



## 丁酸梭菌影响肠炎沙门氏菌对 SPF 小鼠致病性的作用

崔璐璐<sup>1</sup>, 鞠孜敬<sup>1</sup>, 杨溢<sup>2</sup>, 张富友<sup>1</sup>, 刘青霄<sup>1</sup>, 朱国强<sup>2</sup>, 孙淑红<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271000

<sup>2</sup> 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

<sup>3</sup> 山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 山东 泰安 271000

<sup>4</sup> 山东省畜禽疫病防控工程技术研究中心, 山东 泰安 271000

**摘要:** 【目的】旨在探究丁酸梭菌影响肠炎沙门氏菌(CVCC3377)对 SPF 小鼠的致病性及对小鼠的保护作用。【方法】选用 72 只 6 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 按照完全随机区组设计分为阴性对照(CON)、饲喂丁酸梭菌组(CB)、沙门氏菌感染组(SE)和丁酸梭菌保护组(CB+SE) 4 组, 每组 18 只。CON 组和 SE 组饲喂基础日粮和饮水, CB 组和 CB+SE 组饲喂基础日粮和每天更换添加丁酸梭菌( $1 \times 10^7$  CFU/mL)的饮水, 连续饲喂一周; 第 8 天进行肠炎沙门氏菌感染实验, 分别对 SE 组和 CB+SE 组灌服 0.2 mL  $1.1 \times 10^4$  CFU/只的肠炎沙门氏菌, 同时对阴性对照组和丁酸梭菌组灌服 0.2 mL 生理盐水。在感染后第 6 天处死小鼠并采集肝脏、脾脏和盲肠及内容物样品。采用 H.E 染色检测肝脏和脾脏组织的病理学变化, 免疫组化检测脾脏组织中 TLR4、MyD88 蛋白的表达水平, 荧光定量 PCR 检测盲肠组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达水平, 并通过高通量测序方法分析其对肠道菌群的影响。【结果】结果显示, 丁酸梭菌能够缓解肠炎沙门氏菌感染引起的小鼠体重下降; H.E 染色结果显示, 丁酸梭菌可以缓解肠炎沙门氏菌感染造成的组织损伤; 免疫组化结果显示, 丁酸梭菌可降低脾脏组织细胞中 TLR4、MyD88 蛋白的表达水平, 荧光定量 PCR 结果显示肠炎沙门氏菌能够显著升高盲肠组织中 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) 和 IL-6 的表达水平, 在此基础上饲喂丁酸梭菌能够降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达水平。高通量测序结果显示, 丁酸梭菌组 Chao1 指数、ACE 指数和 Shannon 指数均高于对照组和沙门氏菌感染组 ( $P > 0.05$ ), 丁酸梭菌可显著降低放线菌门(*Actinobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)在肠道微生物中的比例 ( $P < 0.05$ ),

基金项目: 国家十三五重点研发计划项目(2016YFD0501608、2017YFD0500105); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019XM009); 山东省“双一流”计划(SYL2017YSTD11)

\*通信作者。E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn

收稿日期: 2019-07-17; 修回日期: 2019-11-28; 网络出版日期: 2019-12-20

另外, 丁酸梭菌可以增加乳酸菌属在肠道微生物群落的相对丰度( $P>0.05$ )。【结论】结果表明, 丁酸梭菌可以提高小鼠免疫力, 缓解由于沙门氏菌感染引起的炎症反应, 增加肠道微生物多样性, 调节肠道菌群结构。

**关键词:** 丁酸梭菌, 肠炎沙门氏菌, SPF 小鼠, 高通量测序, 肠道菌群

沙门氏菌是一类严重危害人类和畜禽健康的食源性病原菌, 主要通过食物链传播给人类, 是人类食物中毒的主要病原之一<sup>[1-2]</sup>。沙门氏菌感染畜禽, 造成巨大的经济损失, 全世界每年有数千万沙门氏菌病病例, 导致数十万人死亡<sup>[3]</sup>。其中, 肠炎沙门氏菌是目前主要血清型, 肠炎沙门氏菌感染能够引起动物机体炎性反应, 破坏肠道免疫屏障, 严重者甚至死亡<sup>[4]</sup>。抗生素长期的大量使用甚至滥用以防治沙门氏菌感染, 导致细菌耐药性增加, 耐药谱不断加宽, 甚至细菌耐药株的出现<sup>[5]</sup>, 因此, 寻找一种绿色、安全的抗生素替代物来缓解这一问题已成为当前研究的热点。

