



陈良,赵敏蝶,曹爱智,等. 饲料中添加猪源胆汁酸对肉鸡体内 LPS 外排功能的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(4):700-709.
CHEN Liang,ZHAO Mindie,CAO Aizhi, et al. Effect of supplementing feed with porcine bile acids on LPS efflux function in broiler chickens[J].
Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):700-709.

饲料中添加猪源胆汁酸对肉鸡体内 LPS 外排功能的影响

陈良^{1,3},赵敏蝶¹,曹爱智²,王建民²,赵茹茜^{1,2*}

(1.南京农业大学动物医学院/农业农村部动物生理生化重点实验室,江苏 南京 210095;2.南京农业大学-山东龙昌动物保健品有限公司肝脏健康与稳态调控研究院,山东 德州 253000;3.怀化市农业科学研究院,湖南 怀化 418000)

摘要:[目的]本研究旨在探究胆汁酸是否能促进肉鸡体内脂多糖(LPS)外排及其缓解 LPS 诱导的炎症反应。[方法]选择 60 只 1 日龄雄性 Ross 308 肉鸡,分成 4 组,每组 15 只,空白组(CON)和模型组(LPS 组)的鸡饲喂基础日粮,低剂量胆汁酸缓解组(LBA 组)的鸡饲喂含猪源胆汁酸(160 mg·kg⁻¹)的基础日粮,高剂量胆汁酸缓解组(HBA 组)的鸡饲喂含猪源胆汁酸(250 mg·kg⁻¹)的基础日粮。试验第 28 天,鸡群禁食 9 h 后,CON 组腹腔注射等体积生理盐水,LPS 组、LBA 组和 HBA 组腹腔注射 LPS(1 mg·kg⁻¹ BW)。LPS 注射后 3 h 翅静脉采血并全部屠宰取样,测定炎症相关指标、LPS 水平及肝脏相关 LPS 摄取和外排基因表达量。[结果]CON 组肝脏未发现炎性细胞浸润。LPS 组肝脏出现大量炎性细胞浸润且血清 IL-1 β 水平显著增加($P < 0.05$),血清和肝脏 LPS 水平及肝脏甘露糖受体 C1 基因(*MRC1*)、稳定素 1/2 基因(*STAB 1/2*)表达量均显著增加($P < 0.05$);血清、肝脏、胆汁和盲肠内容物的总胆汁酸(TBA)浓度显著降低($P < 0.05$),并且肝脏胆盐输出泵(*BSEP*)、多药耐药蛋白 2(*MRP2*)、多药耐药相关蛋白 1(*MDR1*)、肝 X 受体 α (*LXR\alpha*)和法尼醇受体(*FXR*)基因表达量均显著降低($P < 0.05$)。与 LPS 组相比,LBA 组肝脏炎性细胞浸润减少,血清 IL-1 β 浓度显著降低($P < 0.05$);血清和肝脏 LPS 水平、肝脏 *MRC1*、*STAB1/2* 基因表达量均显著降低($P < 0.05$)。与 LPS 组相比,HBA 组肝脏炎性细胞浸润消失,血清 IL-1 β 浓度、肝脏 *MRC1*、*STAB1/2* 基因的表达量显著降低($P < 0.05$),血清 LPS 水平显著降低($P < 0.05$),而胆汁 LPS 水平显著增加($P < 0.05$),血清、胆汁和盲肠内容物总 TBA 水平和肝脏 *MDR1*、ATP 结合盒转运蛋白 G2(*ABCG2*)基因及 *FXR* 蛋白表达量均显著增加($P < 0.05$)。[结论]胆汁酸通过增强肝脏的摄取、合成和外排功能,提高肉鸡体内 LPS 外排效率,降低机体炎症反应。

关键词:胆汁酸;肉鸡;炎症反应;脂多糖;外排功能

中图分类号:S831.7

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0700-10

Effect of supplementing feed with porcine bile acids on LPS efflux function in broiler chickens

CHEN Liang^{1,3},ZHAO Mindie¹,CAO Aizhi²,WANG Jianmin²,ZHAO Ruqian^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Physiologic and Biochemistry,Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;2.Industrial Research Institute of Liver Health & Homeostatic Regulation, Nanjing Agricultural University-Shandong Longchang Animal Health Product Co.,Ltd.,Dezhou 253000,China;
3. Huaihua Institute of Agricultural Sciences,Huaihua 418000,China)

Abstract:[Objectives]This study aimed to investigate whether bile acids could promote the excretion of lipopolysaccharides(LPS) in broiler chickens and alleviate LPS-induced inflammatory responses. [Methods]Sixty 1-day-old Ross 308 male broiler chickens were divided into four groups,each consisting of 15 chickens;the control group(CON),and the model group(LPS)fed with basal diet,the low-dose bile acid alleviation group(LBA)fed with a basal diet containing 160 mg·kg⁻¹ of porcine bile acid(BA),and the high-dose bile acid alleviation group(HBA)fed with a basal diet containing 250 mg·kg⁻¹ of porcine bile acid. On the 28th day of the experiment,after a 9-hour fasting period,the CON group received intraperitoneal injection of an equivalent volume of physiological saline,while the LPS group,LBA group and HBA group received intraperitoneal injection of LPS(1 mg·kg⁻¹ BW). Three hours after LPS injection,blood was drawn from the wing vein,and all chickens were slaughtered for sampling to detect inflammatory related indicator level,LPS levels,and the expression levels of genes associated with the optake and excretion of LPS in liver. [Results]The liver in the CON group did not exhibit inflammatory cell infiltration. In the LPS group,the liver showed extensive inflammatory cell infiltration,and serum IL-1 β levels significantly increased($P < 0.05$). Additionally,serum and liver LPS levels and liver mannose receptor C1 gene

收稿日期:2023-09-11

基金项目:国家自然科学基金项目(32272962,31972638)

*通信作者:赵茹茜,教授,主要从事应激生物学及营养生理学和表观遗传研究,E-mail:zhaoruqian@njau.edu.cn.

(*MRC1*), stabilin 1/2 gene (*STAB 1/2*) expression levels all significantly increased ($P < 0.05$). Moreover, the concentrations of total bile acids (TBA) in serum, liver, bile, and cecal contents significantly decreased ($P < 0.05$). The gene expression levels of liver bile salt export pump (*BSEP*), multidrug resistance protein 2 (*MRP2*), multidrug resistance-associated protein 1 (*MDR1*), liver X receptor α (*LXR α*), and farnesoid X receptor (*FXR*) all significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, the LBA group reduced inflammatory cell infiltration in the liver ($P < 0.05$) and significantly decreased in serum IL-1 β concentration ($P < 0.05$). Furthermore, serum and liver LPS levels, as well as the gene expression levels of liver *MRC1* and *STAB1/2*, significantly decreased ($P < 0.05$). In the HBA group, inflammatory cell infiltration disappeared in the liver, and both serum IL-1 β concentration and the gene expression levels of liver *MRC1* and *STAB1/2* significantly decreased ($P < 0.05$). Serum LPS level significantly decreased ($P < 0.05$), while bile LPS levels significantly increased ($P < 0.05$). Additionally, the concentrations of total TBA in serum, bile, and cecal contents, as well as the gene expression levels of liver *MDR1*, ATP-binding cassette transporter G2 (*ABCG2*), and FXR protein expression levels, all significantly increased ($P < 0.05$). [Conclusions] In summary, bile acids enhance liver uptake, synthesis, and excretion functions, improving the efficiency of LPS excretion in broiler chickens and consequently alleviating inflammatory response.

