



刘静,王钊,于昊,等.日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠屏障相关基因表达、消化酶活性和微生物菌群的影响[J].南京农业大学学报,2024,47(1):142-150.

LIU Jing,WANG Zhao,YU Hao,et al.Effects of dietary broad bean skin on barrier-related gene expression,digestive enzyme activity and microflora of jejunum in Hu sheep[J].Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):142-150.

## 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠屏障相关基因表达、消化酶活性和微生物菌群的影响

刘静<sup>1</sup>,王钊<sup>1</sup>,于昊<sup>1</sup>,夏雨婷<sup>1</sup>,李鹏<sup>2</sup>,牛伟强<sup>2</sup>,万永杰<sup>1</sup>,茆达干<sup>1\*</sup>

(1.南京农业大学动物科技学院,江苏南京 210095;2.启东瑞鹏牧业有限公司,江苏南通 226000)

**摘要:**[目的]本试验旨在研究日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠屏障相关基因表达、消化酶活性和微生物菌群的影响。[方法]30只4月龄体重相近[(27±2.0)kg]的雄性湖羊分为2组,分别饲喂基础日粮(对照组,CON)和添加30%蚕豆皮日粮(蚕豆皮组,BBS)。预饲期10d,正式期50d。试验结束后采集空肠组织及食糜(n=5),通过RT-qPCR检测黏膜屏障相关基因的表达,生化试剂盒检测消化酶活性,高通量测序分析食糜微生物菌群。[结果]与对照组相比,BBS组空肠黏膜细胞连接基因*Claudin-1*、*Occludin*、*MUC-2*和*ZO-1*,促炎因子*IL-6*、*IL-10*和*TNF-α* mRNA水平无显著变化( $P>0.05$ ),而*IL-1β* mRNA水平显著降低( $P<0.05$ )。2组空肠黏膜α-淀粉酶、胰蛋白酶和脂肪酶活性无显著变化( $P>0.05$ )。BBS组食糜微生物Shannon、Chao1和Observed\_otus指数显著降低( $P<0.05$ );门水平上,BBS组变形菌门(Proteobacteria)相对丰度显著升高( $P<0.05$ ),厚壁菌门(Firmicutes)、龛骨细菌门(Patescibacteria)相对丰度和F/B值显著降低( $P<0.05$ );属水平上,BBS组克氏斯滕森氏菌R7菌群(*Christensenellaceae\_R-7\_group*)、未分类厚壁菌属(*Firmicutes\_unclassified*)、糖单胞菌属(*Candidatus\_Saccharimonas*)、糖酵解菌属(*Saccharofermentans*)、毛螺科NK3A20菌群(*Lachnospiraceae\_NK3A20\_group*)和聚乙酸菌属(*Acetitomaculum*)的相对丰度显著下降( $P<0.05$ )。16S rDNA基因组的PICRUSt2功能预测结果显示,空肠微生物差异菌群主要富集在三羧酸循环、脂肪酸β氧化、原儿茶酸降解和L-亮氨酸降解通路。[结论]日粮添加30%蚕豆皮可降低空肠黏膜炎症因子*IL-1β* mRNA表达量,改变空肠食糜微生物菌群多样性和相对丰度,调节肠道发酵环境。研究结果为蚕豆皮在养羊业发展中的应用提供参考。

**关键词:**蚕豆皮;湖羊;空肠;屏障功能;消化酶活性;微生物菌群

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0142-09

## Effects of dietary broad bean skin on barrier-related gene expression, digestive enzyme activity and microflora of jejunum in Hu sheep

LIU Jing<sup>1</sup>,WANG Zhao<sup>1</sup>,YU Hao<sup>1</sup>,XIA Yuting<sup>1</sup>,LI Peng<sup>2</sup>,NIU Weiqiang<sup>2</sup>,WAN Yongjie<sup>1</sup>,MAO Dagan<sup>1\*</sup>

(1.College of Animal Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;

2.Qidong Ruipeng Animal Husbandry Co.,Ltd.,Nantong 226000,China)

**Abstract:**[Objectives]This study aimed to investigate the effect of adding broad bean skin (BBS)to the diet on the barrier-related gene expression,digestive enzyme activity and microflora of the jejunum in Hu sheep. [Methods]Thirty 4-month-old male Hu sheep with similar body weight[(27±2.0)kg]were divided into two groups,feeding with basal diet(CON)and diet with 30% broad bean skin (BBS),respectively. The pre-feeding period was 10 days,and the formal period was 50 days. At the end of the experiment,jejunal tissue and chyme were collected(n=5),mucosal barrier-related gene expressions were detected by RT-qPCR,mucosal digestive enzyme activities were detected by biochemical kits,and chyme microbial was analyzed by high-throughput sequencing. [Results]Compared with CON group,the jejunal mucosal cell junction genes *Claudin-1*、*Occludin*、*MUC-2* and *ZO-1*,pro-inflammatory factors *IL-6*、*IL-10* and *TNF-α* mRNA levels in the BBS group had no significant changes ( $P>0.05$ ),while the expression level of *IL-1β* mRNA significantly decreased( $P<0.05$ ). There was no significant change in the mucosal α-amylase,trypsin and lipase activities between two groups( $P>0.05$ ). The microbial Shannon index,Chao1 index and Observed\_otus index in the BBS group significantly decreased( $P<0.05$ ). At the phylum level,the relative abundance of Proteobacteria in the BBS group significantly increased( $P<0.05$ ),while the

收稿日期:2022-09-04

基金项目:江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2021]478,JATS[2021]162);启东市科技计划项目(现代农业)(2022-3)

\*通信作者:茆达干,教授,研究方向为动物生殖生理与肉羊繁育,E-mail:maodagan@njau.edu.cn。

relative abundance of Firmicutes, Patescibacteria and F/B value significantly decreased ( $P < 0.05$ ). At the genus level, the relative abundance of *Christensenellaceae\_R-7\_group*, *Firmicutes\_unclassified*, *Candidatus\_Saccharimonas*, *Saccharofermentans*, *Lachnospiraceae\_NK3A20\_group* and *Acetivomaculum* significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The functions of jejunal microbial differential flora were mainly enriched in the tricarboxylic acid cycle, fatty acid  $\beta$ -oxidation, protocatechuic acid degradation and *L*-leucine degradation pathways. [Conclusions] The addition of 30% BBS in the diet can decrease the jejunum mucosal inflammatory factor *IL-1 $\beta$*  mRNA expression level, change the jejunum chyme microbial flora diversity and relative abundance, and regulate intestinal fermentation environment. The results will provide a reference for the application of broad bean skin in the development of sheep industry.