益生菌可调控先天免疫和适应性免疫, 通过诱导炎性因子和抑炎因子的表达来调控肠道免疫<sup>[6]</sup>。以往研究显示, 在日粮中添加益生菌可以提高动物生长性能, 避免抗生素和其他化学药物残留, 促进动物肠道发育和改善肠道屏障功能<sup>[7-8]</sup>。丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)是目前应用最为广泛的益生菌之一, 已被广泛应用于治疗动物肠道疾病。以往研究表明, 丁酸梭菌具有提高机体抗氧化能力、预防炎症发生、促进动物健康等功能<sup>[9-11]</sup>, 然而关于丁酸梭菌影响肠炎沙门氏菌对 SPF 小鼠的致病性作用尚不清楚。本实验旨在建立小鼠肠炎沙门氏菌感染模型, 探究丁酸梭菌调控沙门氏菌感染、炎症反应以及对肠道微生物的影响, 为保障动物健康以及相关产品研发奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

丁酸梭菌(AQQF01000149)由大连三仪动物药品有限公司提供, 实验用丁酸梭菌菌悬液终浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。

肠炎沙门氏菌标准菌株 CVCC3377 保存于山东农业大学家禽疫病防控研究室。

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌鼠(体质量  $18.5 \pm 2$  g)购自北京斯贝福生物技术有限公司。

### 1.2 肠炎沙门氏菌对 C57BL/6 小鼠的半数致死量(LD<sub>50</sub>)的测定

选取 36 只 6 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠进行 LD<sub>50</sub> 的测定, 以  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  和  $1 \times 10^3$  CFU/mL 6 个梯度皮下注射感染肠炎沙门氏菌后, 连续观察 7 d, 统计各组小鼠的死亡情况, 利用 Reed-Muench 方法计算出肠炎沙门氏菌对 C57BL/6 小鼠的 LD<sub>50</sub>。采用五分之一 LD<sub>50</sub> 为最终感染剂量。

### 1.3 试验设计与饲养管理

选用 72 只 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 按照完全随机区组设计分为 4 组, 每组 18 只。实验分为阴性对照组(CON)、饲喂丁酸梭菌组(CB)、沙门氏菌感染组(SE)和丁酸梭菌保护组(CB+SE), CON 组和 SE 组饲喂基础日粮和每天更换添加丁酸梭菌( $1 \times 10^7$  CFU/mL)的饮水, CB 组和 CB+SE 组饲喂基础日粮和每天更换添加丁酸梭菌( $1 \times 10^7$  CFU/mL)

的饮水,连续饲喂一周,称重并记录小鼠生活行为。

第 8 天进行沙门氏菌感染实验,采用灌胃感染方式。分别对 SE 组和 CB+SE 组灌喂 0.2 mL  $1.1 \times 10^4$  CFU/只的肠炎沙门氏菌,同时对阴性对照组和丁酸梭菌组灌服 0.2 mL 生理盐水,在沙门氏菌感染第 6 天处死小鼠并采集样本。

#### 1.4 样品采集

将小鼠颈部脱臼处死,采集肝脏、脾脏和盲肠组织,一部分样品放置于 4%多聚甲醛液中固定保存,用于后续病理切片和免疫组化的制作和观察,另一部分立刻放置于液氮中,用于组织总 RNA 的提取,检测盲肠组织炎症相关基因的表达。另采集部分盲肠内容物立即转入  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏,用于盲肠菌群的 RNA 的测定。

#### 1.5 脾脏组织 H.E 染色观察

组织固定:4%多聚甲醛液中固定;切片制备:用梯度酒精进行脱水、二甲苯透明等处理,用包埋机将组织包埋于石蜡中,制成蜡块;切片:调整厚度( $5\text{ }\mu\text{m}$ ),上机切片,然后经摊片、烤片等处理后,制成白片;H.E 染色:将切片脱蜡复水,苏木精伊红染色后,脱水,中性树脂封片, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干后,在正置显微镜下观察记录<sup>[9]</sup>。