Keywords: bile acids; broiler chicken; inflammation response; lipopolysaccharide; efflux function

脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 主要来源于革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌和沙门氏菌等, 它们被认为是畜禽养殖的主要致病菌^[1-3]。在大肠杆菌或沙门氏菌感染时, 畜禽血液中 LPS 水平显著增加, 从而诱发毒血症或败血症等, 导致其生长抑制和肝胆功能障碍, 甚至死亡^[4-6]。尽管抗生素在预防和治疗细菌性疾病方面取得了显著成效, 但随着抗生素耐药菌株不断出现, 以及与之相关的食品安全问题不断增加, 迫切需要开发可行的替代方案, 以确保动物的健康和生产性能最大化。

目前, 除了抗生素, 毒血症或败血症的治疗仍然缺乏有效手段。在感染期间, 为了防止大量 LPS 在机体内积聚并引发多器官损伤, 迅速清除体内 LPS 至关重要。肝胆系统作为 LPS 外排的重要途径^[7-9], LPS 进入血液后以单体或聚合物形式随血流移动^[8, 10-11], 在肝窦被大量细胞膜受体识别并内吞, 如稳定素 1/2 (stabilin 1/2, *STAB 1/2*)^[12] 和甘露糖受体 C1 (mannose receptor C1, *MRC1*)^[13] 等, 继而细胞内 LPS 在微管蛋白^[7] 和跨膜转运蛋白^[14] 的作用下进入胆小管, 最终在胆汁流的作用下排入肠道或体外。

胆汁酸是肝细胞以胆固醇为底物在一系列酶的作用下合成并依赖相关转运蛋白分泌至胆小管, 从而诱发胆汁流^[15-16]。机体大量内/外源性代谢产物依赖胆汁流排入肠腔, 降低其毒副作用^[17-18]。前期研究表明腹腔注射熊脱氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 促进小鼠血液中 LPS 排入胆囊^[19]。同样, 鹅脱氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 促进小鼠体内胆红素代谢和清除^[18]。此外, 胆汁酸通过激活 FXR 等核受体及其下游靶基因调控机体一系列代谢活动, 如胆汁酸摄取、合成和分泌^[20-21]。日粮中添加胆酸 (cholic acid, CA) 增加了肉鸡肝脏法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 和胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 表达水平, 从而介导 T-2 毒素代谢和排泄^[22]。然而, 胆汁酸能否促进肉鸡体内 LPS 外排及其机制目前并不清楚。

本试验选用 1 d 肉鸡预饲含不同剂量胆汁酸的日粮, 28 d 时腹腔一次性注射 LPS, 通过检测炎症指标、总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 浓度、LPS 活性及其肝脏外排转运蛋白表达水平, 探究日粮添加胆汁对肉鸡体内 LPS 清除的功能, 有望为肉鸡疾病防控提供新的营养干预策略。

1 材料与方法

1.1 试验动物分组和试验设计

试验选择 60 只 1 日龄雄性 Ross 308 肉鸡, 饲养于南京农业大学标准家禽饲养实验室内。鸡群适应 4 d 后, 随机分成 4 组, 每组 15 只, 空白组 (CON 组) 和模型组 (LPS 组) 鸡饲喂基础日粮 (表 1), 低剂量胆汁酸缓解组 (LBA 组) 的鸡饲喂含低剂量猪源胆汁酸 ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的基础日粮, 高剂量胆汁酸缓解组 (HBA 组) 的鸡饲喂含高剂量猪源胆汁酸 ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的基础日粮^[23-24]。LPS 购自 Sigma 公司。胆汁酸 (总乳能 96.90%, 其中猪脱氧胆酸 73.2%、鹅脱氧胆酸 19.8% 和猪胆酸 3.9%) 由山东龙昌动物保健品有限公司赠送。试验期间自由饮水和采食。每天 18 h 光照和 6 h 黑暗。第 1 天室温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 每周降低 3 $^{\circ}\text{C}$, 直到 23 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50% ~ 60%。试验第 28 天, 鸡群禁食 9 h 后, CON 组腹腔注射等体积生理盐水, LPS 组、LBA 组和 HBA 组腹腔注射 LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[25-26]。LPS 注射后 3 h 翅静脉取血并全部屠宰, 采集血液、肝脏和胆汁等样品进行后续处理。取其中 1 份血液、肝脏和胆汁样品置于无内毒素管中, 用于 LPS 活性检测。

表1 肉鸡饲料和营养水平组成

Table 1 Ingredients and nutrient composition of the diets for broiler chickens

| 项目 Items | CON | LPS | LBA | HBA |
|---|-------|-------|-------|-------|
| 饲料组成 Feed composition | | | | |
| 玉米/% Maize | 57.80 | 57.80 | 57.80 | 57.80 |
| 大豆粕/% Soybean meal | 34.60 | 34.60 | 34.60 | 34.60 |
| 大豆油/% Soya bean Oil | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| 石灰石/% Limestone | 1.30 | 1.30 | 1.30 | 1.30 |
| 磷酸二钙/% Dicalcium phosphate | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.60 |
| 氯化钠/% Sodium chloride | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 |
| DL-蛋氨酸/% DL-Met | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| L-赖氨酸/% L-Lys | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 预混料/% Premix ² | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 胆汁酸/(mg·kg ⁻¹) Bile acids | 0 | 0 | 160 | 250 |
| 营养水平 Level of nutrients | | | | |
| 代谢能/(MJ·kg ⁻¹) Metabolic energy | 12.33 | 12.33 | 12.33 | 12.33 |
| 粗蛋白/% CP | 20.70 | 20.70 | 20.70 | 20.70 |
| 钙/% Ca | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 有效磷/% Available P | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 |
| 总赖氨酸/% Total Lys | 1.20 | 1.20 | 1.20 | 1.20 |
| 总蛋氨酸/% Total Met | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 总蛋氨酸+半胱氨酸/% Total Met+Cys | 0.84 | 0.84 | 0.84 | 0.84 |

注:1) CON:对照组;LPS:LPS模型组;LBA:低水平胆汁酸(160 mg·kg⁻¹)缓解组;HBA:高水平胆汁酸(250 mg·kg⁻¹)缓解组;下同。2) 每千克饲料包含以下预混料成分:维生素 A 8 000 IU,维生素 D₃ 2 500 IU,维生素 K₃ 2.65 mg,维生素 B₁ 2.00 mg,维生素 B₂ 6.00 mg,维生素 B₁₂ 0.025 mg,维生素 E 30 IU,生物素 0.032 5 mg,泛酸 12 mg,烟酸 50.00 mg,铜 8.00 mg,锌 75.00 mg,铁 80.00 mg,锰 100.00 mg,硒 0.15 mg,碘 0.35 mg。

Note:1) CON: The control group; LPS: the model group; LBA: The low-dose bile acid (160 mg·kg⁻¹) alleviation group; HBA group: The high-dose bile acid (250 mg·kg⁻¹) alleviation group; The same below. 2) Each kilogram of feed contains the following premix ingredients: vitamin A 8 000 IU, vitamin D₃ 2 500 IU, vitamin K₃ 2.65 mg, vitamin B₁ 2.00 mg, vitamin B₂ 6.00 mg, vitamin B₁₂ 0.025 mg, vitamin E 30 IU, biotin 0.032 5 mg, pantothenic acid 12 mg, niacin 50.00 mg, copper 8.00 mg, zinc 75.00 mg, iron 80.00 mg, manganese 100.00 mg, selenium 0.15 mg, iodine 0.35 mg.