**Keywords:** broad bean skin; Hu sheep; jejunum; barrier function; digestive enzyme activity; microflora

肉羊产业是畜牧业的重要组成部分,但常规饲料资源短缺等问题阻碍了肉羊产业的发展。开发非常规饲料资源、丰富饲料种类是促进养羊业可持续发展的关键。蚕豆是我国重要的粮食作物和饲料原料,然而在长江以南等蚕豆主产区,其副产物蚕豆皮未得到充分利用。蚕豆皮除常规营养成分外,含有果胶和多巴等化学成分,并富含膳食纤维及原花青素等生物活性物质。研究表明,在动物饲料中添加一定比例的蚕豆皮膳食纤维,有利于促进肠道蠕动、吸收营养物质、提高动物生长性能,且蚕豆皮中的原花青素是其发挥抗氧化活性作用的主要成分<sup>[1]</sup>。豆皮可被肠道微生物利用,经肠道中的菌群发酵而发挥益生元作用,促进有益菌的增殖,抑制有害菌的增殖,维持肠道微生态平衡<sup>[2]</sup>。

研究表明,空肠上皮细胞对调节营养物质的摄取和代谢发挥着重要作用,对微生物的定殖能立刻做出反应<sup>[3]</sup>,其上皮细胞可利用膳食纤维经微生物发酵产生短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)为反刍动物提供能量来源,并且调节肠道炎症反应<sup>[4]</sup>。肠黏膜上皮细胞彼此相连,构成完整的生物屏障,细胞质膜蛋白与接头蛋白形成的蛋白网状结构是紧密连接的重要部分<sup>[5]</sup>,具有调节肠道通透性的作用。炎症细胞因子影响肠黏膜紧密连接蛋白表达和分布<sup>[6]</sup>。消化酶可促进食物中糖、脂肪和蛋白质的水解,这一过程主要发生在十二指肠和空肠段。肠道微生物结构主要受日粮组成的影响,还与外界应激和生殖激素等密切相关<sup>[7]</sup>。

本课题组前期在等能等氮的基础上,分别在基础日粮中添加不同比例的蚕豆皮日粮饲喂湖羊,结果发现日粮添加 30% 蚕豆皮组湖羊的生长性能显著提高。肠道是继瘤胃消化吸收后的主要营养物质吸收场所,影响反刍动物生产性能等。研究表明小肠对营养物质的消化吸收受到肠道屏障功能、消化酶活性及肠道菌群结构等因素的影响<sup>[8]</sup>。因此,本试验以湖羊空肠为对象,研究日粮添加 30% 蚕豆皮对黏膜屏障相关基因表达、消化酶活性和食糜微生物区系的影响,以探究改善湖羊生产性能的潜在机制,为蚕豆皮的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和试验日粮

选择体况良好、体重相近[(27±2.0) kg]的 4 月龄雄性湖羊 30 只,随机分为 2 组( $n = 15$ ),每组 3 个重复,每个重复 5 只羊。对照组(CON)饲喂基础日粮,试验组(BBS)饲喂添加 30% 蚕豆皮的基础日粮。2 组日粮组成和营养成分见表 1。

### 1.2 试验设计与样品采集

预试期为 10 d,正式期 50 d。试验期间,每天 08:00 和 14:00 各饲喂 1 次,自由采食和饮水。试验结束,每组选择中位体重的 5 只羊屠宰( $n = 5$ ),宰前禁食 24 h、禁水 2 h,颈动脉放血屠宰。解剖后采集空肠组织样品和食糜于冻存管中,干冰保存带回实验室-80 °C 冷冻保存,用于后续肠黏膜屏障相关基因、消化酶活性和食糜微生物测序试验。

### 1.3 试验样品测定

**1.3.1 空肠黏膜屏障相关基因表达量** 应用 RT-qPCR 检测空肠黏膜屏障相关基因 mRNA 相对表达量,包括闭合蛋白 1 基因(*Claudin-1*)、闭锁蛋白基因(*Occludin*)、黏蛋白 2 基因(*mucoprotein-2*, *MUC-2*)、闭合小环蛋白基因(*zonula occludens-1*, *ZO-1*)、白细胞介素 6 基因(*interleukin-6*, *IL-6*)、白细胞介素 10 基因(*interleukin-10*, *IL-10*)、白细胞介素 1 $\beta$  基因(*interleukin-1 $\beta$* , *IL-1 $\beta$* )和肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因(*tumor necrosis factor-alpha*, *TNF- $\alpha$* )。使用 RNA 提取试剂盒(RC112,南京诺唯赞生物科技有限公司)提取组织总 RNA,反转录试剂盒(R323-01,南京诺唯赞生物科技有限公司)获得 cDNA,定量试剂盒(Q311-01,南京诺唯赞

生物科技有限公司)检测 mRNA 相对表达量。所用引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列如表 2 所示。对内参基因  $\beta$ -actin 标准化后,通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算基因相对表达水平。

表 1 日粮组成及营养组成水平(风干基础)

Table 1 Diet composition and nutritional level(air-dry basis)

