



尹莉丽,吴建民,陈露,等. 姜酚和百里香酚对白羽肉鸡小肠形态结构和屏障功能的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):87-95.

YIN Lili, WU Jianmin, CHEN Lu, et al. Effect of gingerol and thymol on the small intestinal morphology and barrier function of white feather broilers[J].

Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 87-95.

姜酚和百里香酚对白羽肉鸡小肠形态结构 和屏障功能的影响

尹莉丽,吴建民,陈露,赵文轩,汪晶*,朱伟云

(南京农业大学动物科技学院/国家动物消化道营养国际联合研究中心,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在研究日粮添加姜酚、百里香酚及其组合对白羽肉鸡小肠形态、免疫功能及肠道屏障的影响。[方法]将200只1日龄AA白羽肉鸡随机分为4组,每组5个重复,每个重复10只,试验期为42d。4个处理组如下:对照组(Con组,基础日粮)、姜酚组(Gin组,基础日粮+60 mg·kg⁻¹姜酚)、百里香酚组(Thy组,基础日粮+30 mg·kg⁻¹百里香酚)及姜百组(Gin+Thy组,基础日粮+30 mg·kg⁻¹姜酚+15 mg·kg⁻¹百里香酚)。在试验期第42天,采集肉鸡的空肠和回肠制作切片并观察,取空肠和回肠黏膜以测定免疫球蛋白含量、细胞因子含量、抗氧化酶活性、紧密连接和抗氧化相关基因表达。[结果]与对照组相比,姜百组肉鸡回肠绒毛高度(VH)有增加的趋势($P=0.063$),绒毛高度/隐窝深度(V/C)值显著提高($P<0.05$);姜百组肉鸡空肠和回肠黏膜中分泌性免疫球蛋白A(sIgA)含量显著提高($P<0.05$),空肠黏膜中白介素6(IL-6)和干扰素 γ (IFN- γ)含量以及回肠黏膜中IL-6和白介素1 β (IL-1 β)含量显著降低($P<0.05$);姜百组肉鸡空肠和回肠黏膜中总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著升高($P<0.05$);姜百组肉鸡空肠黏膜中核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)和回肠黏膜中Nrf2、超氧化物歧化酶1(SOD1)、GPX4的mRNA相对表达量显著升高($P<0.05$),空肠和回肠黏膜中的Occludin mRNA相对表达量显著增加($P<0.05$)。[结论]日粮添加姜酚和百里香酚组合可以提高肉鸡的抗氧化能力和免疫功能,并通过改善肠道形态和肠道屏障促进肠道健康。

关键词:姜酚;百里香酚;肉鸡;肠道形态;肠道屏障

中图分类号:S831.5

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0087-09

Effect of gingerol and thymol on the small intestinal morphology and barrier function of white feather broilers

YIN Lili, WU Jianmin, CHEN Lu, ZHAO Wenxuan, WANG Jing*, ZHU Weiyun

(College of Animal Science and Technology/National Center for International Research on Animal Gut Nutrition,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] The study investigated the effects of dietary supplementation with gingerol, thymol and their combination on small intestinal morphology, immune function and intestinal barrier of white feather broilers. [Methods] A total of 200 1-day-old broilers were randomly divided into four groups with 5 replicates per group and 10 chickens per replicate as followings: the control group (Con group, basal diet), the gingerol group (Gin group, basal diet+60 mg·kg⁻¹ gingerol), the thymol group (Thy group, basal diet+30 mg·kg⁻¹ thymol) and the gingerol+thymol group (Gin+Thy group, basal diet+30 mg·kg⁻¹ gingerol+15 mg·kg⁻¹ thymol). On day 42 of the experimental period, the jejunum and ileum of broilers were collected to make sections and observed, and the mucosa of the jejunum and ileum were taken to determine the immunoglobulin content, cytokine content, antioxidant enzyme activities, tight junctions and antioxidant-related gene expression. [Results] The ileal villus height (VH) trended to increase ($P=0.063$) and the ratio of villus height/crypt depth (V/C) significantly increased ($P<0.05$) in Gin+Thy group compared with those in Con group. The secretory immunoglobulin A (sIgA) content in jejunal and ileal mucosa significantly increased ($P<0.05$), while the interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) content in jejunal mucosa, and the IL-6 and interleukin-1 β (IL-1 β) content in ileal mucosa significantly decreased ($P<0.05$) in Gin+Thy group compared with those in Con group. Total antioxidant capacity (T-AOC) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in jejunal and ileal mucosa in Gin+Thy group significantly increased compared with Con group ($P<0.05$). The Gin+Thy group had a higher mRNA relative expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), glutathione peroxidase (GPX4) in jejunal mucosa, and a higher mRNA relative expression of Nrf2, superoxide dismutase 1 (SOD1) and GPX4 in ileal mucosa than those in Con group ($P<0.05$). The mRNA relative expression level of Occludin in jejunal and ileal mucosa significantly increased in Gin+Thy

收稿日期:2022-09-29

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFE0135200)

*通信作者:汪晶,教授,研究方向为消化道微生物研究,E-mail:jwang8@njau.edu.cn。

group compared with Con group ($P < 0.05$). [Conclusions] Dietary supplementation with the gingerol and thymol combination improved the antioxidant capacity and immune function, and enhanced intestinal health by improving intestinal morphology and intestinal barrier of broilers.

