

杨庆稳. 表达 EGF 乳酸菌对断奶仔猪回肠中大肠杆菌的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):158-159,215.

表达 EGF 乳酸菌对断奶仔猪回肠中大肠杆菌的影响

杨庆稳

(重庆三峡职业学院动物科技系,重庆万州 404155)

摘要:以 21 日龄 DLY 断奶仔猪为对象,分别用生理盐水、无菌培养基、普通乳酸菌、表达 EGF 乳酸菌对其进行连续 14 d 灌喂后,观察其对仔猪生长性能的影响,并研究表达 EGF 对断奶仔猪回肠中大肠杆菌影响。结果表明,表达 EGF 乳酸菌对断奶仔猪有促生长作用,且表达 EGF 乳酸菌能很好地抑制大肠杆菌生长,可有效减少由大肠杆菌引起的断奶仔猪腹泻。

关键词:断奶仔猪;表达 EGF 乳酸菌;大肠杆菌;回肠

中图分类号: S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0158-02

表皮生长因子(EGF)是一种活性物质,是由 53 个氨基酸组成的活细胞,能修补增生肌肤的表层细胞,对细胞生长和增殖有明显的调节作用^[1]。EGF 通过与细胞膜上的 EGF 受体(EGFR)结合对多种细胞有强烈促进有丝分裂的作用,并可促进细胞角质化和抑制胃酸分泌,可参与溃疡愈合的调节作用。同时 EGF 参与维持胃肠道黏膜的完整性,可保护胃肠道黏膜免受多种损伤因子损害,且 EGF 在胃肠道中比较稳定而不易被消化,甚至可以部分被吸收进入血液循环而作用于外周器官,这种有限吸收的特点,利于其在胃肠道局部范围发挥作用^[2]。乳酸菌是发酵糖类的主要产物,为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性菌,能促进蛋白质、单糖及钙、镁等物质的吸收,产生维生素 B 族等有益物质,也能使肠道菌群的构造发生有益变化,改善胃肠道功能,抑制腐败菌的繁殖,恢复肠道内菌群平衡,形成抗菌生物屏障,增强动物机体免疫力和抵抗力,促进动物的生长发育^[3]。在初生哺乳动物胃肠道发育过程中,通过外源途径供给 EGF 激活损伤肠黏膜细胞中膜刷状缘水解酶活性 DNA 的合成,可有效促进胃肠道的发育,包括促进上皮细胞的增殖,调节肠细胞分化,提高小肠黏度,增强养分消化利用能力,减少细菌移位,维持黏膜屏障,降低细菌引发的感染,从而明显加快初生动物肠道的成熟^[4]。

大肠杆菌是导致 1~3 月龄仔猪腹泻的一种主要病原微生物。因饲养、营养物质等条件改变,血液抗体水平降低,使仔猪抗病力减弱,导致大肠杆菌大量增殖,破坏肠道内微生物生态平衡,引起断奶后腹泻综合征、水肿等应激性疾病的发生。仔猪断奶后,一方面由于母乳保护因子丧失,饲料消化负担增加和环境的影响,使仔猪抗病力减弱而易感染病原微生物;另一方面由于断奶后消化酶活力下降,胃酸分泌不足及胃肠道上皮组织萎缩,导致仔猪消化道微生物区系发生紊乱,极易发生腹泻等疾病^[5]。Mathew 等对 28 日龄断奶仔猪消化道

微生物进行了研究,发现断奶仔猪消化道内容物中乳酸杆菌和发挥脂肪酸浓度下降($P < 0.05$),说明仔猪消化道固有微生物区系已经发生衰退^[6]。

本研究探讨了表达 EGF 乳酸菌对断奶仔猪肠道中菌群的影响,旨在为进一步研究 EGF 在肠道中促进细胞增殖分化,加速皮肤和黏膜创伤愈合,消炎镇痛,防止溃疡等作用^[7]提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