#### 1.6 组织中细胞因子分泌和信号通路相关蛋白表达水平

**1.6.1 样品总 RNA 的提取:**总 RNA 的提取按照 RNA isolater (Vazyme)法,根据试剂使用说明书进行;采用 Nanodrop ND-1000 测定总 RNA 浓度,总 RNA 经反转录试剂盒(Vazyme)反转录得到 cDNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.6.2 荧光定量 PCR 盲肠组织中细胞因子的变化:**自 NCBI Genbank 获得相关基因,设计特异性

引物经过验证后,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体引物序列见表 1。

使用诺唯赞 SYBR Green 荧光染料(Vazyme)进行荧光定量 PCR,所使用的仪器为美国罗氏荧光定量 PCR 仪。反应体系采用 20  $\mu\text{L}$  体系进行:10  $\mu\text{L}$  SYBR Green, 0.5  $\mu\text{L}$  正向引物, 0.5  $\mu\text{L}$  反向引物, 0.5  $\mu\text{L}$  ROX 荧光染料, 2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 6.5  $\mu\text{L}$  灭菌蒸馏水。反应条件设定:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min, 1 个循环;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s 至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s, 40 个循环。

#### 1.6.3 免疫组化检测 TLR4、MyD88 蛋白的表达水平:

切片经脱蜡,梯度酒精复水;双氧水去除内源过氧化氢酶;抗原修复:将片子浸入煮沸的柠檬酸盐溶液中修复,冷却;山羊血清封闭,加入 TLR4、MyD88 抗体((Servicebio)过夜;加二抗辅助剂(Servicebio),二抗(Servicebio)孵育,然后 DAB 显色,镜下观察;苏木精染色,经酒精盐酸分化,梯度酒精脱水,二甲苯透明后;中性树脂封片。

#### 1.7 肠道微生物菌群分析

将采集的盲肠内容物送往上海派森诺生物科技有限公司进行高通量测序。

表 1. 基因引物序列

Table 1. The primers for fluorogenic quantitative PCR detection

Gene	Primer (5'→3')	Product size/bp
TNF- $\alpha$	F GCGACGTGGAAGTGGCAGAAG	103
	R GCCACAAGCAGGAATGAGAAGAGG	103
IL-6	F AGGAGTGGCTAAGGACCAAGACC	142
	R CTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC	142
$\beta$ -actin	F CTACCTCATGAAGATCCTGACC	90
	R CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC	90

## 1.8 数据分析

对数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素分析(One-way ANOVA), 采用 Duncan 氏法进行多重比较, 以  $P < 0.05$  代表差异显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 肠炎沙门氏菌对小鼠的 LD<sub>50</sub> 测定

梯度感染肠炎沙门氏菌后, 连续观察 7 d, 统计各组小鼠的死亡情况(表 2)。计算出肠炎沙门氏菌对 C57BL/6 小鼠的 LD<sub>50</sub> 值为  $5.6 \times 10^4$  CFU/mL。采用五分之一 LD<sub>50</sub> 为最终感染剂量。

### 2.2 丁酸梭菌对 SE 感染小鼠体重的影响

实验第 0、7 和 14 天固定时间称量每组小鼠的体重, 制作各组小鼠的体重变化曲线(图 1)。在 0-7 d 实验期间, 各组小鼠体重均呈增长趋势, 毛发有光泽, 饮食、大便活动和精神状态未见异常。在第 8 天进行 SE 感染试验后, 与 SE 组相比, CB+SE 组体重呈上升趋势, 四组小鼠间体重无显著差异( $P < 0.05$ )。第 8 天攻毒试验后, 阴性对照组与丁酸梭菌对照组均出现体重下降情况, 是由于感染组和丁酸梭菌处理组小鼠在感染沙门氏菌时, 阴性对照组和丁酸梭菌组同样灌服 0.2 mL 生理盐水, 会对小鼠产生较大的应激。同时发现丁酸梭菌饲喂组下降的体重低于对照组,

表 2. 感染小鼠死亡率统计结果

Table 2. The death statistics of mice after infected by *Salmonella enteritidis*

Groups	Dose/CFU	Animal number	Death number	Death rate/%
1	$1 \times 10^8$	6	6	100
2	$1 \times 10^7$	6	6	100
3	$1 \times 10^6$	6	6	100
4	$1 \times 10^5$	6	6	100
5	$1 \times 10^4$	6	2	33.33
6	$1 \times 10^3$	6	0	0