Keywords: gingerol; thymol; broiler; intestinal morphology; intestinal barrier

肠道在消化、营养吸收和免疫防御中起着至关重要的作用,它不仅是消化吸收营养物质的场所,还是维持机体内部动态平衡的屏障。肠道屏障是抵御肠腔内有害物质(如病原体、毒素和抗原等)结构和功能的总称,包括物理、化学、免疫和微生物屏障。研究表明,家禽生长易受营养、环境和饲养管理等因素的影响,使肠道屏障受损,表现出免疫力下降和肠道菌群失衡等,从而导致全身炎症反应、器官衰竭甚至死亡^[1]。多年来,抗生素一直被用于促进家禽生长和预防疾病,然而随着抗生素对畜禽产品及人类健康危害的揭示,开发新型绿色安全的天然替代品成为研究热点。植物性饲料添加剂(phytogenic feed additives, PFA)因其绿色无污染,并且能够调节肠道菌群及机体免疫等^[2]而被广泛应用于畜禽养殖中,发挥促进肠道健康等作用。研究发现单一植物提取物具有添加量大、效果单一的缺点,而多个提取物复合可以通过活性成分的协同作用增强其作用效果,能够更好发挥益生作用^[3]。

姜酚(gingerol, Gin)是生姜中姜辣素的主要成分,包括6-姜酚(含量最高,生物活性最强)、8-姜酚、10-姜酚、12-姜酚等多种成分,在抗氧化^[4]、抗炎^[5]、抗菌^[6]等方面发挥着重要作用。姜酚能够抑制Caco-2细胞系中的核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)分泌,降低白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)等炎性细胞因子水平从而改善炎症反应,维持肠道上皮屏障功能^[7]。Karangiya等^[8]研究证实,生姜能显著提高肉鸡的生长性能,改善十二指肠形态结构,增加肠道吸收表面积。百里香酚(thymol, Thy)是一种从唇形科植物的挥发油中提取出的单体物质,具有广谱抑菌、消炎和提高机体抗氧化等作用。百里香酚的抗氧化特性与其酚类结构有关,酚类结构可以吸附和中和自由基并表现出氧化还原特性^[9]。百里香酚具有有效清除和还原超氧阴离子、羟基自由基和DPPH自由基的能力^[10],并且还能激活核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)信号通路从而提高抗氧化能力^[11]。体外试验证明,用百里香酚预处理IPEC-J2细胞,可以通过减少上皮细胞中活性氧的产生和促炎细胞因子的表达来减轻脂多糖诱导的屏障功能损伤^[12]。Du等^[13]研究表明,日粮中百里香酚可通过改善感染产气荚膜梭菌的肉鸡肠道完整性和调节免疫反应来减轻肠道损伤。

姜酚水溶性差导致其生物利用度低,同时具有不稳定的 β -羟基酮结构,可能会降低姜酚的药理和生物活性^[14]。多项研究表明,百里香酚与丁香酚、香芹酚或肉桂醛等物质具有较好的协同作用,其原因可能是百里香酚能够破坏细菌外膜,使丁香酚、香芹酚或肉桂醛等物质更容易进入细胞质并与蛋白质结合,从而发挥协同抑菌作用,提高其生物利用度^[15-18]。基于以上研究结果,我们推测姜酚和百里香酚组合可能在改善肠道健康等方面具有较好的效果。因此,本试验以1~42日龄爱拔益加(AA)白羽肉鸡为对象,研究日粮添加姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠形态结构、免疫功能以及肠道屏障的影响,为姜酚和百里香酚在肉鸡上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1日龄爱拔益加(AA)白羽肉鸡购自南京特给力种植专业合作社;姜酚(纯度 $\geq 60\%$)和百里香酚(纯度 $\geq 98\%$)均购自山西玉宁生物科技有限公司。

1.2 试验设计

试验选取200只1日龄健康状况良好、体重相近的AA白羽肉鸡,随机分为4组,每组5个重复,每个重复10只鸡,试验期为42 d。4个试验组分别为:对照(Con)组,基础日粮(不含抗生素);姜酚(Gin)组,基础日粮+60 mg·kg⁻¹姜酚;百里香酚(Thy)组,基础日粮+30 mg·kg⁻¹百里香酚;姜百(Gin+Thy)组,基础日粮+30 mg·kg⁻¹姜酚+15 mg·kg⁻¹百里香酚。

1.3 试验饲料与饲养管理

基础饲料参照NRC(1994)的营养需求标准配制的玉米-豆粕型饲料。基础日粮的组成和营养水平如表1。试验采用3层笼养,试验地点为南京农业大学卫岗校区家禽养殖房。在鸡1~3日龄时,鸡舍的温度控制在32~35℃,后期每周降低2~3℃,最终温度保持在23℃。整个试验期间鸡舍保持24 h光照,自然

通风。试验期间所有肉鸡均可自由采食和饮水,疫苗接种按常规程序进行。所有试验程序均经南京农业大学动物伦理委员会批准。

表 1 基础日粮原料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)

日粮组成 Diet composition	营养水平		1~21 日龄		22~42 日龄	
	Nutrient levels		1 to 21 days of age	22 to 42 days of age	1 to 21 days of age	22 to 42 days of age
玉米 Corn	52.40	60.75	代谢能 Metabolizable energy ²	13.40	13.75	
豆粕 Soybean meal	24.00	11.90	粗蛋白质 Crude protein	23.38	20.59	
玉米蛋白粉 Corn protein meal	6.00	9.00	粗脂肪 Ether extract	6.26	7.69	
羽毛粉 Feather meal	8.00	7.00	总钙 Ca	1.11	1.08	
豆油 Soybean oil	4.22	5.50	非植酸磷 Non-phytate phosphorus	0.49	0.51	
L-蛋氨酸 L-Met	0.14	0.10	蛋氨酸 Met	0.50	0.44	
L-赖氨酸 L-Lys	0.18	0.50	蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.85	0.75	
苏氨酸 Threonine	0.06	0.20	赖氨酸 Lys	1.10	1.11	
色氨酸 Tryptophan	0.00	0.05	苏氨酸 Thr	0.79	0.80	
食盐 NaCl	0.35	0.35	色氨酸 Try	0.22	0.21	
磷酸氢钙 CaHPO ₄	2.00	2.00				
石粉 Limestone	1.65	1.65				
预混料 Premix ¹	1.00	1.00				