日粮组成 Diet composition	CON		BBS		营养组成 Nutrient content	CON		BBS	
玉米 Corn	24.9	0.4			消化能 Digestible energy( DE)	12.5	12.8		
麸皮 Bran	8.3	33.8			干物质 Dry matter(DM)	62.0	60.0		
豆粕 Soybean meal	15.0	13.6			粗蛋白 Crude protein( CP)	14.0	14.2		
食盐 NaCl	0.8	1.2			粗灰分 Crude ash	12.9	9.8		
小苏打 NaHCO <sub>3</sub>	1.5	2.1			粗脂肪 Ether extract( EE)	8.8	10.1		
预混料 Premix	2.9	2.4			中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber( NDF)	51.3	51.5		
花生秧 Peanut seedling	5.0	0.0			酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber( ADF)	39.2	29.3		
蚕豆皮 Broad bean skin	0.0	30.0			钙 Ca	0.4	0.4		
豆渣 Okara	6.3	3.9			磷 P	0.6	0.7		
木薯粉 Cassava flour	22.7	0.0							
青贮玉米秸 Silage corn stalk	12.6	12.6							

注:1) CON:对照组;BBS:蚕豆皮组;2) 预混料为每千克饲料提供:锰 0.5 g,铁 0.7 g,锌 0.5 g,铜 0.1 g,维生素 A 7 000 IU,维生素 D<sub>3</sub> 1 000 IU,维生素 E 100 IU;3) DE、CP、Ca 和 P 为计算值,DM、粗灰分、EE、NDF 和 ADF 为测定值;4) 消化能单位为 MJ·kg<sup>-1</sup>。

Note:1) CON:Control group;BBS:Broad bean skin group;2) Premixtures for feed per kg:Mn 0.5 g,Fe 0.7 g,Zn 0.5 g,Cu 0.1 g,vitamin A 7 000 IU, vitamin D<sub>3</sub> 1 000 IU,vitamin E 100 IU;3) DE,CP,Ca and P are calculated values,while DM,crude ash,EE,NDF and ADF are measured values;4)The unit of digestive energy is MJ·kg<sup>-1</sup>.

表 2 目的基因引物序列

Table 2 Primer sequences of target genes

基因 Genes	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物长度/bp Product length
<i>Claudin-1</i>	NM_001185016.1	F: TTCATCCTGGCGTTTCTGGG R: TTGCTTGCAGACTGCTGTTTC	208
<i>Ocludin</i>	XM_004016905.5	F: CTCGGCAGGACAGGAACAAAA R: TCGAACTTGTCATGGTGCT	67
<i>MUC-2</i>	XM_042237826.1	F: CACCACCCTTCCAGGCTC R: GAGGTAGGGCTTGTGCTGAG	105
<i>ZO-1</i>	XM_042235170.1	F: CCAGACACTCTCCACAGCAG R: TACACAGGCTTTGGCTCTGG	190
<i>IL-6</i>	NM_001009392.1	F: AATCTGGGTTCAATCAGGCGA R: GTGTGTGGCTGGAGTGTTA	197
<i>IL-10</i>	NM_001009327.1	F: TCGGAAAACAAGAGCAAGGC R: ACACCCCTCTCTGGAGCATA	68
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	NM_001009465.2	F: GCAAAAATCCCTGGTGCTGG R: TGCAGAACACCACTTCTCCG	89
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	XM_012100437.4	F: TGCACCTCGGGTAATCGG R: CGCTGATGTTGGCTACAACG	141
<i><math>\beta</math>-actin</i>	NM_001009784.3	F: CGCAAGTACTCCGTGTGGAT R: TAACGCAGCTAACAGTCCGC	146

1.3.2 空肠黏膜消化酶活性测定 应用生化试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测空肠黏膜胰蛋白酶(A080-2)、脂肪酶(A054-2)和 $\alpha$ -淀粉酶(C016-1)的活性,具体方法参照说明书。

1.3.3 空肠食糜微生物多样性测定 从空肠食糜样品中提取微生物组样本总 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量和浓度。参照 Logue 等<sup>[9]</sup>的方法设计引物序列并进行 PCR 扩增,产物经纯化和定量,扩增子池用于测序,利用 Illumina NovaSeq 6000 测序仪进行测序。测序原始数据经特定条件过滤筛选得到扩增序列变体特征序列(amplicon sequence variant, ASV)和 ASV 丰度表,去除序列数为 1 的 ASV,利用 QIIME2 软件统计微生物群落的  $\alpha$  和  $\beta$  多样性。多样性测定由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.3.4 生物信息学分析 根据 ASV 序列文件,采用 SLIVA 数据库和 NT-16S 数据库进行物种注释,并根据 ASV 丰度表对各物种在各样本中的丰度进行统计。注释置信度阈值为 0.7。基于 PICRUSt 2 功能预测结果,得到来自 KO 等数据库功能注释结果,以展示丰度差异显著的功能。

### 1.4 数据统计与分析

采用 IBM-SPSS 19.0 软件统计试验数据,结果以平均值±标准误( $\bar{x}\pm SE$ )表示。采用  $t$  测验进行差异显著性分析, $P<0.05$  表示差异显著, $P<0.01$  表示差异极显著。基于微生物丰度信息,对各组之间的差异进行分析,用 Mann-Whitney U test 比较生物学重复 2 组样品差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠黏膜屏障相关基因表达的影响

由表 3 可知:日粮添加 30%蚕豆皮(BBS)组湖羊空肠中编码细胞连接相关基因 *Claudin-1*、*Occludin*、*MUC-2*、*ZO-1* mRNA 水平较对照组(CON)无显著变化( $P>0.05$ ),编码炎症因子相关基因 *IL-6*、*IL-10* 和 *TNF- $\alpha$*  的 mRNA 水平较对照组无显著变化( $P>0.05$ ),但 *IL-1 $\beta$*  mRNA 水平在 BBS 组中显著降低( $P<0.05$ )。

表 3 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠屏障相关基因表达的影响

Table 3 Effects of dietary broad bean skin (BBS) on jejunum barrier-related gene expressions in Hu sheep

基因 Gene	CON	BBS	基因 Gene	CON	BBS
<i>Claudin-1</i>	1.00±0.13	0.75±0.06	<i>IL-6</i>	1.00±0.03	1.48±0.20
<i>Occludin</i>	1.00±0.13	1.26±0.58	<i>IL-10</i>	1.00±0.15	0.83±0.20
<i>MUC-2</i>	1.00±0.22	1.08±0.20	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	1.00±0.13	0.54±0.06*
<i>ZO-1</i>	1.00±0.20	1.29±0.25	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	1.00±0.12	0.82±0.28

注: \* 表示与对照组相比差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: \* indicates significant difference compared with the CON group ( $P<0.05$ ). The same below.