1.2 指标检测

1.2.1 生化指标测定 血液采集后室温静置 30 min, 3 500 r·min⁻¹离心 10 min, 收集血清。参照文献[27]萃取肝脏和盲肠内容物 TBA 和总胆固醇(CHOL)。根据试剂盒说明书(宁波美康生物科技股份有限公司)使用全自动生化分析仪(Hitachi, 日本)测定 TBA 和 CHOL 浓度。

1.2.2 LPS 水平测定 参照文献[28]向装有肝脏样品的无内毒素管中加入提取液, 经匀浆和离心等环节最终获得上清液。同时, 参照文献[29]进行胆汁加热预处理和确定稀释倍数。使用内毒素检测试剂盒(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司)定量检测肝脏上清液、胆汁预处理液和血清 LPS 水平。

1.2.3 IL-1 β 水平测定 取适量储存于-80 °C 的肝脏样品加入提取液, 经匀浆和离心等处理环节最终获得上清液, 使用鸡白细胞介素 1 β (IL-1 β)酶联免疫分析试剂盒(江苏酶免实业有限公司)检测血清 IL-1 β 水平。

1.2.4 肝脏组织形态学观察 采集同一部位肝脏样品, 每个处理组 5 份, 4%多聚甲醛固定 24 h, 进行脱水、石蜡包埋和制片等处理, 切片厚度 5 μ m。使用苏木精和伊红染色(Hematoxylin and Eosin staining, HE), 置于光学显微镜(Olympus-BX53, 日本)下观察。

1.2.5 RNA 提取和实时荧光定量分析(RT-qPCR) 使用 TRIzol 试剂提取肝脏总 RNA, 总 RNA 反转录为 cDNA。cDNA 稀释后使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix 在 QuantStudio 6 Flex 的 Real-Time PCR 系统进行检测。引物信息见表 2。上述试剂均购自擎科生物科技股份有限公司(南京)。PPIA 作内参基因。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析基因的相对表达水平。

1.2.6 蛋白免疫印记分析(Western blot) 使用 RIPA 裂解液提取肝脏蛋白, 使用购自擎科生物科技股份有限公司的 Pierce BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。按照抗体说明书进行 Western blot 检测, 其中 β -actin 作为内参。所有一抗均购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。以南京兰杰柯科技有限公司购得的羊抗兔 IgG-HRP(1:100 000 稀释)作为二抗。发光液购自北京拉比奇科技有限公司。使用 VersaDoc 4000MP 系统(Bio-Rad)自动显影。Western blot 条带使用 Quantity One 软件(Bio-Rad)进行分析。

表 2 引物序列

Table 2 Nucleotide sequences of primers

| 目的基因 Target gene | 引物对序列 Primer pairs sequences(5'→3') | GenBank 登录号 GenBank accession No. | 片段大小/bp PCR product |
|---------------------|---|--------------------------------------|------------------------|
| <i>TNF-α</i> | CTGAGGCATTTGGAAGCAGC/GACAGGGTAGGGGTGAGGAT | NM_204267.2 | 208 |
| <i>HO-1</i> | AAACTTCGCAGCCACACAAC/GACCAGCTTGAACCTCGTGGA | NM_205344.2 | 155 |
| <i>Nrf2</i> | GCGCAGTAAAGAAGGAAGAGC/TTGAAACAGGCACTGCAGGA | NM_001396902.1 | 167 |
| <i>GST</i> | AGGAAACCACGCTAGAGGA/TTTCATCCAGTGACCGCCT | NM_001001777.2 | 213 |
| <i>STAB1</i> | ACGCATGTCTGTGTTTGC/TCCCGGTATCAAAATCCCCT | XM_046900195.1 | 161 |
| <i>STAB2</i> | AGGGGCCACCCCTTGATTA/AGGGGCCACCCCTTGATTA | XM_040658260.1 | 134 |
| <i>MRC1</i> | TCACAAGCGCTGTGTTTTGG/TGCATTCCCATCGCTGAAGT | NM_001319007.2 | 215 |
| <i>CYP7A1</i> | CCGTGCAGGACTGGGTATTT/AAACCCACTGTGTCTGCTA | NM_001001753.2 | 266 |
| <i>CYP27A1</i> | TCAGGACTTTCGTCTGGCTC/CCAGATGGGGCCATAGATGC | XM_422056.8 | 92 |
| <i>BSEP</i> | TGGAATAGAGCGTGGCTTTT/CATTTGGCAGTCATCTCAGGA | XM_015289699 | 113 |
| <i>MRP2</i> | TCTGCTTGTGCAGAGACTCG/TACATCCACGATGGGGTCTCT | XM_015288821 | 188 |
| <i>MDR1</i> | TGTACCAATCATTGCAGTGGC/ATAGGCTCCAAAGCGGAAACA | NM_204894.2 | 225 |
| <i>ABCG2</i> | TGCCATCATACTGAGGAGA/TTCCAAACCCTGCCACTCAG | NM_001328490.2 | 295 |
| <i>FXR</i> | AAAAGCCTAGACTGGGCCAC/GCCAACATGCCCATTTGCTT | NM_001396910.1 | 253 |
| <i>LXRα</i> | CTTCGCTGGTACTTCCCTTTC/CAGGAGGCCTTCTCAAGGT | NM_204542.3 | 70 |
| <i>RXR</i> | TCACCCCTACGCCCTTTTTC/AGGATTTGTCTGGCAGACG | NM_204536.1 | 255 |
| <i>CAR</i> | AACTFGCAGAACCTCGCCTT/ACTTGGTGGCAGGCATTTA | NM_204823.1 | 161 |
| <i>PPIA</i> | GTGACTTTACGCGCCACAAC/TTGCTCTGCTTTCGCTCTTT | NM_001166326.2 | 268 |

注:*TNF-α*:肿瘤坏死因子α基因 Tumor Necrosis α gene;*HO-1*:血红素氧合酶 1 基因 Heme oxygenase-1 gene;*Nrf2*:核因子 E2 相关因子 2 基因 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 gene;*GST*:谷胱甘肽 S-转移酶基因 Glutathione S-transferase gene;*STAB1*:稳定素 1 基因 Stabilin 1 gene;*STAB2*:稳定素 2 基因 Stabilin 2 gene;*MRC1*:甘露糖受体 C1 基因 Mannose Receptor C1 gene;*CYP7A1*:固醇 7α-羟化酶基因 Cholesterol 7α-hydroxylase gene;*CYP27A1*:类固醇 27 羟化酶基因 Sterol 27-hydroxylase gene;*BSEP*:胆盐外排泵基因 Bile acid export pump gene;*MRP2*:多药耐受相关蛋白 2 基因 Multidrug resistance-associated protein 2 gene;*MDR1*:多药耐药蛋白 1 基因 Multidrug resistance 1 gene;*ABCG2*:ATP 结合盒 G 成员 2 基因 ATP-binding cassette sub-family member 2 gene;*FXR*:法尼醇 X 受体基因 Farnesoid X receptor gene;*LXRα*:肝 X 受体基因 Liver X receptor gene;*RXRα*:视黄酸 X 受体 α 基因 Retinoid X receptor α gene;*CAR*:组成型雄甾烷受体基因 Constitutive androstane receptor gene;*PPIA*:蛋白质酶体异构酶基因 A Peptidylprolyl isomerase A gene.