注:1) 预混料为每千克饲料提供:维生素 A 12 000 IU;维生素 D₃ 3 000 IU;维生素 E 20 IU;维生素 K₃ 1.3 mg;维生素 B₁ 2.2 mg;维生素 B₂ 8 mg;维生素 B₆ 4 mg;维生素 B₁₂ 0.013 mg;烟酸 40 mg;氯化胆碱 400 mg;泛酸钙 10 mg;叶酸 1 mg;生物素 0.04 mg;铁(由硫酸亚铁提供)80 mg;铜(由硫酸铜提供)7.5 mg;锌(由硫酸锌提供)65 mg;锰(由硫酸锰提供)110 mg;碘(由碘酸钙提供)1.1 mg;硒(由亚硒酸钠提供)0.3 mg。2) 代谢能单位为 MJ·kg⁻¹。

Note: 1) Premix provided per kg of diet: vitamin A 12 000 IU; vitamin D₃ 3 000 IU; vitamin E 20 IU; vitamin K₃ 1.3 mg; vitamin B₁ 2.2 mg; vitamin B₂ 8 mg; vitamin B₆ 4 mg; vitamin B₁₂ 0.013 mg; niacin 40 mg; choline chloride 400 mg; calcium pantothenate 10 mg; folic acid 1 mg; biotin 0.04 mg; Fe (from ferrous sulfate) 80 mg; Cu (from copper sulfate) 7.5 mg; Zn (from zinc sulfate) 65 mg; Mn (from manganese sulfate) 110 mg; I (from calcium iodate) 1.1 mg; Se (from sodium selenite) 0.3 mg. 2) Metabolic energy is MJ·kg⁻¹.

1.4 样品采集

在试验期第 42 天每个重复选取 1 只接近该重复平均体重的鸡,肉鸡空腹 12 h(可自由饮水)后进行屠宰采集样品。待鸡死亡后立即解剖肉鸡,用预冷的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净空肠和回肠组织,用无菌载玻片刮取空肠和回肠黏膜装于 2 mL 无菌冻存管中,放置于液氮中保存待测;另切取空肠和回肠中间处 1~2 cm 的肠段,用生理盐水冲洗干净后于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 小肠形态结构 将固定好的空肠和回肠组织样品经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木精-伊红染色,用虚拟显微镜对染色的切片进行观察、拍照。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量绒毛高度和隐窝深度,计算绒毛高度与隐窝深度的比值。

1.5.2 小肠黏膜抗氧化酶活性 称取 0.2 g 空肠和回肠黏膜样品,与 4 °C 预冷生理盐水按 1:9(质量/体积)的比例在冰浴条件下匀浆,然后于 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液保存于无菌离心管中待测。使用 ELISA 试剂盒检测肉鸡空肠和回肠黏膜中丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)以及总超氧化物歧化酶(T-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。具体操作步骤按照说明书进行,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.5.3 小肠黏膜免疫球蛋白和细胞因子浓度 称取 0.2 g 空肠和回肠黏膜样品,与 4 °C 预冷生理盐水按 1:9 的比例在冰浴条件下匀浆,然后于 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液保存于无菌离心管中待测。采用酶联免疫试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),利用双抗夹心法测定空肠和回肠黏膜中分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)浓度以及空肠和回肠黏膜中白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和干扰素 γ(IFN-γ)的浓度。具体操作步骤按照说明书进行。

1.5.4 小肠黏膜紧密连接和抗氧化相关基因表达 使用 Trizol 试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)分别提取空肠和回肠黏膜中的总 RNA。并用 Nanodrop ND-2000 分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司)测定 RNA 浓度和纯度。将符合标准的 RNA 稀释到同一水平浓度后使用 HiScript[®] III All-in-one RT Super Mix for qPCR 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将 RNA 反转录成 cDNA,置于 -80 °C 保存。参照 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行 qPCR 反应体系的配制,用 QuanStudio7 Flex 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)进行荧光定量 PCR 反应。选用 β-actin 作为内参基因,使用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算目的基因 mRNA 相对表达量^[19]。引物均由上海生工

生物工程股份有限公司合成,引物序列如表 2 所示。

表 2 实时定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for RT-qPCR analysis

基因 Gene	引物对序列 Primer pairs sequence(5'→3')	产物大小/bp Amplicon size	登录号 GenBank number
<i>β-actin</i>	CCAGCCATGTATGTAGCCATCCAG/GGTAACACCATCACCAGAGTCCATC	93	NM_205518.1
<i>ZO-1</i>	CTTCAGGTGTTTCTCTCCTCCTC/CTGTGGTTTCATGGCTGGATC	131	XM_015278981.2
<i>Occludin</i>	CGTCATGCTCATCGCCTCCATC/TTGAGGTAGTGCTGCCGTAGG	126	NM_205128.1
<i>Claudin-1</i>	GACCAGGTGAAGAAGATGCGGATG/CGAGCCACTCTGTTGCCATACC	107	NM_001013611.2
<i>Nrf2</i>	GGGACGGTGACACAGGAACAAC/TCCACAGCGGAAATCAGAAAGATC	93	NM_205117.1
<i>NQO1</i>	CGAGTGCTTTGCTACGAGATGGAG/AGGTCAGCCGCTTCAATCTTCTTC	102	NM_001277620.1
<i>HO-1</i>	GGTCCCGAATGAATGCCCTTGAG/TGACCGTTCTCTGGCTCTTGG	139	NM_205344.1
<i>GPX4</i>	GCTGTGGAAGTGGCTGAAGGAG/TTGGCCCTCACGGTTGATAAGAAAC	100	NM_001346448.1
<i>SOD1</i>	GGTCATCCACTTCCAGCAGCAG/AAGCCATGATCTCCATCAGACAAGC	84	NM_205064.1