### 2.2 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠黏膜消化酶活性的影响

由表 4 可知:日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠黏膜  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶和胰蛋白酶的活性均无显著影响( $P>0.05$ )。

表 4 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠黏膜消化酶活性的影响

Table 4 Effects of dietary BBS on the activity of digestive enzymes in the jejunum mucosa of Hu sheep

指标 Index	CON	BBS
$\alpha$ -淀粉酶活性 $\alpha$ -amylase activity	0.06±0.009	0.07±0.004
脂肪酶活性 Lipase activity	8.47±1.76	10.36±2.55
胰蛋白酶活性 Trypsin activity	2.92±0.33	2.78±0.21

### 2.3 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜微生物多样性的影响

韦恩(Venn)图反映肠道内容物样品的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数目。每组各检测 4 个样本(2 组各有 1 个样本菌群含量过少,均未上机进行后续测序)。由图 1 可知:CON 组和 BBS 组分别有 1 445 和 549 个特异 OTU,其中 417 个为共同 OTU。不同分组肠道菌群组成的 OUT 指数存在显著差异。空肠食糜细菌的主成分分析结果如图 2,主成分 1 和 2 的贡献率分别为 87.08%和 5.79%。同一组别内样品间距离较近,不同组别样品间的距离也较近,说明 2 组湖羊空肠食糜菌群结构相似。由表 5 可知:CON 的 Shannon、Chao1 和 Observed\_otus 指数显著高于 BBS 组( $P<0.05$ ),2 组覆盖率均在 99%以上。

由图 1 可知:CON 组和 BBS 组分别有 1 445 和 549 个特异 OTU,其中 417 个为共同 OTU。不同分组肠道菌群组成的 OUT 指数存在显著差异。空肠食糜细菌的主成分分析结果如图 2,主成分 1 和 2 的贡献率分别为 87.08%和 5.79%。同一组别内样品间距离较近,不同组别样品间的距离也较近,说明 2 组湖羊空肠食糜菌群结构相似。由表 5 可知:CON 的 Shannon、Chao1 和 Observed\_otus 指数显著高于 BBS 组( $P<0.05$ ),2 组覆盖率均在 99%以上。

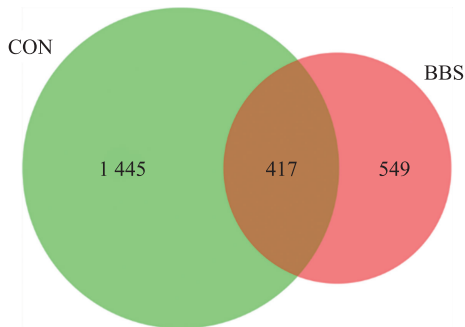


图 1 食糜微生物韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of chyme

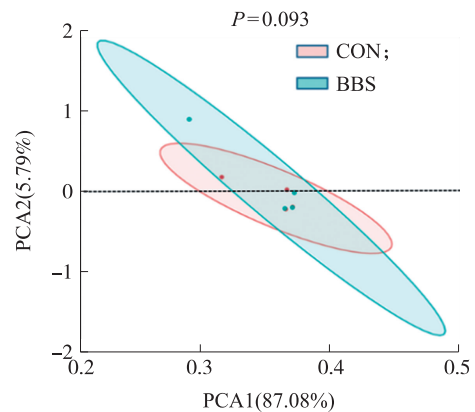


图 2 主成分分析图

Fig. 2 Principal components analysis (PCA) diagram

表 5 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜微生物 α 多样性的影响

Table 5 Effects of dietary BBS on the microbial alpha diversity of jejunum chyme in Hu sheep

指标 Index	CON	BBS
Shannon 指数 Shannon index	5.34±0.71	2.70±0.45 *
Simpson 指数 Simpson index	0.83±0.06	0.57±0.10
Chao1 指数 Chao1 index	657.63±74.48	308.64±60.90 *
Observed_otus 指数 Observed_otus index	656.50±74.71	307.75±60.59 *
覆盖率/% Goods coverage	99.92±0.01	99.95±0.01

2.4 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜微生物菌群结构和功能的影响

2.4.1 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜微生物菌群结构的影响 有效序列不同分类水平的物种注释统计结果如表 6,以相对丰度 ≥1% 为准,低于 1% 的菌门归为其他。由表 6 可知:CON 组的优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria),BBS 组的优势菌门除上述菌门之外还有软壁菌门(Tenericutes)。相比对照组,BBS 组变形菌门的相对丰度较显著增加( $P<0.05$ ),厚壁菌门和骸骨细菌门的相对丰度显著降低( $P<0.05$ )。

表 6 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜细菌门水平丰度的影响

Table 6 Effects of dietary BBS on the abundance of jejunum chyme bacteria in Hu sheep at the phylum level %

门 Phylum	CON	BBS	门 Phylum	CON	BBS
变形菌门 Proteobacteria	42.97±9.08	77.08±5.92 *	骸骨细菌门 Patescibacteria	3.72±1.25	0.50±0.37 *
厚壁菌门 Firmicutes	31.16±6.53	5.98±2.36 *	拟南芥门 Kiritimatiellaeota	3.45±3.11	0.05±0.03
放线菌门 Actinobacteria	11.27±5.27	7.91±4.00	拟杆菌门 Bacteroidetes	0.86±0.22	1.01±0.49
软壁菌门 Tenericutes	3.97±3.81	6.25±6.04	厚壁菌门/拟杆菌 Firmicutes/Bacteroidetes	37.46±2.27	6.63±1.50 **

注:\*\*表示与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

Note:\*\* indicates extremely significant differences compared with the CON group( $P<0.01$ ). The same below.

