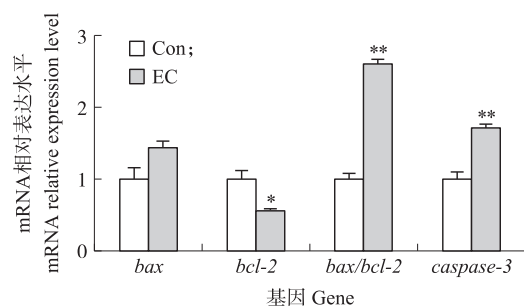


图8 盲肠肠球菌对A549细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig. 8 Effects of *E. cecorum* on apoptosis gene expression in A549 cells

则通过降低炎症因子水平间接缓解了PM<sub>2.5</sub>对生产性能的不利影响。

PM<sub>2.5</sub>在诱导肺部炎症损伤的同时,还能够影响TJ蛋白的表达水平,从而破坏气血屏障的完整性,导致气血屏障对大分子蛋白质和液体的通透性增加,引发肺水肿并加重肺部损伤<sup>[21]</sup>。与之前的研究结果类似,在本试验中,气管滴注PM<sub>2.5</sub>降低了PM<sub>2.5</sub>组肉鸡肺组织内occludin及claudin-1的表达水平,提高了claudin-5的表达水平。Occludin和Claudin是TJ蛋白的重要组成部分,Occludin<sup>[22]</sup>和Claudin-1<sup>[23]</sup>表达水平下降会引起肺屏障功能异常,Claudin-5<sup>[24]</sup>表达水平上升则会提高肺上皮细胞的旁通透性。气血屏障作为一道物理和生物免疫屏障,可保护肺部免受外来有害物质和病原微生物的刺激<sup>[25]</sup>。PM<sub>2.5</sub>诱发的气血屏障通透性升高会导致细菌入侵肺上皮细胞,使细菌代谢物和脂多糖(LPS)等有害物质更易穿过气血屏障,加剧肺部炎症反应和气血屏障的损伤<sup>[26]</sup>。在本研究中,PM<sub>2.5</sub>组肉鸡在气管滴注PM<sub>2.5</sub>后表现出与过去研究结果类似的气血屏障通透性升高<sup>[27]</sup>,而肺部菌群干预组肉鸡气血屏障未发生明显损伤。因此,肺部菌群可能通过影响PM<sub>2.5</sub>对气血屏障完整性的破坏,参与PM<sub>2.5</sub>诱导的肺部炎症损伤。

本研究中,肉鸡气管滴注鸡舍空气PM<sub>2.5</sub>后,肺组织内肠球菌属和盲肠肠球菌的相对含量显著上升,说明PM<sub>2.5</sub>暴露诱发了肺部菌群失衡。过去研究常常将肺部疾病发生时伴随的菌群失衡看作是一种疾病导致的后果,然而近期有研究发现,肺部菌群与肺部免疫稳态之间存在双向调节,菌群失衡并非只是肺部疾病的附带现象。肺部菌群可以通过调节免疫细胞分化和巨噬细胞极化影响肺部免疫系统功能<sup>[13]</sup>。Dickson等<sup>[28]</sup>提出的“菌群失衡-炎症循环”模型也解释了肺部菌群和宿主的相互作用。当机体出现炎症时,宿主的一系列炎症反应会改变肺部细菌的生长环境,选择性地引起某些致病微生物大量繁殖。肺内大量的致病微生物及其代谢产物会加剧宿主的炎症反应,机体释放的炎症因子等物质又能够进一步为致病菌提供有利的生长条件,最终形成一个不断放大的循环。在本研究中,我们发现肉鸡的肺组织内盲肠肠球菌相对含量与BALF和血清内炎症因子水平之间存在显著正相关关系。这提示PM<sub>2.5</sub>暴露引起的肉鸡肺部炎症损伤可能改变了肺部细菌生长环境,促进了盲肠肠球菌的繁殖,引起菌群结构紊乱,进而破坏免疫稳态。而肺部菌群干预削弱了肺部炎症反应与菌群的相互作用程度,减轻肺部炎症损伤的同时抑制了PM<sub>2.5</sub>诱导的盲肠肠球菌增殖。盲肠肠球菌是一种常见的条件致病菌,是导致院内感染的重要因素之一。盲肠肠球菌表达溶血素、明胶酶和肠球菌表面蛋白等多种毒力因子。这些毒力因子能够刺激机体免疫细胞,引起炎症反应并破坏心内膜、尿道和胃肠道等上皮屏障<sup>[29]</sup>。因此,我们认为PM<sub>2.5</sub>暴露引起肉鸡肺部盲肠肠球菌含量显著升高可能影响肺部炎症损伤。