注:*β-actin*:β-肌动蛋白基因 Beta actin gene;*ZO-1*:闭锁小带蛋白 1 基因 Zonula occludens-1 gene;*Occludin*:闭合蛋白基因 Occludin gene;*Claudin-1*:封闭蛋白 1 基因 Claudin-1 gene;*Nrf2*:核因子 E2 相关因子 2 基因 Nuclear factor erythroid-2 related factor 2 gene;*NQO1*:醌氧化还原酶基因 NADPH quinone oxidoreductase 1 gene;*HO-1*:血红素加氧酶 1 基因 Heme oxygenase 1 gene;*GPX4*:谷胱甘肽过氧化物酶基因 Glutathione peroxidase 4 gene;*SOD1*:超氧化物歧化酶 1 基因 Superoxide dismutase 1 gene.

1.6 数据统计与分析

试验数据用 Excel 2019 软件处理,运用 SPSS 26.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),用 Duncan's 进行多重比较。结果以平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠形态的影响

由表 3 和图 1 可知:与 Con 组和 Gin 组相比,Gin+Thy 组回肠绒毛隐比显著提高($P<0.05$),Gin+Thy 组和 Thy 组回肠绒毛高度和 Con 组相比有增加的趋势($P=0.063$)。4 个处理组空肠形态结构无显著差异($P>0.05$)。

表 3 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠形态的影响

Table 3 Effects of gingerol, thymol and their combination on the small intestinal morphology of broilers

项目 Item	对照组 Con group	姜酚组 Gin group	百里香酚组 Thy group	姜百组 Gin+Thy group	标准误 SE	P 值 P-value
空肠 Jejunum						
绒毛高度/ μm Villus height	1 451.12	1 458.17	1 462.68	1 461.88	10.24	0.982
隐窝深度/ μm Crypt depth	138.11	132.27	133.58	132.34	1.22	0.300
绒毛高度/隐窝深度 Villus height/Crypt depth	10.52	11.04	10.97	11.04	0.15	0.568
回肠 Ileum						
绒毛高度/ μm Villus height	798.71	912.48	1 040.68	1 018.30	36.86	0.063
隐窝深度/ μm Crypt depth	101.13	104.17	102.31	86.00	3.06	0.128
绒毛高度/隐窝深度 Villus height/Crypt depth	7.93 ^c	8.82 ^{bc}	10.38 ^{ab}	11.88 ^a	0.48	0.007

注:1)不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。Different letters mean significant difference in different treatments($P<0.05$). 2) Con: Control; Gin: Gingerol; Thy: Thymol. 下同 The same below.

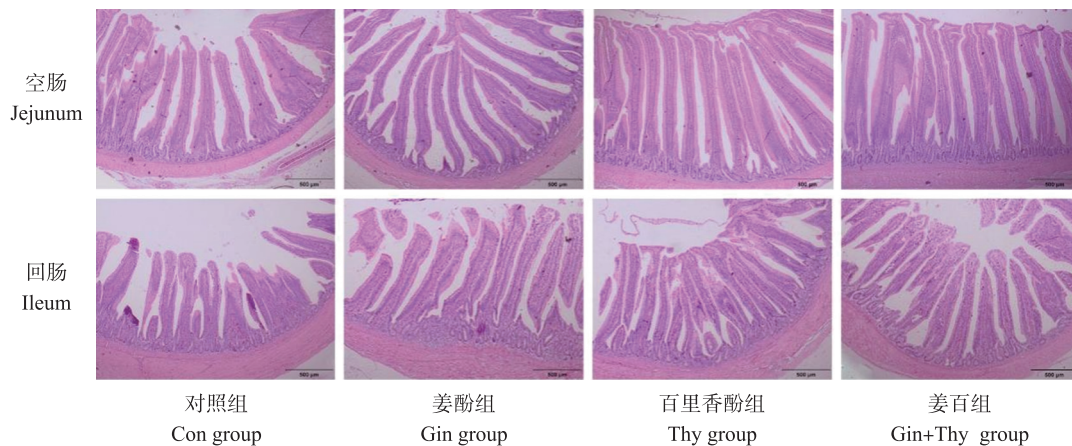


图 1 各组肉鸡空肠和回肠组织切片

Fig. 1 Jejunal and ileal tissue sections of broilers in each group

2.2 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜免疫球蛋白和细胞因子含量的影响

由表 4 可知:与 Con 组和 Gin 组相比,Gin+Thy 组空肠和回肠黏膜中 sIgA 含量显著提高($P<0.05$)。与 Con 组相比,空肠黏膜中 IL-6 和 IFN- γ 的含量在 Gin 组、Thy 组和 Gin+Thy 组中显著降低($P<0.05$),回肠黏膜中 IL-6 和 IL-1 β 的含量在 Thy 组和 Gin+Thy 组中显著降低($P<0.05$),Thy 组和 Gin+Thy 组回肠黏膜 IFN- γ 含量有降低的趋势($P=0.054$)

表 4 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜免疫球蛋白和细胞因子含量的影响

Table 4 Effects of gingerol, thymol and their combination on immunoglobulin and cytokines contents in the small intestinal mucosa of broilers