1.3 数据统计分析

所有数据以均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。使用 SPSS 20.0 软件中单因素方差分析法(ANOVA)分析组间差异的显著性,随后使用 Dencun's 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 饲料中添加胆汁酸对肝脏组织形态及炎症相关基因表达量的影响

如图 1 所示:CON 组肝脏未见炎性细胞浸润。LPS 组肝脏(图 1-A)有大量炎性细胞浸润(箭头所示),血清 IL-1β 水平(图 1-B)显著增加($P < 0.05$),肝脏 *IL-1β* 基因表达量(图 1-C)、p-P65 蛋白表达量(图 1-D)和 *TNF-α* 基因表达量(图 1-E)显著增加($P < 0.05$),而肝脏 *Nrf2*(图 1-F)和 *GST*(图 1-G)基因的表达量显著下降($P < 0.05$),而 *HO-1* 基因的表达量(图 1-H)不受影响;与 LPS 组相比,LBA 组肝脏炎性细胞浸润显著减少(如箭头所示),血清 IL-1β 含量显著降低($P < 0.05$),肝脏 *IL-1β* 基因的表达量和 p-P65 蛋白表达量均显著下调($P < 0.05$),而肝脏 *TNF-α*、*Nrf2*、*GST* 和 *HO-1* 基因的表达量均不受影响;与 LPS 组相比,HBA 组肝脏炎性细胞浸润消失,血清 IL-1β 水平显著降低($P < 0.05$),肝脏 *IL-1β* 基因的表达量显著下降($P < 0.05$),而肝脏 p-P65 蛋白表达量(1:1 000 稀释)呈下降趋势($P = 0.08$),肝脏 *TNF-α* 和 *Nrf2* 基因的表达量不受影响,但肝脏 *GST* 和 *HO-1* 基因的表达量显著增加($P < 0.05$)。综上所述,肉鸡日粮中添加胆汁酸缓解了 LPS 诱导的肉鸡炎症反应。

2.2 饲料中添加胆汁酸对 LPS 水平及其外排转运体表达量的影响

如图 2 所示:与 CON 组对比,LPS 组血清(图 2-A)和肝脏(图 2-B)的 LPS 水平显著增加($P < 0.05$),而胆汁 LPS 水平(图 2-C)不受影响,*MRC1*(图 2-D)和 *STAB1/2*(图 2-E、F)基因的表达量显著增加($P < 0.05$),肝脏 *LBP* 基因的表达量(图 2-G)和 Tubulin α 蛋白表达量(图 2-H)不受影响;与 LPS 组相比,LBA 组血清和肝脏的 LPS 水平显著降低($P < 0.05$),而胆汁 LPS 水平不受影响,肝脏 *MRC1* 和 *STAB1/2* 基因的表达量显著下降($P < 0.05$),而肝脏 *LBP* 基因的表达量和 Tubulin α 蛋白表达量(1:1 000 稀释)不受影响;与 LPS 组相比,HBA 组血清的 LPS 水平显著降低($P < 0.05$),肝脏 LPS 水平呈下降趋势($P = 0.09$),而胆汁

LPS 水平显著增加 ($P < 0.05$), 同时肝脏 *MRC1*、*STAB1/2* 基因的表达量均显著降低 ($P < 0.05$), 而肝脏 *LBP* 基因的表达量和 Tubulin α 蛋白表达量不受影响。

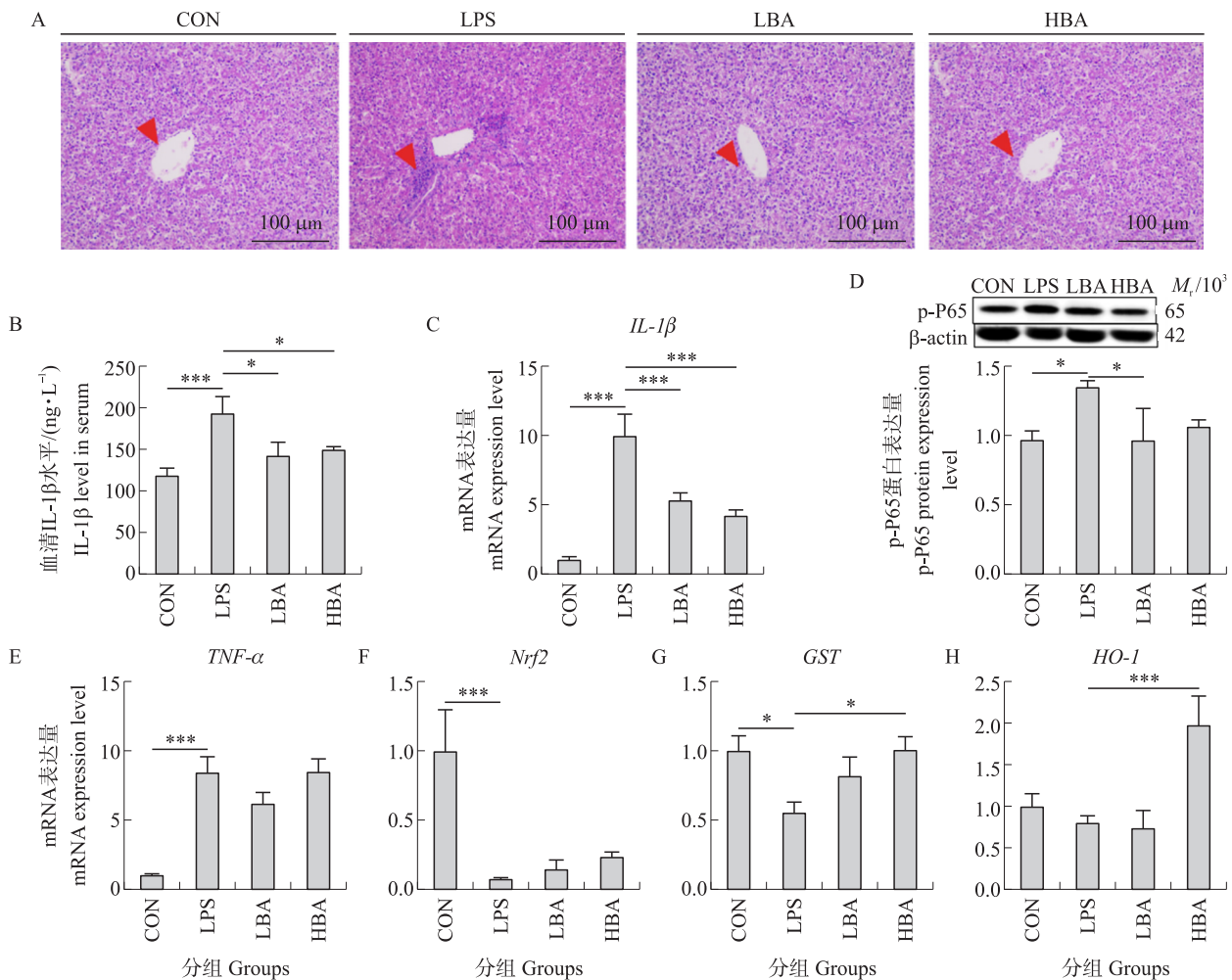


图1 饲料中添加胆汁酸对肝脏组织形态及炎症相关基因和蛋白表达的影响

Fig. 1 Impact of bile acids in feed on liver morphology and expression level of gene and protein relative to inflammation factor

A. 肝脏 HE 染色 (红色三角形表示炎性细胞浸润) Histological sections stained with HE staining (Red triangular shapes indicate inflammatory cell infiltration); B. 血清 IL-1 β 水平 Serum IL-1 β level; C. *IL-1 β* 基因表达量 *IL-1 β* mRNA expression level; D. p-P65 蛋白表达量 p-P65 protein expression level; E-H. *TNF- α* 、*Nr1f2*、*GST* 和 *HO-1* 基因表达量 mRNA expression levels of *TNF- α* 、*Nr1f2*、*GST* and *HO-1* genes.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. 下同 The same as follows.