肺泡上皮细胞对于维持肺部正常免疫状态具有重要意义,肺泡上皮细胞间TJ的受损、细胞凋亡及炎症反应等能够促进肺部水肿,加重肺损伤程度<sup>[30]</sup>。肺泡上皮细胞包含I型和II型2种上皮细胞,2种细胞位于同一基底膜,在保持肺泡干燥、隔绝病原体等方面发挥独特作用。II型肺泡上皮细胞具有增殖分化活性,既可以增殖产生新的细胞,也可以分化成为I型肺泡上皮细胞共同维持肺组织功能<sup>[31]</sup>。因此,我们进一步以离体培养的II型肺泡上皮细胞(A549细胞)为研究对象,探究肺部盲肠肠球菌对肺泡上皮细胞炎症反应的影响。结果显示盲肠肠球菌对A549细胞活力的影响具有时间和浓度依赖性,高浓度盲肠肠球菌能够在短时间内明显抑制A549细胞活力,影响肺泡上皮细胞增殖分化活性,这可能是导致肺上皮屏障功能受损的原因之一。另有研究发现,粪肠球菌(*E. faecalis*)可以诱导肠道上皮HT-29细胞炎症反应<sup>[32]</sup>。与该结果类似,本试验中盲肠肠球菌处理提高了A549细胞*tnf-α*、*il-1β*、*il-6*及*il-8*基因表达水平,并抑制*il-10*基因的表达。IL-10是一种具有抑炎效果的细胞因子,能够抑制单核细胞的抗原呈递作用以及T淋巴细胞活性,并降低IL-1、IL-6、IL-8及TNF-α等促炎症因子的表达水平<sup>[33]</sup>。由此可见,盲肠肠球菌不仅刺激A549细胞发生炎症反应,还能抑制抗炎细胞因子的生成,进一步促进炎症的发展。上皮细胞间的TJ是维持屏障结构和功能的重要基础,暴露于粪肠球菌代谢产物的小鼠,肠道上皮组织TJ表达水平降低<sup>[34]</sup>。与粪肠球菌的作用相似,盲肠肠球菌显著抑制了A549细胞*zo-1*及*claudin-1*的表达。ZO-1作为衡量细胞屏障功能是否正常的重要指标,具有调节细胞旁通透性的作用<sup>[35]</sup>,以上结果说明盲肠肠球菌不仅诱导肺泡上皮细胞的炎症反应,还能够影响肺屏障的通透性。此外,有研究表明,肺炎发生与II型肺泡上皮细胞的过度凋亡有关<sup>[36]</sup>。在本试验中,我们发现盲肠肠球菌可以显著提高A549细胞*bax/bcl-2*基因表达水平的比值及*caspase-3*基因表达水平。Bcl-2蛋白家族对于调节细胞凋亡过程具有重要意义,其中BAX蛋白可以促进凋亡,而Bcl-2蛋白负责抑制凋亡。正常情况下,BAX/Bcl-2蛋白表达比例保持相对平衡,当BAX大量表达时,会导致细胞色素大量释放及线粒体跨膜电位的改变,最终激活Caspase级联反应,