项目 Item	对照组 Con group	姜酚组 Gin group	百里香酚组 Thy group	姜百组 Gin+Thy group	标准误 SE	P 值 P-value
空肠 Jejunum						
sIgA 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) sIgA content	0.89 ^b	0.96 ^b	1.01 ^{ab}	1.15 ^a	0.03	0.042
IL-6 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-6 content	17.19 ^a	15.25 ^b	15.08 ^b	13.82 ^b	0.39	0.011
IL-10 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-10 content	31.02	27.82	32.33	33.75	1.13	0.302
IL-1 β 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-1 β content	331.67	292.08	278.65	281.05	9.15	0.137
TNF- α 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) TNF- α content	41.81	38.08	36.33	35.35	1.26	0.294
IFN- γ 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IFN- γ content	41.84 ^a	34.87 ^b	35.00 ^b	32.96 ^b	1.25	0.048
回肠 Ileum						
sIgA 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) sIgA content	1.05 ^b	1.09 ^b	1.12 ^{ab}	1.23 ^a	0.02	0.037
IL-6 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-6 content	19.64 ^a	16.23 ^{ab}	15.07 ^b	14.28 ^b	0.71	0.023
IL-10 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-10 content	28.78	26.95	28.19	31.40	0.71	0.152
IL-1 β 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IL-1 β content	351.57 ^a	296.46 ^{ab}	285.72 ^b	277.24 ^b	10.80	0.049
TNF- α 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) TNF- α content	37.71	34.09	32.46	32.90	1.00	0.245
IFN- γ 含量/($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$) IFN- γ content	43.64	36.01	34.26	33.53	1.51	0.054

注:sIgA:分泌性免疫球蛋白 A Secretory immunoglobulin A;IL-6:白细胞介素 6 Interleukin-6;IL-10:白细胞介素 10 Interleukin-10;IL-1 β :白细胞介素 1 β Interleukin-1 β ;TNF- α :肿瘤坏死因子 α Tumor necrosis factor- α ;IFN- γ :干扰素 γ Interferon- γ 。

2.3 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜抗氧化酶活性的影响

由表 5 可知:Gin+Thy 组空肠黏膜 T-AOC 和 GSH-Px 活性显著高于 Con 组和 Gin 组($P<0.05$);Gin+Thy 组回肠 T-AOC 显著高于 Con 组,Gin 组、Thy 组和 Gin+Thy 组回肠 GSH-Px 活性显著高于 Con 组($P<0.05$)。

表 5 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜抗氧化酶活性的影响

Table 5 Effects of gingerol, thymol and their combination on antioxidant enzyme activity in the small intestinal mucosa of broilers

项目 Item	对照组 Con group	姜酚组 Gin group	百里香酚组 Thy group	姜百组 Gin+Thy group	标准误 SE	P 值 P-value
空肠 Jejunum						
T-AOC/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	9.31 ^b	9.48 ^b	11.22 ^{ab}	12.04 ^a	0.43	0.048
T-SOD 活性/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) T-SOD activity	91.00	99.89	101.15	100.85	1.97	0.211
GSH-Px 活性/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) GSH-Px activity	282.21 ^b	280.59 ^b	326.63 ^{ab}	352.40 ^a	10.17	0.015
MDA 含量/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$) MDA content	0.84	0.77	0.63	0.54	0.07	0.293
回肠 Ileum						
T-AOC/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0.94 ^b	1.20 ^{ab}	1.07 ^{ab}	1.37 ^a	0.06	0.043
T-SOD 活性/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) T-SOD activity	74.93	75.79	78.67	84.56	1.92	0.294
GSH-Px 活性/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) GSH-Px activity	210.96 ^b	254.90 ^a	268.00 ^a	291.27 ^a	8.83	0.003
MDA 含量/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$) MDA content	0.90	0.76	0.63	0.59	0.05	0.147

注:T-AOC:总抗氧化能力 Total anti-oxidant capacity;T-SOD:总超氧化物歧化酶 Total-superoxide dismutase;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase;MDA:丙二醛 Malondialdehyde。

2.4 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜抗氧化相关基因表达的影响

由图 2 可知:Gin+Thy 组空肠黏膜的 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著高于 Con 组和 Gin 组,空肠黏膜的 *HO-1* mRNA 相对表达量显著高于 Con 组和 Thy 组,空肠黏膜的 *GPX4* mRNA 相对表达量显著高于 Con 组、Gin 组和 Thy 组($P<0.05$);Thy 组和 Gin+Thy 组回肠黏膜的 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著高于 Con 组和 Gin 组,Gin+Thy 组回肠黏膜的 *SOD1* 和 *GPX4* mRNA 相对表达量显著高于 Con 组、Gin 组和 Thy 组($P<0.05$)。4 个处理组空肠黏膜和回肠黏膜的 *NQO1* mRNA 相对表达量均无显著差异($P>0.05$)。

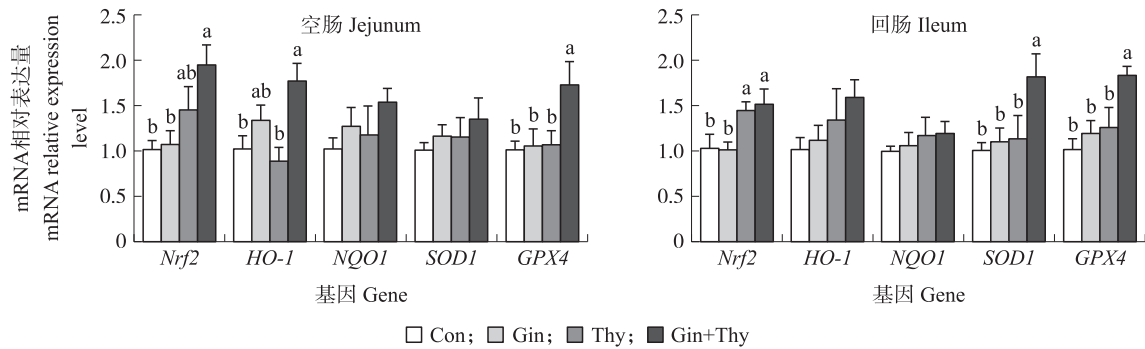


图 2 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜抗氧化相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of gingerol, thymol and their combination on expression of antioxidant related genes in the small intestinal mucosa of broilers