表达 EGF 乳酸菌由四川农业大学动物营养所制备;21 日龄断奶的健康“杜洛克×长白×约克夏”三元杂交仔猪 45 头,平均体重 6~7 kg,其中公猪 23 头,母猪 22 头。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 在同栋单列封闭式猪舍(舍温 18~23℃)内预饲 2 d 后,选择 40 头体况和体重相近的仔猪,公母各半,随机分为 4 组,每组 10 头;对照组,灌喂等量生理盐水;无菌组,只灌喂培养基;LL-EV 组,灌喂培养基和普通乳酸菌;LL-pEGF 组,灌喂表达 EGF 乳酸菌。饲喂 5 次/d(08:30、11:30、15:30、18:30、21:30),每次饲喂量以槽内有少量余料为止,自由饮水。仔猪基础日粮^[8]见表 1。

表 1 仔猪基础日粮组成

种类	含量 (g/kg)	种类	含量 (g/kg)
玉米	220.0	CaCO ₃	9.2
膨化玉米	264.5	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6.1
去皮豆粕	85.0	98.5% L-赖氨酸	3.2
全脂膨化大豆	80.0	99% DL-蛋氨酸	2.0
大豆浓缩蛋白	80.0	98% L-苏氨酸	1.5
鱼粉	40.0	98% L-色氨酸	0.5
乳清粉	150.0	氯化胆碱	0.1
蔗糖	20.0	NaCl	3.0
葡萄糖	30.0	矿物元素+维生素	4.0

1.2.2 生产性能 以圈为单位,每周记录饲喂量,计算各阶段平均日采食量(ADFI)。在试验第 1、第 15 天 06:00—07:00 称量仔猪空腹体重,并计算各阶段平均日增重(ADG)。

收稿日期:2012-12-19

基金项目:四川省教育厅自然科学重点项目(编号:2006A009);四川省应用基础研究项目(编号:2008JY0098);“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(编号:IRT0848)。

作者简介:杨庆稳(1987—),男,重庆永川人,主要从事动物繁殖障碍研究。E-mail:yangqingwen023@126.com。

料肉比(F/G) = 平均日采食量/平均日增重。

1.2.3 试验阶段 每天在仔猪自由采食和饮水后,08:00、15:00 对每组仔猪灌喂 50 mL 相应物质(对照组灌喂 50 mL 生理盐水,无菌组灌喂 50 mL 培养基,LL - EV 组灌喂 50 mL 含有普通乳酸菌的培养基,LL - pEGF 组灌喂 50 mL 含表达 EGF 乳酸菌的培养基),持续 2 周。

1.2.4 对回肠中内容物及肠内容物中大肠杆菌进行计数 在最后 1 次试验称重后从每组中选出 4 头长势相对较好的仔猪进行屠宰,无菌取回肠内容物 1 g,放入含有 99 mL 无菌水的灭菌三角瓶内(瓶内预先加有适量玻璃珠),充分振荡 30 min 后,按 10 倍稀释法分别稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} (稀释梯度参照参考文献[9]);分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的稀释液 20 μ L 滴种于伊红美蓝培养基(EMB)上,每个平皿滴 3 个稀释度,每个稀释度 3 次重复,待液体侵入以后,置于培养箱

37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,记录大肠杆菌菌落数。肠内容物大肠杆菌数 = 大肠杆菌菌落数/(稀释度 \times 0.02)。

1.3 数据处理 用 Excel 和 SPSS 11.5 软件进行数据处理。

2 结果与分析

从表 2 可见,在试验 1 ~ 7 d,无菌组、LL - pEGF 组、LL - EV 组的仔猪日采食量、日增重都显著高于对照组,各组料肉比均无显著差异。试验 8 ~ 14 d,LL - EV 组、LL - pEGF 组、无菌组的日采食量、日增重均显著高于对照组,而各组料肉比也无显著差异。在整个试验中,无菌组、LL - EV 组、LL - pEGF 组的日采食量、日增重均显著高于对照组,各组料肉比均无显著差异。试验末,无菌组、LL - EV 组、LL - pEGF 组的总增重显著高于对照组。