表明丁酸梭菌可以缓解小鼠应激, 对小鼠具有较好的保护力。

### 2.3 丁酸梭菌对 SE 感染小鼠脏器组织形态完整性的影响

通过对肝脏和脾脏进行 H.E 染色观察(图 2)发现, 小鼠遭受沙门氏菌感染后, SE 组出现细胞核皱缩、溶解及核破裂, CB+SE 组出现明显的改善情况; CON 组和 CB 组细胞排列整齐, 结构完整, 红髓白髓分界明显, SE 感染组组织出现断裂红髓白髓区域分界混乱、细胞出现破裂以及核溶解, CB+SE 组脾脏髓质部红髓与白髓区域分界清楚, 由上可知丁酸梭菌能够减轻 SE 感染引起的脏器组织结构的损伤。

### 2.4 丁酸梭菌对组织中细胞因子分泌和相关蛋白表达水平的影响

**2.4.1 盲肠组织中细胞因子表达水平:** 盲肠中各基因转录水平如图 3-A 所示, 与 CON 组和 CB 组相比, SE 组和 CB+SE 组盲肠中 TNF- $\alpha$  基因表达水平显著升高( $P < 0.05$ ), CB+SE 组较 SE 组呈下降趋势( $P > 0.05$ )。另外, IL-6 的表达水平在各组间差异不显著( $P > 0.05$ ), CB+SE 组 IL-6 表达水平较 SE 组呈下降趋势( $P > 0.05$ ) (图 3-B)。

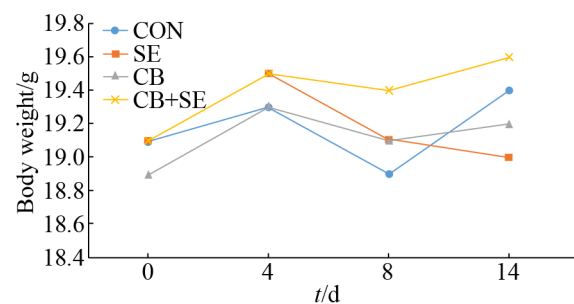


图 1. 鼠体重变化表

Figure 1. Body weight change of mice. CON: Negative control group; CB: *Clostridium butyricum* group; SE: *Salmonella enteritidis* infection group; CB+SE: *Clostridium butyricum* protection group.

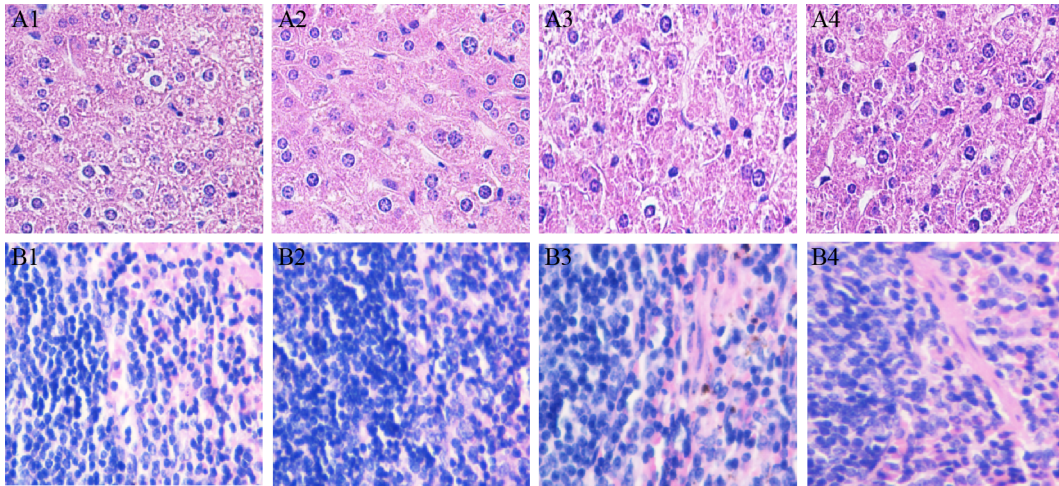


图 2. 丁酸梭菌对组织形态的影响(400×)

Figure 2. Effects of *Clostridium butyricum* on the morphology changes of tissue (400×). A: Liver, B: Spleen. A1: Negative control group; A2: *Salmonella enteritidis* infection group; A3: *Clostridium butyricum* group; A4: *Clostridium butyricum* protection group. B1: Negative control group; B2: *Salmonella enteritidis* infection group; B3: *Clostridium butyricum* group; B4: *Clostridium butyricum* protection group.