2.5 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜紧密连接相关基因表达的影响

由图 3 可知:与 Con 组相比, Gin+Thy 组空肠和回肠黏膜中的 *Occludin* mRNA 相对表达量显著提高 ($P < 0.05$), 并且 Gin+Thy 组回肠黏膜中的 *Occludin* mRNA 相对表达量显著高于 Gin 组和 Thy 组 ($P < 0.05$)。4 个处理组空肠黏膜和回肠黏膜的 *ZO-1* 和 *Claudin-1* mRNA 相对表达量均无显著差异 ($P > 0.05$)。

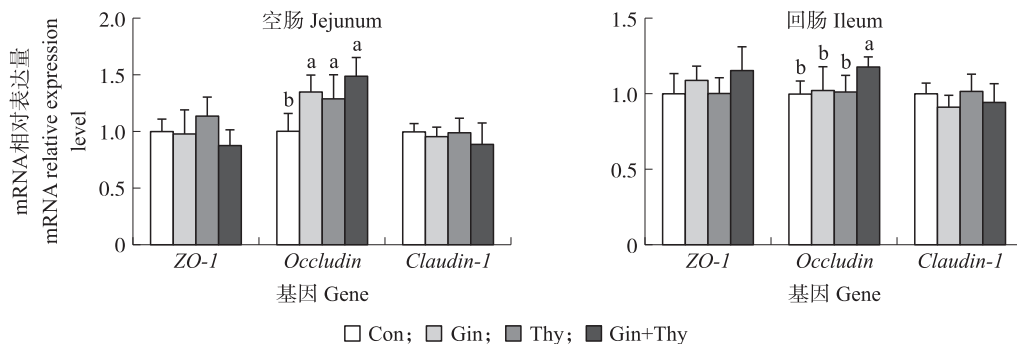


图 3 姜酚、百里香酚及其组合对肉鸡小肠黏膜紧密连接相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of gingerol, thymol and their combination on expression of tight junction related genes in the small intestinal mucosa of broilers

3 讨论

空肠和回肠是养分吸收的重要场所,完整的形态结构是其高效发挥生理功能和进一步促进动物生长所必需的条件。绒毛高度和隐窝深度分别是肠道消化和吸收功能以及细胞成熟率的主要指标,绒毛高度/隐窝深度综合反映了小肠的功能状态,比值上升表示肠道消化吸收能力提高^[20]。研究表明,日粮添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 植物精油(百里香酚有效含量为 10%)显著提高了肉鸡空肠绒毛高度^[21],而 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干姜粉(总多酚含量为 2.7%)显著提高了 84 日龄珍珠鸡十二指肠和回肠绒毛高度,并显著降低了十二指肠和回肠隐窝深度^[22]。在本研究中,姜酚和百里香酚组肉鸡回肠绒毛高度和对照组相比有增加的趋势,且肉鸡回肠绒毛比显著高于对照组和姜酚组。这表明姜酚和百里香酚组可以通过提高小肠绒毛高度和绒毛比来改善肠道组织形态,提高肉鸡肠道的消化吸收功能。

肠道 sIgA 含量以及促炎和抗炎等细胞因子含量可在一定程度上反映机体免疫功能高低。sIgA 是一种主要分布在肠道黏膜层的免疫球蛋白,充当保护肠腔免受抗原和病原体侵害的第一道防线,是家禽体液免疫的主效应因子^[23]。动物肠道黏膜免疫功能常与细胞因子调控的炎症反应有关。姜酚和百里香酚具有免疫调节作用:日粮添加 $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生姜通过增强免疫细胞杀菌活性、降低 NO 水平和调节细胞因子表达发挥先天免疫调节作用^[24];在肉仔鸡日粮中添加姜粉可提高淋巴细胞转化率,增加肉仔鸡血液中粒细胞和中间细胞数,从而提高肉仔鸡的免疫性能^[25];Liang 等^[26]在体外试验发现,百里香酚可通过干扰 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的激活,抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达,发挥抗炎作用。本试验结果表明,姜酚和百里香酚组能显著提高肉鸡空肠和回肠黏膜中 sIgA 含量,显著降低空肠黏膜中 IL-6 和 IFN- γ 含量和回肠黏膜中

IL-6 和 IL-1 β 含量,表明姜酚和百里香酚组合能够通过提高免疫球蛋白含量和降低促炎细胞因子的产生对肉鸡细胞免疫和体液免疫产生明显的免疫调节作用,从而提高肉鸡小肠免疫功能。姜酚与百里香酚组合使用的效果优于单独添加姜酚或百里香酚,这可能是由于姜酚的生物利用度较低,而百里香酚与姜酚配合能够提高姜酚的利用率,具体机制还需要进一步研究。