表 2 不同处理对断奶仔猪生长性能的影响

处理	初重 (kg)	末重 (kg)	总增重 (kg)	1 ~ 7 d		
				ADFI(g)	ADG(g)	F/G
对照	6.19 \pm 0.33	8.37 \pm 0.34	2.18 \pm 0.01c	163.42 \pm 30.02c	130.49 \pm 25.25c	1.26 \pm 0.12a
无菌组	6.18 \pm 0.24	8.64 \pm 0.59	2.46 \pm 0.35ab	191.81 \pm 43.47ab	138.16 \pm 30.86ab	1.39 \pm 0.20a
LL - EV 组	6.09 \pm 0.19	8.68 \pm 0.42	2.59 \pm 0.23ab	210.37 \pm 25.65a	172.45 \pm 30.43a	1.25 \pm 0.24a
LL - pEGF 组	6.03 \pm 0.32	8.84 \pm 0.31	2.81 \pm 0.01a	201.84 \pm 43.43ab	159.33 \pm 36.59ab	1.26 \pm 0.26a

处理	8 ~ 14 d			1 ~ 14 d		
	ADFI(g)	ADG(g)	F/G	ADFI(g)	ADG(g)	F/G
对照	246.55 \pm 31.12c	180.03 \pm 36.52c	1.44 \pm 0.43a	207.30 \pm 26.99c	158.63 \pm 25.37c	1.34 \pm 0.25a
无菌组	300.83 \pm 37.95a	215.04 \pm 42.86a	1.27 \pm 0.19a	249.97 \pm 37.10ab	176.71 \pm 30.02ab	1.35 \pm 0.15a
LL - EV 组	295.50 \pm 52.94ab	202.54 \pm 41.44ab	1.48 \pm 0.17a	257.30 \pm 31.42a	185.02 \pm 26.47ab	1.41 \pm 0.17a
LL - pEGF 组	288.55 \pm 34.90ab	214.33 \pm 31.79b	1.35 \pm 0.10a	243.28 \pm 41.59ab	198.47 \pm 40.56a	1.29 \pm 0.28a

注:同列数字后不同小写字母分别表示差异显著。下同。

从表 3 可见,无菌组与对照组的大肠杆菌数量无显著差异,LL - EV 组、LL - pEGF 组的大肠杆菌数量极显著低于对照组,而 LL - EV 组和 LL - pEGF 组的大肠杆菌数量无显著差异。

表 3 不同处理对断奶仔猪回肠内容物中大肠杆菌数量的影响

处理	大肠杆菌数量 (CFU/mL)
对照	5.05 \pm 0.78b
无菌组	4.87 \pm 0.32b
LL - EV 组	3.95 \pm 0.09a
LL - pEGF 组	3.83 \pm 0.14a

3 结论与讨论

本研究表明,添加表达 EGF 乳酸菌能抑制断奶仔猪肠道中大肠杆菌的生长,具有促增长和提高断奶仔猪生长性能的作用,从而抑制肠道中大肠杆菌的生长繁殖,有效减少由大肠杆菌引起的断奶仔猪黄痢、白痢、水肿病,改善肠道功能,增加消化吸收面积,从而提高断奶仔猪的生长性能,在生产上提高饲料转化率,降低生产成本,增加经济效益。

有研究表明,EGF 对胃肠道有修复作用,在损伤面周围有活力的上皮细胞上沿基底膜移行,迅速覆盖损伤上皮,使消化道黏膜上层在短时间内迅速重建^[10]。在应激或其他伤害

因素的作用下,黏膜深度损伤达到基底膜,导致基底膜的完整受到破坏时的修复则是通过伴有炎症产生的缓慢细胞增殖过程,使损伤黏膜重新愈合完成,如断奶仔猪因应激导致肠道黏膜上皮损伤而发生的修复。在正常生理状态或黏膜受到损伤的情况下,胃肠道黏膜组织在不断合成和释放一些包括 EGF 在内的生长因子,以旁分泌或内分泌的形式维持黏膜屏障、调节黏液分泌以及参与修复过程^[11]。表达 EGF 乳酸菌具有提高小肠黏度,增强养分消化利用能力,减少细菌移位,维持黏膜屏障^[12],降低细菌引发的感染,从而明显加快初生动物肠道成熟,改善消化道功能,提高抗病力。本研究表明,LL - pEGF 组的仔猪日采食量、日增重都在增加,而料肉比下降不明显。因此,表达 EGF 乳酸菌可以改善仔猪肠道形态,增加消化吸收面积,在 14 d 内使 21 日龄断奶仔猪体重提高 29.36%,从而提高断奶仔猪的生长性能。