在属水平上,对相对丰度在前 30 的菌属进行统计,其中相对丰度在 1% 左右的有 14 个菌属。如表 7 所示:BBS 组的克里斯滕森氏菌 R7 菌群(*Christensenellaceae\_R-7\_group*)、未分类厚壁菌属(*Firmicutes\_unclassified*)、糖单胞菌属(*Candidatus\_Saccharimonas*)、糖酵解菌属(*Saccharofermentans*)、毛螺菌 NK3A20 菌群(*Lachnospiraceae\_NK3A20\_group*)和聚乙酸菌属(*Acetitamaculum*)的相对丰度显著降低( $P<0.05$ )。

表 7 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠食糜细菌属水平丰度的影响

Table 7 Effects of dietary BBS on the abundance of jejunum chyme bacteria in Hu sheep at the genus level %

菌属 Bacteria genus	CON	BBS
伯克霍尔德菌-卡巴勒菌-帕拉伯克霍尔德菌 Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia	37.20±8.48	59.41±10.65
卡多维亚氏菌属 <i>Aeriscardovia</i>	10.11±5.29	7.18±3.82
代尔夫特菌属 <i>Delftia</i>	0.94±0.65	9.18±8.42
解脲支原体 <i>Ureaplasma</i>	3.84±3.83	6.17±6.06
克里斯滕森菌科 R7 群 <i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	4.70±1.27	0.64±0.31 *
未分类厚壁菌属 <i>Firmicutes_unclassified</i>	4.42±0.75	0.88±0.49 **
糖单胞菌属 <i>Candidatus_Saccharimonas</i>	3.71±1.24	0.49±0.36 *
未分类 WCHB141 WCHB141_unclassified	3.45±3.11	0.05±0.03
糖酵解菌属 <i>Saccharofermentans</i>	3.21±0.98	0.23±0.18 *
瘤胃球菌 NK4A214 科 <i>Ruminococcaceae_NK4A214_group</i>	2.74±1.41	0.57±0.20
未分类鞘脂单胞菌科 <i>Sphingomonadaceae_unclassified</i>	0.95±0.22	1.59±0.20
Family_XIII_AD3011_group	1.56±0.43	0.43±0.28
毛螺菌科 NK3A20 群 <i>Lachnospiraceae_NK3A20_group</i>	1.49±0.27	0.46±0.24 *
聚乙酸菌属 <i>Acetitamaculum</i>	1.32±0.08	0.25±0.15 **

2.4.2 菌群功能预测分析 利用 16S rDNA 预测工具 PICRUSt 2 软件对这 2 组样品的微生物进行功能预测,参考 KO 数据库并对预测的功能类别进行注释,结果如图 3 所示,2 组湖羊空肠细菌注释到的 KO 分析隶属于 30 个功能类别,丰度较高的功能预测为脂肪酸 β 氧化、原儿茶素降解 II、三羧酸循环 V、L-亮氨酸降解 I、脂肪酸回收、三羧酸循环 I,且 BBS 组显著高于对照组( $P<0.05$ )。