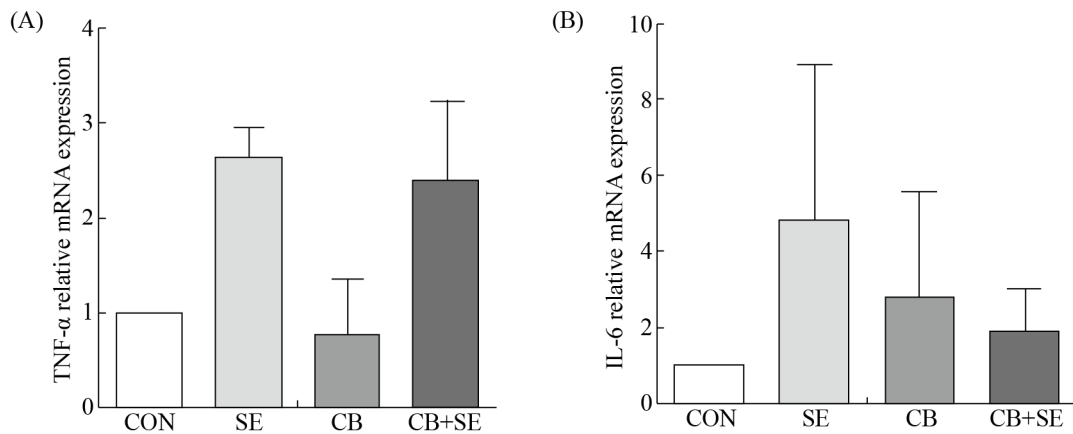


图 3. 丁酸梭菌对肠炎沙门氏菌感染小鼠盲肠组织中细胞因子表达的影响

Figure 3. Effects of *Clostridium butyricum* on expression of cytokines in cecal tissues of mice infected with *Salmonella enteritidis* (N=4). A: TNF- $\alpha$  relative mRNA expression; B: IL-6 relative mRNA expression (N=4).  $P < 0.05$  means significant difference. CON: Negative control group; CB: *Clostridium butyricum* group; SE: *Salmonella enteritidis* infection group; CB+SE: *Clostridium butyricum* protection group.

**2.4.2 脾脏组织中 TLR4 和 Myd88 蛋白的表达水平:** 通过免疫组化方法对脾脏组织中 TLR4 和 MyD88 蛋白的表达水平进行分析, 如图 4-A、4-B 所示, 与 SE 组相比, CB+SE 组 TLR4, MyD88 蛋白表达水平呈下降趋势。

**2.5 丁酸梭菌对正常小鼠和 SE 感染小鼠肠道菌群多样性的影响**

OTU代表样品物种的丰度,使用QIIME软件,对OTU丰度矩阵中每个样本的序列总数在不同深度下随机抽样,以每个深度下抽取到的序列数及

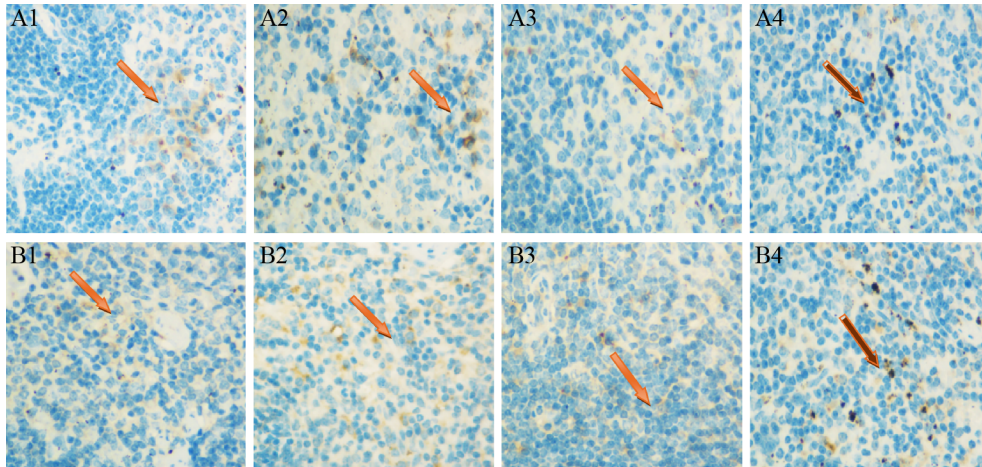


图 4. 丁酸梭菌对 TLR4 和 MyD88 蛋白表达的影响(400×)