2.3 饲料中添加胆汁酸对胆汁酸稳态的影响

如图3所示:与 CON 相比,LPS 组血清(图3-A)、肝脏(图3-B)、胆汁(图3-C)和盲肠内容物 TBA 水平(图3-D)均显著降低($P < 0.05$),肝脏 *CYP7A1* 基因(图3-E)和蛋白(图3-F)表达量及 *CYP27A1*(图3-G)、*NTCP*(图3-H)基因的表达量显著下降($P < 0.05$),血清 CHOL 水平(图3-I)显著下降($P < 0.05$),而肝脏(图3-J)和胆汁 CHOL 水平(图3-K)显著增加($P < 0.05$);与 LPS 组相比,LBA 组的血清 TBA 水平显著增加($P < 0.05$),而肝脏、胆汁和盲肠内容物 TBA 水平不受影响,*CYP7A1* 基因表达量也不受影响,*CYP7A1* 蛋白表达量显著增加($P < 0.05$),肝脏 *CYP27A1* 和 *NTCP* 基因表达量不受影响,血清 CHOL 水平显著增加($P < 0.05$),肝脏和胆汁的 CHOL 水平却显著下降($P < 0.05$);与 LPS 组相比,HBA 组血清 TBA 水平显著增加($P < 0.05$),肝脏 TBA 水平不受影响,胆汁和盲肠内容的 TBA 水平显著增加($P < 0.05$),肝脏 *CYP7A1* 基因表达量不受影响,而肝脏 *CYP7A1* 蛋白表达量(1:1 000 稀释)呈增加趋势($P = 0.08$),肝脏 *CYP27A1* 基因表达量不受影响,肝脏 *NTCP* 基因表达量显著增加($P < 0.05$),血清 CHOL 水平不受影响,肝脏和胆汁 CHOL 水平显著降低($P < 0.05$)。

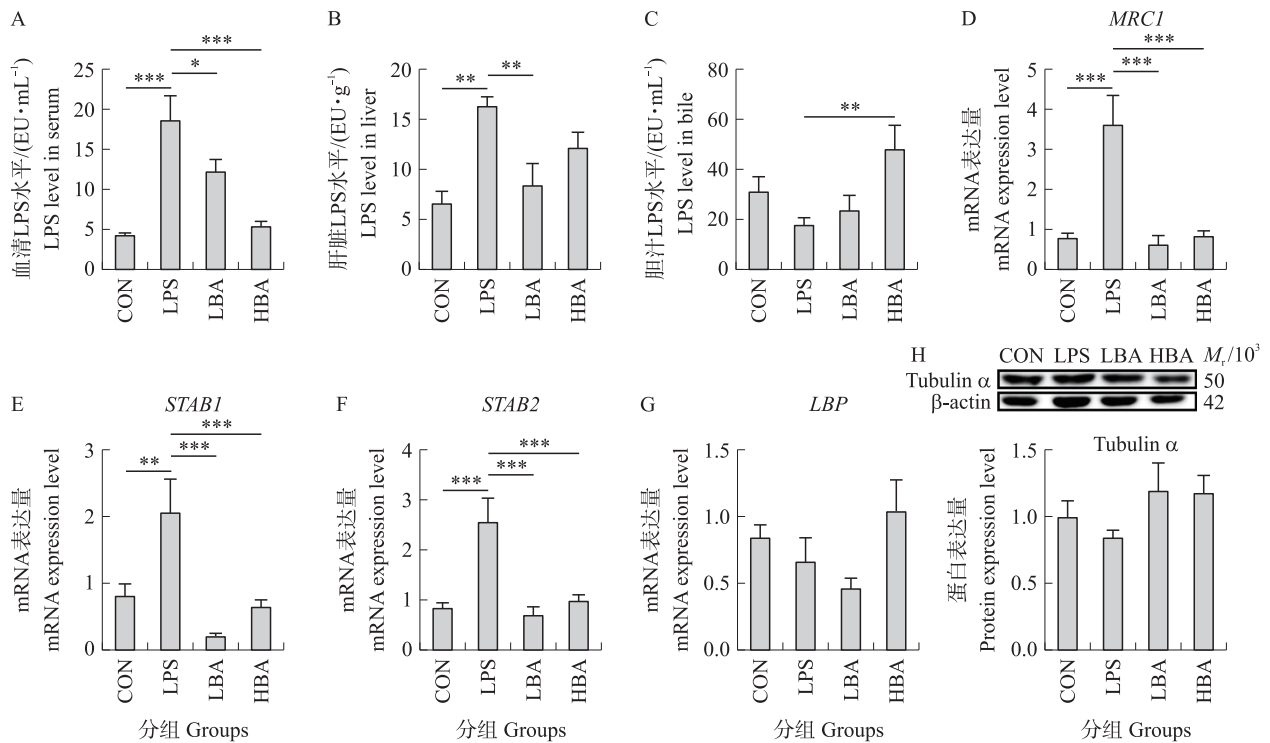


图2 饲料中添加胆汁酸对LPS水平及其外排转运体表达量的影响

Fig. 2 Effects of bile acids in feed on LPS levels and export transporter expression levels

A-C. 血清、肝脏和胆汁LPS水平 LPS levels in serum, liver and Bile; D-G. *MRC1*, *STAB1*, *STAB2*, *LBP* 基因表达量 mRNA expression levels of *MRC1*, *STAB1*, *STAB2* and *LBP*; H. Tubulin α 蛋白表达量 Tubulin α protein expression level. ** $P < 0.01$. The same below.