诱导细胞凋亡<sup>[37]</sup>。Caspase 家族在细胞程序性死亡过程中发挥重要功能,其中 Caspase-3 在细胞凋亡途径中具有不可替代的作用<sup>[38]</sup>。上述结果表明盲肠肠球菌可能介导 BAX/Bcl-2/Caspase 信号途径促进上皮细胞凋亡,进而加剧肺部炎症的发展及恶化。因此,盲肠肠球菌能够诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡,并降低紧密连接蛋白的表达,提示 PM<sub>2.5</sub>暴露引起肉鸡肺部盲肠肠球菌的大量增殖可能加重 PM<sub>2.5</sub>诱导的肉鸡肺部炎症损伤。本课题组前期对肉鸡舍 PM<sub>2.5</sub>进行成分分析的结果表明,肠球菌属是 PM<sub>2.5</sub>携带的主要致病微生物之一<sup>[1]</sup>。然而,肉鸡肺部的肠球菌属和盲肠肠球菌是否来源于 PM<sub>2.5</sub>表面附着的细菌仍需进一步探讨。

综上所述,肺部菌群干预能够减轻 PM<sub>2.5</sub>暴露肉鸡肺部炎症损伤程度,表明肺部菌群参与了 PM<sub>2.5</sub>诱导肉鸡肺部炎症损伤的过程。此外,PM<sub>2.5</sub>暴露引起肉鸡肺部盲肠肠球菌的大量增殖,盲肠肠球菌能够诱发肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡,破坏细胞间紧密连接,提示肺部盲肠肠球菌在 PM<sub>2.5</sub>诱导的肉鸡肺部炎症损伤中发挥重要作用。

#### 参考文献 References:

- [1] Dai P Y, Shen D, Tang Q, et al. PM<sub>2.5</sub> from a broiler breeding production system: the characteristics and microbial community analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256: 113368.
- [2] Cambra-López M, Aarnink A J A, Zhao Y, et al. Airborne particulate matter from livestock production systems: a review of an air pollution problem [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(1): 1-17.
- [3] Feng S L, Gao D, Liao F, et al. The health effects of ambient PM<sub>2.5</sub> and potential mechanisms [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 128: 67-74.
- [4] Marsland B J, Gollwitzer E S. Host-microorganism interactions in lung diseases [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14: 827-835.
- [5] Budden K F, Shukla S D, Rehman S F, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease [J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2019, 7(10): 907-920.
- [6] Li J L, Hu Y R, Liu L J, et al. PM<sub>2.5</sub> exposure perturbs lung microbiome and its metabolic profile in mice [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 721: 137432.
- [7] Shen D, Guo Z D, Huang K, et al. Inflammation-associated pulmonary microbiome and metabolome changes in broilers exposed to particulate matter in broiler houses [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 421: 126710.
- [8] Kense M J, Landman W J M. *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology [J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(6): 603-612.
- [9] Jung A, Metzner M, Köhler-Repp D, et al. Experimental reproduction of an *Enterococcus cecorum* infection in Pekin ducks [J]. *Avian Pathology*, 2013, 42(6): 552-556.
- [10] Nascimento S T, Maia A S C, Gebremedhin K G, et al. Metabolic heat production and evaporation of poultry [J]. *Poultry Science*, 2017, 96(8): 2691-2698.
- [11] Kubota H, Tsuji H, Matsuda K, et al. Detection of human intestinal catalase-negative, Gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(16): 5440-5451.
- [12] Ryu H, Henson M, Elk M, et al. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(1): 196-204.
- [13] Xu N N, Wang L, Li C X, et al. Microbiota dysbiosis in lung cancer: evidence of association and potential mechanisms [J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2020, 9(4): 1554-1568.
- [14] Tang Q, Huang K, Liu J Z, et al. Fine particulate matter from pig house induced immune response by activating TLR4/MAPK/NF-κB pathway and NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages [J]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124373.
- [15] Huang K L, Liu S Y, Chou C C K, et al. The effect of size-segregated ambient particulate matter on Th1/Th2-like immune responses in mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173158.
- [16] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6(10): a016295.
- [17] Øvrevik J, Låg M, Holme J A, et al. Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution [J]. *Toxicology*, 2009, 259(1/2): 46-53.
- [18] Vodela J K, Renden J A, Lenz S D, et al. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene, and trichloroethylene). 1. Interaction of contaminants with nutritional status on general performance and immune function in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 1997, 76(11): 1474-1492.
- [19] 佟建明. 饲用抗生素的促生长作用机制及其替代技术研究 [J]. *饲料工业*, 2006, 27(2): 1-4.  
Tong J M. Study on the growth-promoting mechanism of feed antibiotics and its substitution technology [J]. *Feed Industry*, 2006, 27(2): 1-4 (in Chinese).