Figure 4. Effects of *Clostridium butyricum* on the expression of proteins related to MyD88 and TLR4 (400×). Arrow pointing represents the expression level of TLR4 and MyD88. A: MyD88; B: TLR4. A1: Negative control group; A2: *Salmonella enteritidis* infection group; A3: *Clostridium butyricum* group; A4: *Clostridium butyricum* protection group. B1: Negative control group; B2: *Salmonella enteritidis* infection group; B3: *Clostridium butyricum* group; B4: *Clostridium butyricum* protection group.

其对应的 OTU 数绘制稀疏曲线(图 5)。如图所示,随着测序数量的升高,各样本曲线趋向平缓,继续增加测序深度无法检测出大量的尚未发现的新 OTU,图 5 说明样本测序质量较高。

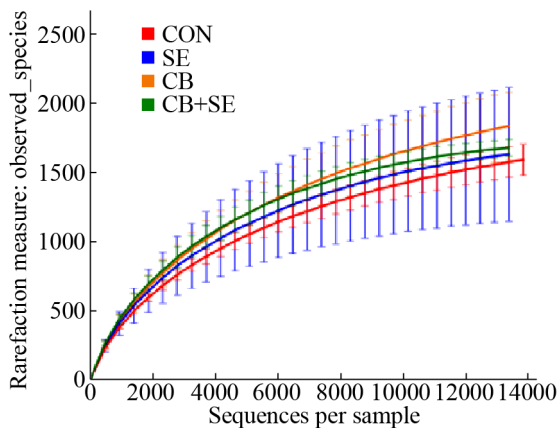


图 5. 肠道菌群稀疏曲线

Figure 5. Rarefaction curve analysis of intestinal tract. CON: Negative control group; CB: *Clostridium butyricum* group; SE: *Salmonella enteritidis* infection group; CB+SE: *Clostridium butyricum* protection group.

群落多样性常用 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数来反映。表 3 显示,丁酸梭菌组 Chao1 指数、ACE 指数和 Shannon 指数均高于对照组和沙门氏菌感染组,表明丁酸梭菌能够增加微生物菌群的多样性( $P>0.05$ )。

图 6-A、B 分别表示在门水平与属水平上的小鼠肠道菌群组成。在门水平上,厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门是各实验组中小鼠肠道中的主要微生物,这四种菌群总丰度高达 98% 以上;其中,厚壁菌门、拟杆菌门与变形菌门是

表 3. 样品 alpha 多样性指数

Table 3. Alpha diversity index of each group

Items	Chao1index	ACE index	Shannon index	Simpson index
CON	1883±57.4	2026±71.6	8.125±0.082	0.9801±0.001
SE	2196±286.8	2273±302.3	8.348±0.532	0.9801±0.009
CB	2253±181.5	2393±193.8	8.445±0.382	0.9753±0.0122
CB+SE	1847±97.32	1896±127.6	8.708±0.206	0.9848±0.005

Values in the same column with different letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