仔猪肠道的微生物区系随宿主日龄增加逐渐变得复杂多样,并形成一个相对稳定的微生态系统,对猪的生长起重要作用。断奶引起的仔猪消化道环境改变主要表现为消化道菌群的变化。研究表明,断奶后仔猪消化道乳酸杆菌数量下降,总细菌数量及肠杆菌(特别是大肠杆菌)比例上升,一旦肠道中优势菌属于致病性的 *Escherichia* 和 *Streptococcus*,就会引起仔猪腹泻甚至死亡^[13]。本研究中灌喂表达 EGF 乳酸杆菌能显著降低断奶仔猪回肠中的大肠杆菌数量,说明表达 EGF 乳酸(下转第 215 页)

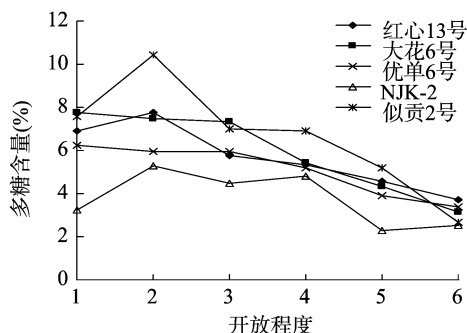


图2 5个杭白菊品种类型多糖积累规律

啡酰基奎宁、总黄酮的含量呈先上升后下降的趋势,自蕾期开始逐渐增加,到 80% 开放程度时达到最高点,随后降低。似贡 2 号中绿原酸、木犀草苷、3,5-O-双咖啡酰基奎宁、总黄酮的含量胎菊期最高,之后随着花器官开放而降低。绿原酸、木犀草苷、3,5-O-双咖啡酰基奎宁为药典规定成分,黄酮类物质为药用菊花品质评判的重要依据,因此在 80% 开放时采收,可以使药用菊花中绿原酸、木犀草苷、3,5-O-双咖啡酰基奎宁、总黄酮达到最佳利用效力。

5 个药用菊花品种类型挥发油的积累除红心 13 号和 NJK-2 外均呈现先升高后降低的趋势并于胎菊期(时期 2)达到峰值,多糖含量除优单 6 号、大花 6 号在蕾期(时期 1)达到最高外,其他品种类型菊花多糖的积累均在胎菊期(时期 2)达到峰值。大花 6 号多糖积累和似贡 2 号挥发油积累表现出一致性,均呈现先升高后降低的趋势并于胎菊期(时期 2)达到最大值。多糖和挥发油为影响茶用菊花口感的重要因素。本试验中所有品种类型多糖、挥发油的最大值均出现于胎菊期或蕾期。因此,药用菊花于胎菊期或蕾期采收口感较佳,但是考虑到药用菊花药典的规定,以胎菊期采收较适宜。

因药用菊花与茶用菊花在品质要求上有所不同,本试验

(上接第 159 页)

菌对大肠杆菌有很好的抑制作用,能有效防治大肠杆菌引起的腹泻。大肠杆菌属于条件致病菌,当基数较小时,遇到气候、环境等外界因素改变时,发生大量繁殖的概率大大减少,从源头上减少了腹泻发生的可能性。

参考文献:

- [1]郭东东,黄秉仁. EGF 结构与功能研究[J]. 医学研究通讯, 2002,31(5):24-26.
- [2]Basuroy S, Sheth P, Mansbach C M. Acetaldehyde disrupts tight junction and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and lgiutamine[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005,289(2):367-375.
- [3]赖俊豪,王俊义,张国祥. 表皮生长因子对全胃肠外营养大鼠肠道细菌易位的影响及其机制[J]. 中华创伤杂志,1999,15(2):133-135.
- [4]黄晶晶,刘玉兰. 表皮生长因子对胃肠道的作用[J]. 饲料研究, 2005(12):14-16.
- [5]吴金节,章孝荣,王勇,等. 复方中药制剂防治仔猪早期断奶应激综合症的研究[J]. 安徽农业科学,2001,29(2):236-238.