- [20] Wang H, Ye J P. Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology[J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2015, 16(1): 47-54.
- [21] Bekki K, Ito T, Yoshida Y, et al. PM<sub>2.5</sub> collected in China causes inflammatory and oxidative stress responses in macrophages through the multiple pathways[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 45: 362-369.
- [22] Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, et al. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 178(12): 1271-1281.
- [23] Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier; a lesson from claudin-1-deficient mice[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 156(6): 1099-1111.
- [24] Wittekindt O H. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2017, 469(1): 135-147.
- [25] Invernizzi R, Lloyd C M, Molyneux P L. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs[J]. *Immunology*, 2020, 160(2): 171-182.
- [26] Liu J G, Chen X Y, Dou M S, et al. Particulate matter disrupts airway epithelial barrier via oxidative stress to promote *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2019, 11(6): 2617-2627.
- [27] Heijink I H, Brandenburg S M, Postma D S, et al. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery[J]. *The European Respiratory Journal*, 2012, 39(2): 419-428.
- [28] Dickson R P, Erb-Downward J R, Huffnagle G B. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2014, 2(3): 238-246.
- [29] Borst L B, Suyemoto M M, Sarsour A H, et al. Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens[J]. *Veterinary Pathology*, 2017, 54(1): 61-73.
- [30] Herrero R, Sanchez G, Lorente J A. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2018, 6(2): 32-48.
- [31] 杨航, 张红. 肺泡 II 型上皮细胞与肺部疾病的研究进展[J]. *安徽医药*, 2021, 25(2): 217-221.  
Yang H, Zhang H. Research progress of alveolar type II epithelial cells and lung diseases[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2021, 25(2): 217-221 (in Chinese with English abstract).
- [32] You R, Kwon O Y, Woo H J, et al. *Hovenia* monofloral honey can attenuate *Enterococcus faecalis* mediated biofilm formation and inflammation[J]. *Food Science of Animal Resources*, 2022, 42(1): 84-97.
- [33] Rutz S, Ouyang W J. Regulation of interleukin-10 expression [M]// *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*. Dordrecht: Springer, 2016: 89-116.
- [34] Tian Z Y, Khan A I, Rehman A U, et al. Virulence factors and mechanisms of paediatric pneumonia caused by *Enterococcus faecalis*[J]. *Gut Pathogens*, 2023, 15(1): 2-18.
- [35] van Itallie C M, Tietgens A J, Anderson J M. Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2017, 28(4): 524-534.
- [36] Sisson T H, Mendez M, Choi K, et al. Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010, 181(3): 254-263.
- [37] 杨彩霞, 杨敏, 王根林, 等. TNF- $\alpha$  诱导小鼠乳腺上皮细胞凋亡和程序性坏死研究[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(1): 147-155. DOI: 10.7685/jnau.202102008.  
Yang C X, Yang M, Wang G L, et al. TNF- $\alpha$  induced apoptosis and necroptosis in mouse mammary epithelial cells[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(1): 147-155 (in Chinese with English abstract).
- [38] 曾涵芳, 张林, 陈孟姣, 等. 黄芪多糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤及凋亡的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5): 903-910. DOI: 10.7685/jnau.201812027.  
Zeng H F, Zhang L, Chen M J, et al. Effects of astragalus polysaccharides on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage and apoptosis in bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(5): 903-910 (in Chinese with English abstract).

责任编辑: 周广礼