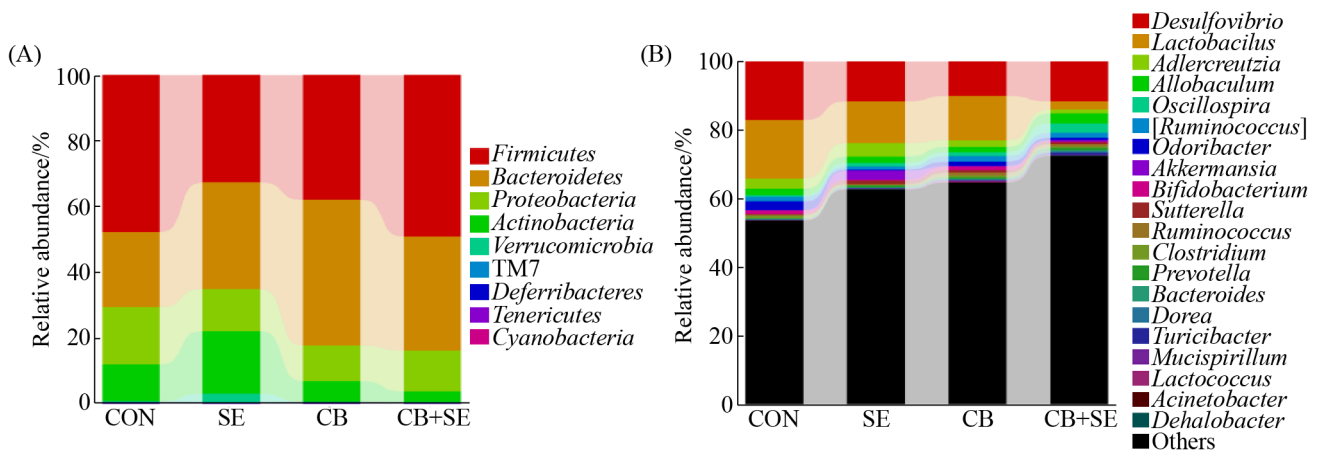


图 6. 菌群组成及多样性

Figure 6. Microbial composition and diversity. A: Phylum classification chart of flora in cecum; B: genus classification chart of flora in cecum. CON: Negative control group; CB: *Clostridium butyricum* group; SE: *Salmonella enteritidis* infection group; CB+SE: *Clostridium butyricum* protection group.

最重要的微生物。在门水平上，与 SE 组相比，CB+SE 组显著降低放线菌门和疣微菌门的比例 ( $P < 0.05$ )。另外，与对照组和沙门氏菌感染组相比，丁酸梭菌对照组中拟杆菌门在肠道菌群的比例呈上升趋势 ( $P > 0.05$ )。在属水平上，CB+SE 组显著降低阿克曼菌属在肠道微生物的比例 ( $P < 0.05$ )，与 CON 组，CB 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与其他三组相比，丁酸梭菌组肠道微生物中乳酸菌属在肠道菌群中的比例升高。这与之前的报道一致。

### 3 讨论

耿正颖等发现，在日粮中添加丁酸梭菌，能够显著提高仔猪在断奶阶段的健康水平和抗应激能力<sup>[12]</sup>。一些报道指出，添加丁酸梭菌可显著提高肉鸡的平均日采食和平均日增重<sup>[13-14]</sup>。本文作者在探究饲喂丁酸梭菌对小鼠感染较大剂量沙门氏菌后致死率的影响试验中证实，使用  $10^6$  CFU 的感染剂量分别感染正常 6 周龄小鼠和提前饲喂

一周丁酸梭菌的 6 周龄小鼠，在感染试验第 10 天，沙门氏菌感染组 18 只小鼠全部死亡，而试验组在感染沙门氏菌第 13 天后仍有 3 只小鼠存活，表明丁酸梭菌能够延缓小鼠的死亡时间，提高小鼠存活率。在本研究中，肠炎沙门氏菌感染 SPF 小鼠后，小鼠的体重呈下降趋势，这与之前的报道是一致的<sup>[15-17]</sup>。同时本研究发现，与 SE 感染组相比，CB+SE 组小鼠体重出现上升趋势，表明丁酸梭菌能够缓解小鼠由于 SE 感染造成的体重损失。随着小鼠发育，肠炎沙门氏菌可能对机体生长性能的影响越来越大，这一推断需要进一步的验证。

白介素 6 (IL-6) 是一类重要的促炎因子，可以促进炎症的发生，在炎症反应中扮演着重要角色，并能促进巨噬细胞产生转化生长因子，引起免疫抑制<sup>[18]</sup>。报道显示，饲喂乳酸菌能够降低由于沙门氏菌感染引起的 IL-6 表达水平的升高<sup>[19]</sup>。本研究发现，小鼠感染沙门氏菌后，IL-6 在各组间变化无显著差异，推测可能是感染的沙门氏菌种类