2.4 胆汁酸对肝脏外排转运体及其转录因子的影响

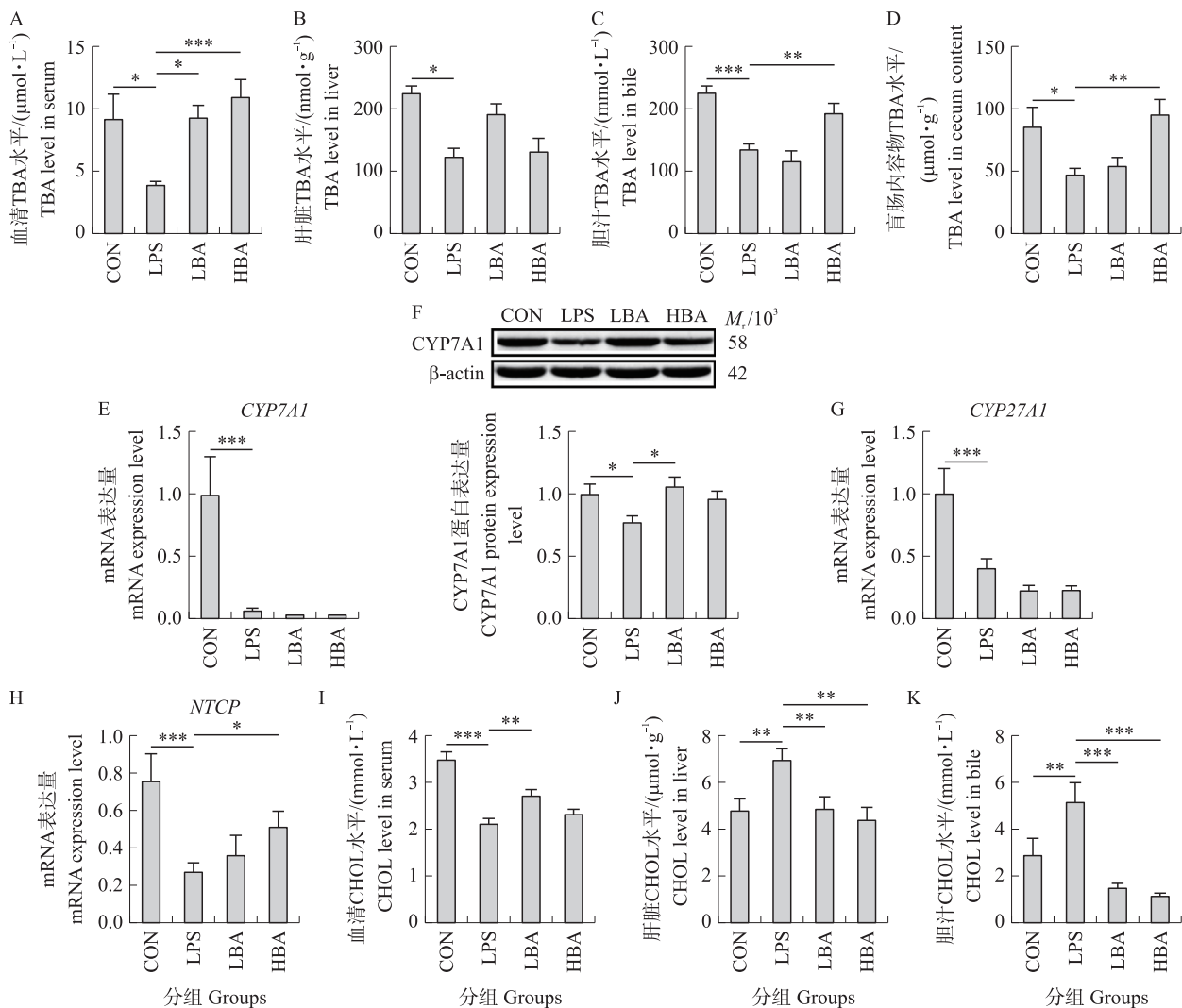
如图4所示:与CON相比,LPS组的肝脏 *BSEP* (图4-A)、*MRP2* (图4-B) 和 *MDR1* (图4-C) 基因的表达量显著下降 ($P < 0.05$), *ABCG2* 基因的表达量 (图4-D) 不受影响, 肝脏 *FXR* (图4-E) 和 *LXR α* (图4-F) 基因的表达量显著下降 ($P < 0.05$), 视黄酸 X 受体 (retinoid X receptor, *RXR*) 基因的表达量 (图4-G) 显著增加 ($P < 0.05$), 组成型雄烷受体 (constitutive androgen receptor, *CAR*) 基因的表达量 (图4-H) 不受影响, *LXR α* 蛋白表达量 (图4-I) 不受影响, 肝脏 *FXR* 蛋白表达量 (图4-J) 呈下降趋势 ($P = 0.06$); 与LPS组相比, LBA组的肝脏 *BSEP*、*MRP2*、*MDR1*、*ABCG2*、*FXR* 和 *LXR α* 基因的表达量不受影响, *RXR* 基因的表达量显著降低, 肝脏 *CAR* 基因的表达量及 *LXR α* 、*FXR* 蛋白表达量 (1:1 000 稀释) 不受影响; 与LPS相比, HBA组的肝脏 *BSEP* 和 *MRP2* 基因的表达量不受影响, 肝脏 *MDR1*、*ABCG2*、*FXR* 和 *LXR α* 基因的表达量均显著增加 ($P < 0.05$), *RXR* 基因的表达量显著下降 ($P < 0.05$), *CAR* 基因的表达量不受影响, *LXR α* 蛋白表达量不受影响, 肝脏 *FXR* 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肝胆路径是清除体内LPS的主要路径,胆汁酸是LPS肝胆路径外排的重要驱动因子^[8]。本研究表明,肉鸡日粮中添加胆汁酸增强肝胆系统的代谢功能,主要包括肝脏的摄取、合成和跨膜转运,从而降低肉鸡体内LPS水平,发挥胆汁酸的排毒抗炎功能。

胆汁酸具有抗炎功能^[20],如日粮中添加 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 猪源胆汁酸显著降低热应激诱导的鸡肝脏 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子增加^[30]。另外,鸡饲喂含 1% 胆酸的日粮显著降低了 T-2 毒素诱导的肝脏炎症细胞浸润^[22]。同样,本研究发现肉鸡腹腔注射 LPS 后肝脏出现大量炎症细胞浸润,同时血清 IL-1 β 水平、肝脏 TNF- α 基因和 p-P65 蛋白表达量等炎症指标均显著上升,而日粮添加 160 或 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 胆汁酸显著降低了上述炎症指标水平。然而,目前胆汁酸抗炎机制并不完全清楚。

LPS 作为机体炎症反应的诱导因子,体内 LPS 与肝胆胆汁酸稳态密切相关^[31]。前期研究表明腹腔注射 LPS 显著降低了小鼠肝脏 CYP7A1^[32] 和 NTCP^[33] 的表达水平。本研究也发现腹腔注射 LPS 显著降低了肝脏 CYP7A1 蛋白和 NTCP 基因表达量。日粮添加 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 胆汁酸显著增加了血液、胆汁和盲肠内



A-D. 血清、肝脏、胆汁和盲肠内容物 TBA 水平 TBA levels in serum, liver, bile and cecum content; E. *CYP7A1* 基因表达量 *CYP7A1* mRNA expression level; F. *CYP7A1* 蛋白表达量 *CYP7A1* protein expression level; G. *CYP27A1* 基因表达量 *CYP27A1* mRNA expression level; H. *NTCP* 基因表达量 *NTCP* mRNA expression level; I-K. 血清、肝脏、胆汁 CHOL 水平 CHOL levels in serum, liver and bile.

图3 饲料中添加胆汁酸对胆汁酸稳态相关基因和蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of dietary bile acids on expression level of mRNA and protein related to bile acid homeostasis

容物的 TBA 水平,并且肝脏 *NTCP* 基因和 *CYP7A1* 蛋白的表达量增加。因此,日粮中添加胆汁酸能缓解 LPS 诱导的肝脏胆汁酸摄取和合成功能的下降。前期研究表明日粮添加 CA 和 CDCA 上调小鼠肝脏 *NTCP* 的表达水平^[34],同时牛磺- β -鼠胆酸通过活化 FXR 上调小鼠肝脏 *CYP7A1* 表达水平^[35]。通过对血液、肝脏和胆汁 LPS 水平进行定量,发现日粮添加胆汁酸显著降低肉鸡血清和肝脏的 LPS 水平,特别是 250 mg·kg⁻¹胆汁酸显著降低血液 LPS 水平且增加胆汁 LPS 水平,与前期研究结果一致^[19]。

体内 LPS 代谢受肝胆系统的调控,主要包括:肝脏摄取功能,如 *STAB1/2*^[12] 和 *MRC1*^[13] 等;胞内转运,如 *Tubulin α* ^[7];胆管跨膜转运,如 *BSEP*、*MDR1*^[36-37] 和 *MRP2*^[38] 等。前期研究表明 LPS 或 *TNF- α* 、*IL-1 β* 处理显著降低了 *BSEP*、*MDR1*^[36] 和 *MRP2*^[39] 的表达水平。值得一提的是,LPS 对 *STAB1/2* 和 *MRC1* 的影响目前未见报道,在本研究中发现 LPS 处理显著增加了肉鸡肝脏 *STAB1/2* 和 *MRC1* 基因的表达量,而胆汁酸显著逆转了该变化。相较于野生鼠,在高脂条件下,*MRC1* 敲除鼠^[13] 和 *STAB1* 敲除鼠^[12] 肝脏炎症细胞浸润显著降低,并且 *NF- κ B*、*TNF- α* 或 *IL-6* 炎症因子表达量也显著下降,表明 *STAB1* 和 *MRC1* 可能介导机体炎症反应。此外,微管蛋白是 LPS 在胞内转运的重要载体^[10]。在本研究中 LPS 和胆汁酸处理均未对 *Tubulin α* 表达量产生影响。总之,胆汁酸可能参与抑制肝脏细胞膜受体的表达而降低 LPS 的摄取,从而降低机体炎症反应,具体机制有待进一步研究。