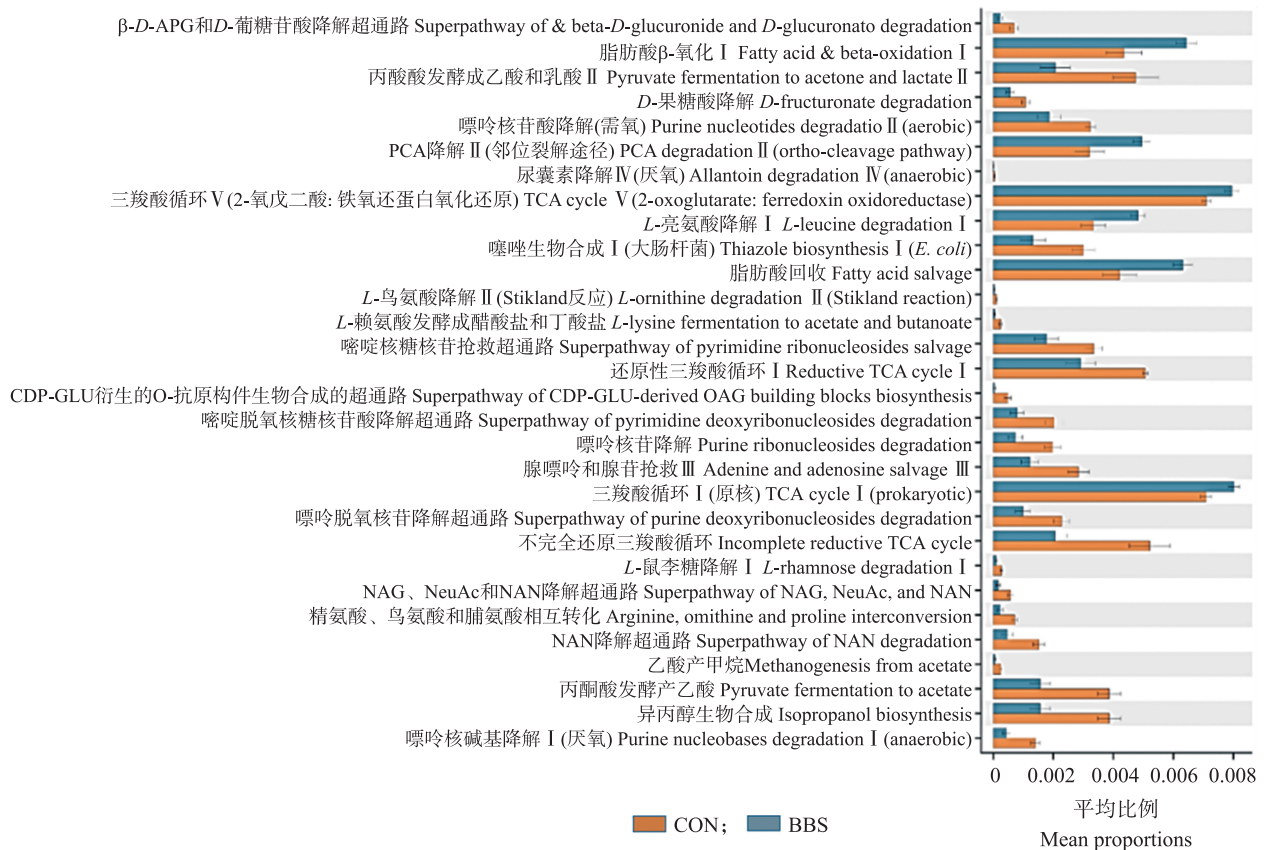


图 3 KEGG 功能注释

Fig. 3 KEGG functional note

### 3 讨论

#### 3.1 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠黏膜屏障相关基因表达量的影响

肠道屏障是机体一道重要的屏障,可以帮助机体抵御外界有害物质。环境的更换以及饲养管理的转变,可能影响肠道功能,使肠道屏障受损。紧密连接蛋白如 Claudin-1、Occludin、ZO-1 等具有调节肠道通透性的作用,蛋白表达上调时,可降低肠道通透性,防止细菌移位,增强肠道屏障功能<sup>[10]</sup>。分泌型黏蛋白 MUC2 是肠上皮细胞分泌的一种高分子质量糖蛋白,肠道黏膜屏障受损会导致 MUC2 表达量下调。山羊运输应激 2 和 6 h 后空肠 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 基因表达量极显著上升<sup>[11]</sup>。日粮添加铝降低了小尾寒羊空肠 *Claudin-1*、*Occludin* 和 *ZO-1* 蛋白表达量<sup>[12]</sup>。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 是介导炎症反应的关键细胞因子,三者会使肠黏膜紧密连接蛋白表达和分布发生变化,表达量升高引起肠道通透性增加,因此,降低这些因子的含量可提高肠道屏障功能。而 IL-10 是由各种细胞分泌的重要抗炎细胞因子,可抑制 TNF- $\alpha$  的释放,对维持肠道免疫稳态至关重要<sup>[13]</sup>,在控制和消除炎症中起重要作用<sup>[14]</sup>。蚕豆皮富含原花青素,原花青素具有抗炎和抗菌的作用,能调节机体免疫反应<sup>[15]</sup>,降低氧化应激导致的肠黏膜损伤<sup>[16]</sup>,从而改善动物健康状况,促进生长。当面临饮食结构改变的压力时,动物肠道容易受到刺激,导致紧密连接蛋白的分解或降低,从而增加上皮通透性,引起局部炎症<sup>[17]</sup>。本试验中,日粮添加 30% 蚕豆皮并未显著改变 *Claudin-1*、*Occludin*、*ZO-1*、*MUC-2* 的 mRNA 水平,说明湖羊对添加蚕豆皮日粮的适应效果较好,并未因饲料结构的改变而产生不良反应,未对肠道造成生理损伤。湖羊采食添加蚕豆皮日粮后空肠黏膜 IL-1 $\beta$  表达量降低,可能蚕豆皮中原花青素具有抗炎作用,保护机体肠道的免疫功能,具体机制有待进一步研究。

#### 3.2 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠消化酶活性的影响

肠道消化酶活性的高低可反映反刍动物采食性能,同时还能直接决定肠道对营养物质吸收和利用的程度。机体的消化功能与其胃肠道所产生的消化酶活性及其分泌量呈正相关,继而影响动物的生长发育。动物自身能够合成淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等消化酶,且不同肠段消化酶活性不同。小肠内消化酶活性受日粮淀粉、脂肪和蛋白质进食量的影响<sup>[18]</sup>。周力等<sup>[19]</sup>使用不同比例棕榈粕替代玉米饲喂藏羊,结果表明

0%组空肠食糜的 $\alpha$ -淀粉酶和脂肪酶活性显著或极显著小于15%组,提示日粮脂肪含量的高低影响脂肪酶的活性。此外,在小麦饲料中添加0.2%木聚糖酶可提高高原型藏羊的空肠 $\alpha$ -淀粉酶活性<sup>[20]</sup>。研究表明,当精粗比和营养成分含量达到一定水平后,改变日粮结构不会提高胰蛋白酶和脂肪酶活性<sup>[21]</sup>。曲星梅等<sup>[22]</sup>研究表明,6月龄绒羊空肠胰蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶和脂肪酶活性随日粮能量和蛋白水平变化,当升高到一定营养水平,肠道消化酶活性不再上升。本试验中,2种日粮的粗蛋白、能量和脂肪含量水平在湖羊需要范围内,且含量接近,这可以解释日粮添加30%蚕豆皮不影响空肠段淀粉酶、脂肪酶和胰蛋白酶活性的结果。

### 3.3 日粮添加蚕豆皮对湖羊空肠微生物菌群结构和功能的影响

肠道菌群在促进肠道形态结构发育、维持正常免疫功能及抵御外源致病因子侵袭方面发挥重要作用<sup>[23]</sup>。Shannon、Simpson、Chao1和Observed\_otus指数反映样本中物种丰富度和均匀度,Goods coverage反映微生物覆盖率,其数值越高,则样本中新物种没有被测出的概率越低。本试验中测序覆盖率接近100%,说明测序样品取样较准确,可以真实地反映湖羊空肠微生物多样性和群落结构<sup>[24]</sup>。本研究发现CON组微生物多样性和数量高于BBS组,表明日粮添加蚕豆皮后降低了肠道微生物多样性。湖羊正常肠道菌群在生长过程中与宿主和环境相互适应,容易受到饮食和环境的影响,BBS组较对照组肠道菌群OUT数量显著降低,这可能与添加蚕豆皮后日粮营养结构发生改变,营养成分丰富度降低有关。