结果显示不同品种类型菊花各项化学成分积累动态有一定差异,茶用菊花与药用菊花品质要求及分别于何时采收品质最佳的不同仍需要进一步研究。

本试验所得的主要化学成分含量随花朵开放程度变化的规律与前人的研究结果不同。胡碧波等研究发现杭白菊木犀草苷含量采摘初期变化不明显,采摘后期呈下降趋势^[2]。杨俊等研究发现杭白菊绿原酸含量在整个采摘周期中无明显变化^[3]。蒲婧哲等研究发现 5 个杭菊栽培品种均在花朵 70% 开放期时绿原酸含量达到最高^[4]。孙淑芳等研究发现杭白菊 4 个主栽品种绿原酸含量在花蕾期最高,胎菊期次之;木犀草苷含量胎菊期最高,幼菊期次之^[5]。盛蒂等研究发现红心白菊绿原酸含量在 40% 花朵开放程度时最高^[6]。这些差异可能是由品种、生长环境、采收时间、加工方法、测定方法等因素造成的。虽然大多药菊品种的成分累积呈现一定的规律性,胎菊期是较为合适的采收期,但是药用菊花品种繁杂,针对不同品种的最适采收期仍需做进一步研究。

参考文献:

- [1]中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [2]胡碧波,蒋惠娣,杨俊,等. HPLC 法测定不同采收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量[J]. 浙江大学学报:医学版,2004,33(1):29-32.
- [3]杨俊,蒋惠娣,戈震,等. 杭白菊绿原酸及其他成分的含量在采摘期中的动态变化[J]. 中国药学杂志,2003,38(11):833-836.
- [4]蒲婧哲,张青云. 杭菊中绿原酸含量花期动态积累研究[J]. 安徽医药,2007,11(6):522-523.
- [5]孙淑芳,沈学根,张新风,等. 采收期对杭白菊 4 个主栽品种功效成分的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(21):2945-2949.
- [6]盛蒂,朱兰保. 不同栽培类型、不同开放程度菊花中总黄酮和绿原酸含量研究[J]. 食品工业科技,2012,33(2):157-159.
- [6]Mathew A G, Robbins C M. Influence of galactosyl lactose on energy and protein digestibility, enteric microflora and performance of weanling pigs[J]. Journal of Animal Science,1997,75(4):1009-1016.
- [7]董光龙,王俊义,王为忠,等. 表皮生长因子对放射性肠炎全肠外营养大鼠谷氨酰胺代谢酶的影响[J]. 第四军医大学学报,2000,21(8):1008-1011.
- [8]王成章,王恬. 饲料学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [9]赵桂英,段纲,杨亮宇,等. 仔猪消化道菌群变化与仔猪腹泻的关系[J]. 家畜生态,2004,25(4):44-47.
- [10]范志勇,王康宁,周定刚. EGF、Gln 和 pGRF 基因质粒对早期断奶仔猪生长及肠道发育的影响[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(5):45-46.
- [11]湛先保,李兆申,崔忠敏,等. 应激状态下胃黏膜屏障变化的实验研究[J]. 中华内科杂志,2002,20(6):374-377.
- [12]许春娣,袁耀宗,陈舜年,等. 体液中表皮生长因子水平变化与消化性溃疡愈合的关系[J]. 上海医学,2000,23(5):296-298.
- [13]Canh T T, Sutton A L, Aarnink A J, et al. Dietary carbohydrates alter the fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pig[J]. Journal of Animal Science,1998,76(7):1887-1895.