胆汁酸相关外排转运蛋白不仅促进胆汁酸外排,对 LPS 外排也发挥重要作用^[14]。在本试验中,LPS

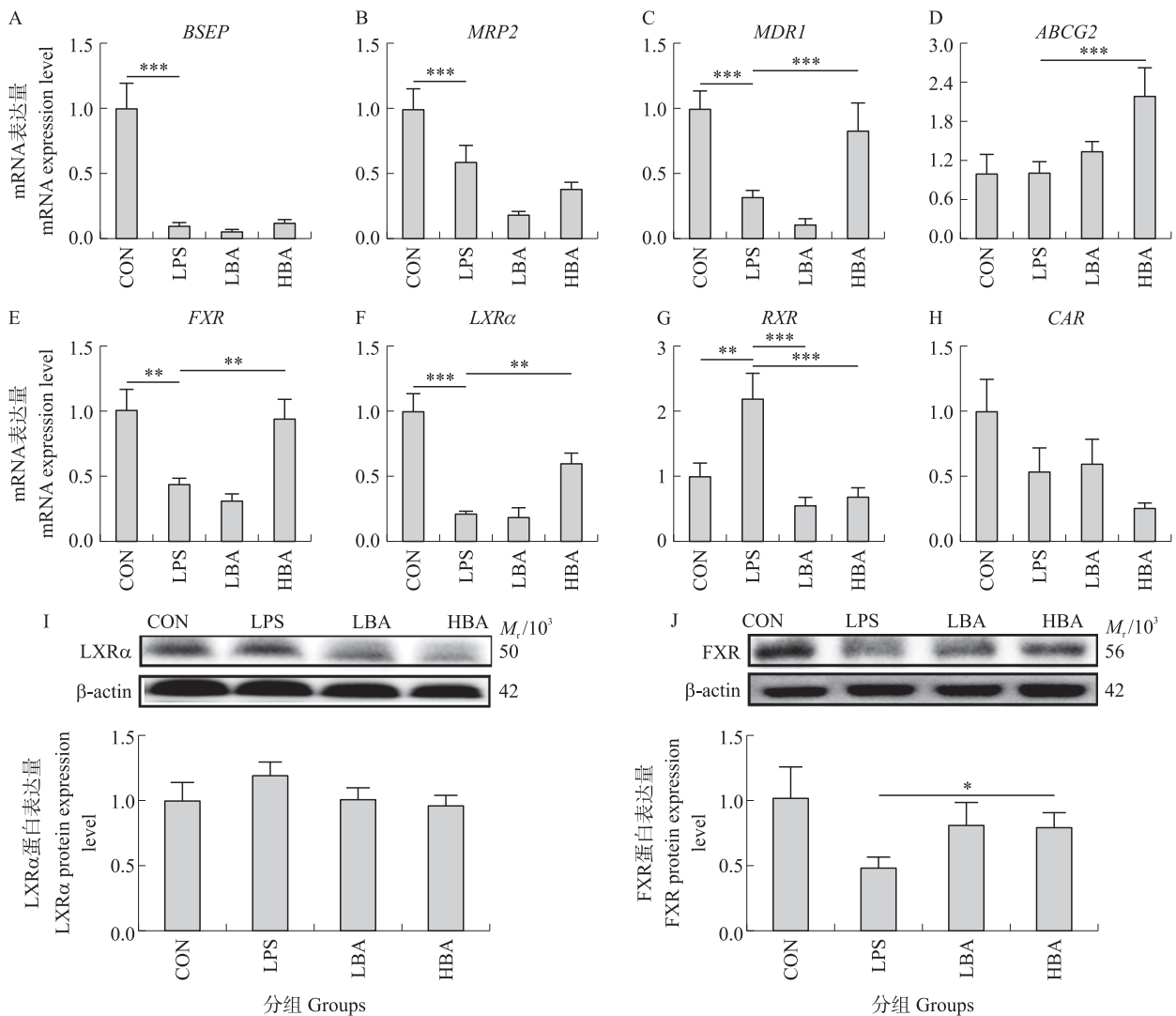


图 4 胆汁酸对肝脏外排转运体及其转录因子的影响

Fig. 4 Effects of bile acids on hepatic export transporters and transcription factors

A-H. *BSEP*, *MRP2*, *MDR1*, *ABCG2*, *FXR*, *LXRα*, *RXR*, *CAR* 基因表达量 mRNA expression levels of *BSEP*, *MRP2*, *MDR1*, *ABCG2*, *FXR*, *LXRα*, *RXR* and *CAR* gene; I. *LXRα* 蛋白表达量 *LXRα* protein expression level; J. *FXR* 蛋白表达量 *FXR* protein expression level.

显著降低肝脏 *BSEP*、*MRP2* 和 *MDR1* 基因的表达量,而日粮中添加 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 胆汁酸显著增加 *MDR1* 和 *ABCG2* 基因的表达量。前期研究表明添加胆汁酸显著上调 *MDR1*^[40] 和 *ABCG2*^[41] 的表达。同时,肝脏胆汁酸合成和外排转运体受一系列转录因子调控^[20]。本研究发现 LPS 显著降低了肉鸡肝脏 *FXR* 和 *LXRα* 表达量,而 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 胆汁酸显著降低了 *FXR* 蛋白的表达量。前期研究报道日粮中添加 1% 胆酸显著增加了肉鸡肝脏 *FXR* 基因的表达量^[22]。值得注意的是,本研究日粮添加的胆汁酸中 CDCA 占 19.6%,它是 *FXR* 天然激动剂^[42]。由此可见,胆汁酸可能通过调控肉鸡肝脏 *FXR* 表达而介导胆汁酸的摄取、合成和外排功能,提高机体 LPS 外排效率和降低炎症反应。

综上,胆汁酸通过增强肉鸡肝脏的胆汁酸摄取、合成和外排功能,提高肝胆路径 LPS 外排效率,从而降低机体炎症反应。这项研究为降低 LPS 对肉鸡的毒副作用提供一种新的营养策略,同时也进一步拓展了胆汁酸在肉禽养殖中的应用。

参考文献 References:

- [1] Lutful Kabir S M. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, 7(1): 89-114.
 - [2] 孙乃岩, 龚倩梅, 胡建春, 等. 屠宰场鸡源碳青霉烯耐药大肠埃希菌的耐药特征分析[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(6): 1203-1210. DOI: 10.7685/njau.202109039.
- Sun N Y, Gong Q M, Hu J C, et al. Antimicrobial resistance characteristics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* from chickens in slaughterhouse[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2022, 45(6): 1203-1210 (in Chinese with English abstract).