研究表明,牛羊小肠中的变形菌门丰度较高。Zhang等<sup>[25]</sup>对小尾寒羊肠道微生物研究后发现,空肠中存在丰度较高的厚壁菌门和蓝藻菌门,在属水平上乳酸菌、瘤胃球菌和聚乙酸菌的丰度较高。变形菌门包括许多肠道致病菌类别<sup>[26]</sup>,如大肠杆菌等;但变形菌门下的菌群种属并非都是致病菌类,部分也可对有关糖类代谢和蛋白表达的基因进行编码,从而确保肠道的正常厌氧状态<sup>[27]</sup>。姜碧薇等<sup>[28]</sup>研究表明酶菌混合处理虽提高瘤胃变形菌门的相对丰度,但并未对滩羊肠道产生不良影响。厚壁菌门是反刍动物胃肠道细菌的重要组成部分,能够分解饲料中的纤维物质,其优势地位受日粮中纤维物质的影响<sup>[29]</sup>,本试验结果与之相似,湖羊采食添加蚕豆皮日粮后,厚壁菌门丰度随总体纤维含量降低而变化。本试验中,蚕豆皮组拟杆菌门相对丰度有所提高,厚壁菌门的相对丰度降低。厚壁菌门和拟杆菌门协作消化一些动物自身无法利用的物质。潘锋等<sup>[30]</sup>试验结果表明,饲料中添加酵母培养物和糖蜜及两者混合物降低了粪便厚壁菌门相对丰度,提高拟杆菌门相对丰度,提高肉牛的纤维降解率。髌骨细菌门、糖单胞菌属和糖酵解菌属被认为在正常肠道功能中发挥重要作用<sup>[31]</sup>,其相对丰度与炎症反应呈正相关。本试验中,髌骨细菌门、糖单胞菌属和*IL-1 $\beta$* 结果变化趋势表明日粮添加蚕豆皮对肠道正常功能发挥有一定的促进作用。聚乙酸菌属能够利用瘤胃中产生的氢和单糖生成乙酸<sup>[32]</sup>,沈子亮等<sup>[33]</sup>研究发现瘤胃内聚乙酸菌属相对丰度的增加改变了瘤胃发酵模式,从而影响动物的生产性能,降低乳脂率。本试验结果显示,添加蚕豆皮后降低了肠道产酸菌的相对丰度,结合本课题组前期试验中生产性能提高这一结果,日粮添加蚕豆皮可能通过影响产酸菌在瘤胃内的定殖,进而影响肠道中产酸菌的相对丰度。综上,日粮添加30%蚕豆皮制作全价配合饲料饲喂湖羊可改变空肠食糜微生物菌群组成和相对丰度。

肠道菌群可以调节肠道微生态,促进肠道营养物质的消化吸收,提高机体免疫力。本研究中功能预测到的差异菌群主要富集在三羧酸循环、脂肪酸 $\beta$ 氧化、原儿茶酸降解和L-亮氨酸降解通路。脂肪酸是脂肪分解后的产物,经 $\beta$ -氧化后产生乙酰CoA和甘油,为三羧酸循环提供原料,葡萄糖和脂质的代谢是三羧酸循环中产生和转化其他化合物的重要阶段,不断为机体提供能量。原儿茶酸作为原花青素的次级代谢物,是原花青素在体内发挥生理功能的主要活性物质,具有抗炎、抗氧化和抑菌的作用<sup>[34]</sup>。L-亮氨酸对肌肉中葡萄糖摄取和脂质代谢起调节作用,防止肌肉收缩<sup>[35]</sup>。本研究结果提示,日粮中添加蚕豆皮饲喂湖羊后空肠菌群主要富集在碳水化合物代谢、能量代谢和氨基酸代谢等新陈代谢功能,表明肠道菌群对湖羊日粮营养物质代谢活动有促进作用,然而对相关通路中成员的影响程度有待进一步研究。

综上,本研究表明,日粮添加30%蚕豆皮可降低空肠黏膜炎症因子*IL-1 $\beta$*  mRNA表达水平,改变空肠食糜微生物菌群多样性和相对丰度,调节肠道发酵环境,为蚕豆皮在养羊业中的应用提供参考。

#### 参考文献 References:

[1] 李旭. 蚕豆综合加工利用研究进展[J]. 现代食品, 2018(7): 170-171.

Li X. Research progress of comprehensive processing and utilization of broad beans[J]. Modern Food, 2018(7): 170-171 (in Chinese with