机体正常代谢产生的适量氧自由基 (ROS) 对机体无害甚至有益,在多种生理过程中发挥作用,然而 ROS 产生过量会破坏机体正常秩序及生理代谢。动物机体中的一些关键抗氧化酶(如 SOD、GSH-Px 和 CAT) 和非酶抗氧化物(如 GSH) 共同调控保护细胞免受氧化应激损伤^[27]。T-AOC 反映总体的抗氧化能力,SOD 可清除过量超氧阴离子自由基,GSH-Px 能催化过氧化氢分解,均可降低 ROS 的水平^[28]。有研究表明,姜酚的抗氧化活性与其分子结构中的酚羟基和 β -羟基酮有关^[29]。Masuda 等^[30] 研究发现姜酚不仅能够提供电子,对自由基进行清除,还能够加强抗氧化物质与底物的亲和性,这可能是姜酚具有抗氧化活性的原因。百里香酚所含有的酚羟基可以作为氢供体与过氧自由基结合,阻断氧化链式反应^[31],其以浓度依赖性方式显示出强效的超氧阴离子、羟基自由基和 DPPH 自由基清除和还原能力,并能保护脂质免受氧化损伤^[10]。在本研究中,姜酚和百里香酚组合能显著提高空肠和回肠黏膜中 T-AOC 和 GSH-Px 活性,此结果与前人研究结果一致^[32-33]。从分子生物学角度看,抗氧化酶活性的提高与基因转录有关。Nrf2 是机体抗氧化系统中关键的核转录因子,通过与抗氧化元件的结合诱导 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶的表达以及 GSH 的合成^[34]。本研究中,姜酚和百里香酚组合可显著上调肉鸡空肠黏膜 *Nrf2*、*HO-1*、*GPX* 和回肠黏膜 *Nrf2*、*SOD1*、*GPX* mRNA 相对表达量,说明姜酚和百里香酚可通过调节 Nrf2 信号通路提高肠道内抗氧化酶活性,从而提高肉鸡的抗氧化能力。

肠上皮细胞间紧密连接结构是肠黏膜物理屏障的重要结构基础。闭合蛋白(Occludin)是肠道紧密连接蛋白的组成成分之一,其丢失将导致细胞旁大分子的渗透性增加^[35]。研究表明,姜酚通过提高 *ZO-1*、*Occludin* mRNA 表达来恢复 DSS 诱导的结肠炎小鼠的肠道屏障^[36];而百里香酚可通过剂量依赖的方式提高产气荚膜梭菌攻毒肉仔鸡回肠黏膜中 *Occludin* mRNA 表达^[13]。与前人研究一致,本研究结果显示,姜酚和百里香酚组合可显著提高肉鸡空肠和回肠黏膜中 *Occludin* mRNA 相对表达量,且回肠黏膜中 *Occludin* mRNA 相对表达量显著高于单一植物提取物组,表明日粮添加姜酚和百里香酚可改善肉鸡肠道屏障功能。此外据报道,促炎因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 可通过调节细胞骨架蛋白的重组,直接导致紧密连接蛋白的重排,从而破坏屏障功能,TNF- α 则会显著破坏紧密连接蛋白的表达和分布^[37-38]。肠道氧化应激也会干扰紧密连接蛋白组装,破坏肠上皮屏障功能^[39]。本研究表明,姜酚和百里香酚组合能够降低促炎因子的产生并增强肠道抗氧化能力。因此,姜酚和百里香酚组合改善肉鸡肠道屏障功能可能与其能够增强肠道免疫功能和肠道抗氧化能力有关。

综上所述,日粮添加姜酚和百里香酚能改善肉鸡的空肠和回肠形态结构,提高小肠抗氧化能力和免疫功能,有助于改善肠黏膜屏障功能。姜酚和百里香酚组合的效果优于单一成分的姜酚或百里香酚,二者具有较好的组合效应。

参考文献 References:

- [1] Liu S D, Song M, Yun W, et al. Effects of oral administration of different dosages of carvacrol essential oils on intestinal barrier function in broilers[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2018, 102(5): 1257-1265.
- [2] Wang C, Liu Q, Ye F C, et al. Dietary purslane (*Portulaca oleracea* L.) promotes the growth performance of broilers by modulation of gut microbiota[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 1-11.
- [3] 李盼盼, 李润林, 吴佳庆, 等. 橙皮苷和迷迭香酸组合对脂多糖攻毒大鼠回肠形态、菌群结构以及炎症反应的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(4): 2689-2701.
Li P P, Li R L, Wu J Q, et al. Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on ileal morphology, microbiota structure and inflammatory response of lipopolysaccharide-challenged rats[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(4): 2689-2701 (in Chinese with English abstract).
- [4] Si W H, Chen Y P, Zhang J H, et al. Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 1117-1125.
- [5] Alsahli M A, Almatroodi S A, Almatroudi A, et al. 6-gingerol, a major ingredient of ginger attenuates diethylnitrosamine-induced liver injury in rats through the modulation of oxidative stress and anti-inflammatory activity[J]. *Mediators of Inflammation*, 2021, 2021: 1-17.
- [6] 刘伟, 赵婧, 陈冬, 等. 姜酚的抑菌机制研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(11): 92-100.