- [3] 邓小玲,孙影,尤向峰,等. 禽致病性大肠杆菌生物被膜形成能力及相关特性分析[J]. 南京农业大学学报,2021,44(5):918-926. DOI:10.7685/njau.202011020.
Deng X L, Sun Y, You X F, et al. Analysis of biofilm formation ability and related characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2021, 44(5):918-926 (in Chinese with English abstract).
- [4] Cavaillon J M. Exotoxins and endotoxins; inducers of inflammatory cytokines[J]. Toxicon, 2018, 149:45-53.
- [5] Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice[J]. Laboratory Animals, 2015, 49(Suppl 1):37-46.
- [6] El Kasmi K C, Vue P M, Anderson A L, et al. Macrophage-derived IL-1 β /NF- κ B signaling mediates parenteral nutrition-associated cholestasis[J]. Nature Communications, 2018, 9(1):1393.
- [7] Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, et al. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats[J]. Gastroenterology, 1995, 109(6):1969-1976.
- [8] Yao Z L, Mates J M, Cheplowitz A M, et al. Blood-borne lipopolysaccharide is rapidly eliminated by liver sinusoidal endothelial cells via high-density lipoprotein[J]. Journal of Immunology, 2016, 197(6):2390-2399.
- [9] Kleine B, Freudenberg M A, Galanos C. Excretion of radioactivity in faeces and urine of rats injected with 3H, 14C-lipopolysaccharide[J]. British Journal of Experimental Pathology, 1985, 66(3):303-308.
- [10] Hassan R, Myllys M, Brackhagen L, et al. Colchicine overdose impairs the capacity of Kupffer cells to clear foreign particles and endotoxins[J]. Archives of Toxicology, 2022, 96(11):3067-3076.
- [11] Topchiy E, Cirstea M, Kong H J, et al. Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes via the low-density lipoprotein receptor[J]. PLoS One, 2016, 11(5):e0155030.
- [12] Pombinho R, Pinheiro J, Resende M, et al. Stabilin-1 plays a protective role against *Listeria monocytogenes* infection through the regulation of cytokine and chemokine production and immune cell recruitment[J]. Virulence, 2021, 12(1):2088-2103.
- [13] Nour J, Moregola A, Svecla M, et al. Mannose receptor deficiency impacts bone marrow and circulating immune cells during high fat diet induced obesity[J]. Metabolites, 2022, 12(12):1205.
- [14] Remetic J, Ghallab A, Hobloss Z, et al. Loss of bile salt export pump aggravates lipopolysaccharide-induced liver injury in mice due to impaired hepatic endotoxin clearance[J]. Hepatology, 2022, 75(5):1095-1109.
- [15] Šarenac T M, Mikov M. Bile acid synthesis: from nature to the chemical modification and synthesis and their applications as drugs and nutrients[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9:939.
- [16] Hofmann A F. Bile acids: the good, the bad, and the ugly[J]. News in Physiological Sciences, 1999, 14:24-29.
- [17] Kramer W. Transporters, Trojan horses and therapeutics: suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery[J]. Biological Chemistry, 2011, 392(1/2):77-94.
- [18] van der Schoor L W E, Verkade H J, Bertolini A, et al. Potential of therapeutic bile acids in the treatment of neonatal Hyperbilirubinemia[J]. Scientific Reports, 2021, 11:11107.
- [19] Hori Y, Ohyanagi H. Protective effect of the intravenous administration of ursodeoxycholic acid against endotoxemia in rats with obstructive jaundice[J]. Surgery Today, 1997, 27(2):140-144.
- [20] Fuchs C D, Trauner M. Role of bile acids and their receptors in gastrointestinal and hepatic pathophysiology[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2022, 19:432-450.
- [21] 胡丹,郝燕青,陈渠,等. 饲料中添加复合胆汁酸对皮质酮诱导的肉鸡脂肪肝综合征的缓解作用研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):44-51. DOI:10.7685/njau.202212010.
Hu D, Hao Y Q, Chen Q, et al. Effect of dietary bile acids supplementation on alleviating fatty liver syndrome induced by corticosterone in broilers[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1):44-51 (in Chinese with English abstract).
- [22] Dai D P, Pan Y H, Zeng C P, et al. Activated FXR promotes xenobiotic metabolism of T-2 toxin and attenuates oxidative stress in broiler chicken liver[J]. Chemo-Biological Interactions, 2020, 316:108912.
- [23] Yin C, Xia B, Tang S L, et al. The effect of exogenous bile acids on antioxidant status and gut microbiota in heat-stressed broiler chickens[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8:747136.
- [24] Chen L, Wen T, Cao A Z, et al. Bile acids promote hepatic biotransformation and excretion of aflatoxin B1 in broiler chickens[J]. Toxins, 2023, 15(12):694.
- [25] Chen Y P, Cheng Y F, Wang W B, et al. Protective effects of dietary supplementation with a silicate clay mineral (palygorskite) in lipopolysaccharide-challenged broiler chickens at an early age[J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 263:114459.
- [26] de Boever S, Beyaert R, Vandemaele F, et al. The influence of age and repeated lipopolysaccharide administration on body temperature and the concentration of interleukin-6 and IgM antibodies against lipopolysaccharide in broiler chickens[J]. Avian Pathology, 2008, 37(1):39-44.
- [27] Sato M, Sato K, Furuse M. Change in hepatic and plasma bile acid contents and its regulatory gene expression in the chicken embryo[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 150(3):344-347.
- [28] Hollander A, Heederik D, Versloot P, et al. Inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin levels in various occupational environments[J]. American Industrial Hygiene Association Journal, 1993, 54(11):647-653.
- [29] Osnes T, Kierulf P, Skar V, et al. Quantification of lipopolysaccharides in human bile with or without gram-negative bacteria[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1992, 27(6):453-458.
- [30] Li N, Liu D F, Wang C, et al. Comparison study of protective effects of porcine bile acids and sheep bile acids against heat stress in chickens[J].

- Journal of the Science of Food and Agriculture,2023,103(12):5687–5696.
- [31] Maitra S K,Rachmilewitz D,Eberle D,et al. The hepatocellular uptake and biliary excretion of endotoxin in the rat[J]. *Hepatology*,1981,1(5):401–407.
- [32] Okin D,Medzhitov R. The effect of sustained inflammation on hepatic mevalonate pathway results in hyperglycemia[J]. *Cell*,2016,165(2):343–356.
- [33] Green R,Beier D,Gollan J. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents [J]. *Gastroenterology*,1996,111(1):193–198.
- [34] Song P Z,Rockwell C E,Cui J Y,et al. Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*,2015,283(1):57–64.
- [35] Yao L N,Seaton S C,Ndousse-Fetter S,et al. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism[J]. *eLife*,2018,7:e37182.
- [36] Zhang C,Gan Y,Lv J W,et al. The protective effect of obeticholic acid on lipopolysaccharide-induced disorder of maternal bile acid metabolism in pregnant mice[J]. *International Immunopharmacology*,2020,83:106442.
- [37] Razori M V,Maidagan P M,Ciriaci N,et al. Anticholestatic mechanisms of ursodeoxycholic acid in lipopolysaccharide-induced cholestasis[J]. *Biochemical Pharmacology*,2019,168:48–56.
- [38] Beuers U,Bilzer M,Chittattu A,et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2,into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver[J]. *Hepatology*,2001,33(5):1206–1216.
- [39] Mühlfeld A,Kubitz R,Dransfeld O,et al. Taurine supplementation induces multidrug resistance protein 2 and bile salt export pump expression in rats and prevents endotoxin-induced cholestasis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,2003,413(1):32–40.
- [40] Kneuer C,Honscha W,Gäbel G,et al. Adaptive response to increased bile acids;induction of *MDR1* gene expression and P-glycoprotein activity in renal epithelial cells[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*,2007,454(4):587–594.
- [41] Estiú M C,Monte M J,Rivas L,et al. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on the altered progesterone and bile acid homeostasis in the mother-placenta-foetus trio during cholestasis of pregnancy[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*,2015,79(2):316–329.
- [42] Perino A,Demagny H,Velazquez-Villegas L,et al. Molecular physiology of bile acid signaling in health,disease,and aging[J]. *Physiological Reviews*,2021,101(2):683–731.

责任编辑:周广礼