- English abstract).
- [2] Sawicki C M, Livingston K A, Obin M, et al. Dietary fiber and the human gut microbiota: application of evidence mapping methodology [J]. *Nutrients*, 2017, 9(2): 125.
- [3] El Aidy S, Merrifield C A, Derrien M, et al. The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalization [J]. *Gut*, 2013, 62(9): 1306–1314.
- [4] Zhan K, Jiang M C, Gong X X, et al. Effect of short-chain fatty acids on the expression of genes involved in short-chain fatty acid transporters and inflammatory response in goat jejunum epithelial cells [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2018, 54(4): 311–320.
- [5] Rodrigues R, Guerra G, Soares J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in goat milk matrix modulates intestinal inflammation involving NF- $\kappa$ B p65 and SOCs-1 in an acid-induced colitis model [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 50: 78–92.
- [6] Zhu L, Shi T T, Zhong C D, et al. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology Research*, 2017, 10(2): 65–69.
- [7] 王智博, 姚晓磊, 张红琳, 等. 不同产羔数和发情时期湖羊代谢产物及肠道菌群结构的差异分析研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(3): 548–553. DOI: 10.7685/jnau.202003019.
- Wang Z B, Yao X L, Zhang H L, et al. Changes of rectal contents microbiota and their metabolites associated with prolificacy and estrus cycle in Hu sheep [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(3): 548–553 (in Chinese with English abstract).
- [8] Ferguson A. Immunological functions of the gut in relation to nutritional state and mode of delivery of nutrients [J]. *Gut*, 1994, 35(Suppl 1): S10–S12.
- [9] Logue J B, Stedmon C A, Kellerman A M, et al. Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 533–545.
- [10] Frazier T H, DiBaise J K, McClain C J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury [J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2011, 35(Suppl 5): 14S–20S.
- [11] 吴雅琳, 叶恬, 冯妮, 等. 运输应激对山羊小肠紧密连接蛋白 Claudin-1, Occludin 和 ZO-1 及其基因的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(7): 1329–1338.
- Wu Y L, Ye T, Feng N, et al. Effects of transport stress on tight junction proteins Claudin-1, Occludin and ZO-1 and its gene in goat (*Capra hircus*) small intestine [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(7): 1329–1338 (in Chinese with English abstract).
- [12] Zhang C Y, Zhao J, Mao M X, et al. Disordered expression of tight junction proteins is involved in the Mo-induced intestinal microenvironment dysbiosis in sheep [J]. *Biological Trace Element Research*, 2023, 201(1): 204–214.
- [13] Hutchins A P, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges [J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2013, 12(6): 489–498.
- [14] Fan F Y, Sang L X, Jiang M. Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(3): 484.
- [15] Zhao J X, Li Q, Zhang R X, et al. Effect of dietary grape pomace on growth performance, meat quality and antioxidant activity in ram lambs [J]. *Animal Feed Science & Technology*, 2018, 236: 76–85.
- [16] Bagehi M, Milnes M, Williams C, et al. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanin extract [J]. *Nutrition Research*, 1999, 19(8): 1189–1199.
- [17] Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms [J]. *Journal of Immunology*, 2003, 171(11): 6164–6172.
- [18] Wang X B, Ogawa T, Suda S, et al. Effects of nutritional level on digestive enzyme activities in the pancreas and small intestine of calves slaughtered at same body weight [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 1998, 11(4): 375–380.
- [19] 周力, 侯生珍, 王志有, 等. 棕榈粕替代部分玉米对藏羊母羊小肠形态发育、消化酶活性及抗氧化功能的影响 [J]. *草业学报*, 2023, 32(3): 118–127.
- Zhou L, Hou S Z, Wang Z Y, et al. Changes in small intestinal morphology, digestive enzyme activity and antioxidant enzyme activities of female Tibetan sheep after substituting the maize component of a concentrate diet with palm meal [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(3): 118–127 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周力, 高占红, 张峰硕, 等. 小麦饲料中添加木聚糖酶对高原型藏羊胃肠道发育的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(1): 227–238.
- Zhou L, Gao Z H, Zhang F S, et al. Effects of xylanase supplement in wheat diet on gastrointestinal development of plateau Tibetan sheep [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(1): 227–238 (in Chinese with English abstract).
- [21] 刘月琴, 王宝山, 张杰英, 等. 日粮类型对小尾寒羊小肠消化酶活性影响的研究 [J]. *中国草食动物*, 2004, 24(S1): 131–134.
- Liu Y Q, Wang B S, Zhang Y J, et al. Effects of dietary types on digestive enzyme activities in small intestine of small tail Han sheep [J]. *China Herbivores*, 2004, 24(S1): 131–134 (in Chinese with English abstract).
- [22] 曲星梅, 薛复来, 黄晓瑜, 等. 断奶日龄和日粮营养水平对陕北白绒山羊小肠形态发育和消化酶活性的影响 [J]. *中国农业科学*, 2019, 52(19): 3460–3470.
- Qu X M, Xue F L, Huang X Y, et al. Effects of weaning age and dietary nutritional levels on intestinal morphology and activity of digestive enzymes in 6-month-old Shanbei white Cashmere goats [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(19): 3460–3470 (in Chinese with English abstract).
- [23] Mao S Y, Zhang M L, Liu J H, et al. Characterizing the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and

- potential function[J]. *Scientific Reports*,2015,5:16116.
- [24] Bi Y L,Zeng S Q,Zhang R,et al. Effects of dietary energy levels on rumen bacterial community composition in Holstein heifers under the same forage to concentrate ratio condition[J]. *BMC Microbiology*,2018,18(1):69.
- [25] Zhang H,Shao M X,Huang H,et al. The dynamic distribution of small-tail Han sheep microbiota across different intestinal segments[J]. *Frontiers in Microbiology*,2018,9:32.
- [26] Shin N R,Whon T W,Bae J W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*,2015,33(9):496-503.
- [27] Moon C D,Young W,MacLean P H,et al. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats[J]. *Microbiologyopen*,2018,7(5):e00677.
- [28] 姜碧薇,周玉香,王甜,等. 酶菌混合处理稻草和苜蓿干草对滩羊生长性能、血清生化指标、瘤胃细菌多样性及 KEGG 通路的影响[J]. *动物营养学报*,2021,33(3):1482-1492.
- Jiang B W,Zhou Y X,Wang T,et al. Effects of straw and alfalfa hay treated by enzyme and bacteria on growth performance, serum biochemical indexes, rumen bacterial diversity and KEGG pathway of Tan sheep[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*,2021,33(3):1482-1492 (in Chinese with English abstract).
- [29] Qin J J,Li R Q,Raes J,et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*,2010,464(7285):59-65.
- [30] 潘锋,朱彦宾,王之盛,等. 酵母培养物和糖蜜对肉牛生长性能、营养物质表观消化率和粪便微生物区系组成的影响[J]. *动物营养学报*,2022,34(2):1040-1049.
- Pan F,Zhu Y B,Wang Z S,et al. Effects of yeast culture and molasses on growth performance, apparent digestibility of nutrients and fecal microflora composition of beef cattle[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*,2022,34(2):1040-1049(in Chinese with English abstract).
- [31] Huang Y,Li M F,Zhou L L,et al. Effects of Qingluo Tongbi Decoction on gut flora of rats with adjuvant-induced arthritis and the underlying mechanism[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,2019,2019:6308021.
- [32] Sun Z Q,Yu Z,Wang B. *Perilla frutescens* leaf alters the rumen microbial community of lactating dairy cows[J]. *Microorganisms*,2019,7(11):562.
- [33] 沈子亮,王全,曹辉,等. 不同乳脂率奶牛瘤胃微生物及其代谢物差异分析[J]. *动物营养学报*,2022,34(5):3000-3011.
- Shen Z L,Wang Q,Cao H,et al. Differential analysis of rumen microbes and their metabolites for dairy cows with different milk fat percentages[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*,2022,34(5):3000-3011(in Chinese with English abstract).
- [34] Kay C D,Kroon P A,Cassidy A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*,2009,53(Suppl 1):S92-S101.
- [35] Erukainure O L,Salau V F,Atolani O,et al. L-leucine stimulation of glucose uptake and utilization involves modulation of glucose-lipid metabolic switch and improved bioenergetic homeostasis in isolated rat psoas muscle *ex vivo*[J]. *Amino Acids*,2021,53(7):1135-1151.

责任编辑:周广礼 范雪梅