- Liu W,Zhao J,Chen D,et al. Study on antibacterial mechanism of gingerol[J]. Modern Food Science and Technology,2015,31(11):92-100 (in Chinese).
- [7] Kim Y,Kim D M,Kim J Y. Ginger extract suppresses inflammatory response and maintains barrier function in human colonic epithelial caco-2 cells exposed to inflammatory mediators[J]. Journal of Food Science,2017,82(5):1264-1270.
- [8] Karangiya V K,Savsani H H,Patil S S,et al. Effect of dietary supplementation of garlic,ginger and their combination on feed intake,growth performance and economics in commercial broilers[J]. Veterinary World,2016,9(3):245-250.
- [9] Yu Y M,Chao T Y,Chang W C,et al. Thymol reduces oxidative stress,aortic intimal thickening,and inflammation-related gene expression in hyperlipidemic rabbits[J]. Journal of Food and Drug Analysis,2016,24(3):556-563.
- [10] Nagoor M F,Jagadeesh G S,Selvaraj P. Thymol,a dietary monoterpene phenol abrogates mitochondrial dysfunction in β -adrenergic agonist induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress[J]. Chemico-Biological Interactions,2016,244:159-168.
- [11] Yao L,Hou G,Wang L,et al. Protective effects of thymol on LPS-induced acute lung injury in mice[J]. Microbial Pathogenesis,2018,116:8-12.
- [12] Omonijo F A,Liu S X,Hui Q R,et al. Thymol improves barrier function and attenuates inflammatory responses in *Porcine* intestinal epithelial cells during lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2019,67(2):615-624.
- [13] Du E C,Wang W W,Gan L P,et al. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology,2016,7:19.
- [14] Ali B H,Blunden G,Tanira M O,et al. Some phytochemical,pharmacological and toxicological properties of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research[J]. Food and Chemical Toxicology,2008,46(2):409-420.
- [15] Gavaric N,Mozina S S,Kladar N,et al. Chemical profile,antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils,thymol and carvacrol and their possible synergism[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants,2015,18(4):1013-1021.
- [16] Pei R S,Zhou F, Ji B P,et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol,cinnamaldehyde,thymol,and carvacrol against *E. coli* with an improved method[J]. Journal of Food Science,2009,74(7):M379-M383.
- [17] Zhou F, Ji B P, Zhang H, et al. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Food Protection,2007,70(7):1704-1709.
- [18] Lambert R J W,Skandamis P N,Coote P J,et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol[J]. Journal of Applied Microbiology,2001,91(3):453-462.
- [19] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [20] Cairo P L G,Gois F D,Sbardella M,et al. Effects of dietary supplementation of red pepper(*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance,small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2018,98(2): 541-548.
- [21] 周洪彬,魏景坤,刘洋,等. 植物精油对肉仔鸡生长性能、免疫功能及肠道发育的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(8):3887-3895.
- Zhong H B, Wei J K, Liu Y, et al. Effects of plant essential oil on growth performance,immune function and intestinal development of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2020,32(8):3887-3895(in Chinese with English abstract).
- [22] Oso A O,Awe A W,Awosoga F G,et al. Effect of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) on growth performance,nutrient digestibility,serum metabolites,gut morphology,and microflora of growing Guinea fowl[J]. Tropical Animal Health and Production,2013,45(8):1763-1769.
- [23] 张柏林,杨乾,刘宁,等. 饲料添加L-谷氨酰胺对脂多糖刺激肉鸡血浆生化指标、免疫功能、肠道炎症因子表达及黏膜免疫的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(6):2611-2623.
- Zhang B L, Yang Q, Liu N, et al. Effects of dietary L-glutamine supplementation on plasma biochemical parameters,immune performance, intestinal inflammatory factors expression and mucosal immune of broilers challenged by lipopolysaccharide[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2020,32(6):2611-2623(in Chinese with English abstract).
- [24] Elmowalid G A,Abd El-Hamid M I,Abd El-Wahab A M,et al. Garlic and ginger extracts modulated broiler chicks innate immune responses and enhanced multidrug resistant *Escherichia coli* O78 clearance [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 66:101334.
- [25] 张桂凤. 生姜对肉鸡生产性能、抗氧化性能及肉品质影响的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2010:25-50.
- Zhang G F. Effects of ginger on production performance,antioxidant performance and meat quality of broilers[D]. Tai'an:Shandong Agricultural University,2010:25-50(in Chinese with English abstract).
- [26] Liang D J,Li F Y,Fu Y H,et al. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells[J]. Inflammation,2014,37(1):214-222.
- [27] Sophie G,Els V,Joris M,et al. Impact of red versus white meat consumption in a prudent or western dietary pattern on the oxidative status in a pig model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2019,67(19):5661-5671.
- [28] Vieira T F,Corrêa R C G,Peralta R A,et al. An overview of structural aspects and health beneficial effects of antioxidant oligosaccharides[J]. Current Pharmaceutical Design,2020,26(16):1759-1777.
- [29] 杨光. 6-姜酚生物学作用的细胞与分子机制研究[D]. 大连:大连医科大学,2011:69-76.
- Yang G. Study on cellular and molecular mechanism of biological action of 6-gingerol[D]. Dalian:Dalian Medical University,2011:69-76 (in Chinese with English abstract).

- [30] Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, et al. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger[J]. *BioFactors*, 2004, 21(1/2/3/4): 293–296.
- [31] Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil[J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(4): 633–640.
- [32] Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A, et al. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(8): 2059–2069.
- [33] Wen C, Liu Y, Ye Y W, et al. Effects of gingerols-rich extract of ginger on growth performance, serum metabolites, meat quality and antioxidant activity of heat-stressed broilers[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2020, 89: 102544.
- [34] Hu H, Dai S F, Li J Q, et al. Glutamine improves heat stress-induced oxidative damage in the broiler thigh muscle by activating the nuclear factor erythroid 2-related 2/Kelch-like ECH-associated protein 1 signaling pathway[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(3): 1454–1461.
- [35] Al-Sadi R, Khatib K, Guo S H, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 300(6): G1054–G1064.
- [36] Kim M S, Kim J Y. Ginger attenuates inflammation in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(5): 1493–1501.
- [37] Zhou H Y, Zhu H, Yao X M, et al. Metformin regulates tight junction of intestinal epithelial cells via MLCK-MLC signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(22): 5239–5246.
- [38] Kim K Y, Oh T W, Do H J, et al. *Acer palmatum thumb.* ethanol extract alleviates interleukin-6-induced barrier dysfunction and dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation[J]. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 5718396.
- [39] Wang N, Wang G, Hao J X, et al. Curcumin ameliorates hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by upregulating heme oxygenase-1 expression in human intestinal epithelial cells[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(7): 1792–1801.

责任编辑:周广礼 沈 波