不同、感染剂量不同所致, 需要进一步的研究。

肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )是评价机体炎症反应的一类重要指标, 当病原菌入侵机体时, 就会刺激单核巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$  诱导机体产生炎症反应<sup>[20-21]</sup>。丁酸梭菌能够降低由于葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠溃疡性结肠炎引起的 TNF- $\alpha$  的升高<sup>[22]</sup>。本研究表明, 与 CON 组相比, SE 组和 CB+SE 组 TNF- $\alpha$  表达水平显著升高, 而 CB+SE 组较 SE 组呈下降趋势, 表明丁酸梭菌能够缓解由于沙门氏菌感染小鼠引起的 TNF- $\alpha$  的升高。

TLRs 是一类重要的模式识别受体, 能够参与先天免疫和适应性免疫<sup>[23]</sup>。TLR4 是 TLRs 信号转导家族的重要成员之一, 在革兰氏阴性菌产生的 LPS 的刺激作用下, 激活 TLR4 和 MyD88, 介导众多炎性因子的表达<sup>[24]</sup>。沙门氏菌感染机体后, 会激发一系列炎症反应。已有研究表明, 鸡感染沙门氏菌后, 会引起 TLR4 相关基因表达水平的升高<sup>[25]</sup>。本研究发现, 丁酸梭菌能够降低 TLR4、MyD88 蛋白的表达水平, 这与赵效南<sup>[24]</sup>在肉鸡上研究结果相近。

肠道微生物在宿主免疫系统中占据重要位置, 肠道菌群的失调会引发宿主免疫系统的功能的紊乱, 导致肠道疾病的发生<sup>[26]</sup>。以往研究显示, 肠道中存在较高的微生物群落多样性有助于提高动物生长性能<sup>[27]</sup>。报道显示, 在日粮中添加丁酸梭菌可以调节宿主肠道微生物菌群结构, 发挥益生作用<sup>[28-29]</sup>。 $\alpha$ 多样性分析常用来反映微生物群落的丰富度和多样性, 其中 Chao1 指数、ACE 指数主要反映群落的丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数主要反映微生物群落的多样性。Chao1 指数

和 ACE 指数越高, 代表群落的总丰度越高; Shannon 指数越高, Simpson 指数越低, 代表群落多样性越高。本研究发现, 丁酸梭菌对照组 Chao1 指数、ACE 指数和 Shannon 指数均高于对照组和沙门氏菌感染组, Simpson 指数低于沙门氏菌感染组, 表明丁酸梭菌能够增加微生物菌群的多样性, 这与之前的报道一致。CB+SE 组 Chao1 指数低于 SE 组, 可能是由于丁酸梭菌的补充改变了小鼠肠道微生物菌群结构, 不同细菌其影响耐受性因素不同, 丁酸梭菌通过抑制有害菌的生长, 进一步发挥益生作用。另外, 丁酸梭菌可显著降低由于沙门氏菌感染引起的放线菌门和疣微菌门中阿克曼菌的比例, 增加乳酸菌属在肠道微生物群落的相对丰度, 这与之前的报道一致, 表明丁酸梭菌可以改变肠炎沙门氏菌感染导致的肠道菌群结构, 调节肠道微生物菌群平衡。

本研究中, 丁酸梭菌在一定程度上缓解由于肠炎沙门氏菌感染而造成的小鼠体重的损失, 在一定程度上增强小鼠的免疫力; 通过检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、TLR4 与 MyD88 的表达水平, 探究丁酸梭菌对肠炎沙门氏菌感染小鼠后引发机体炎症反应的免疫保护作用, 缓解由于肠炎沙门氏菌感染造成的炎症反应; 高通量测序分析肠道微生物群落多样性的结果显示丁酸梭菌促进有益菌在肠道中的定殖, 增加肠道微生物多样性, 建立稳定健康肠道菌群。

## 4 结论

本试验结果表明, 丁酸梭菌可以提高小鼠免疫力, 缓解由于沙门氏菌感染引起的炎症反应, 增加肠道微生物多样性, 调节肠道菌群结构。



## 参考文献

- [1] Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, 336(6086): 1268–1273.
- [2] Vo ATT, Van Duijkeren E, Fluit AC, Heck MEOC, Verbruggen A, Maas HME, Gastra W. Distribution of *Salmonella enterica* Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Veterinary Microbiology*, 2006, 113(1/2): 153–158.
- [3] Liu C, Huang SM, Zhao LH, Zhang JY, Ji C, Ma QG. Effects of dietary supplementation with *Bacillus coagulans* on the intestinal morphology, plasma antioxidation capacity and colonization of *Salmonella* in the caecum of *S. enteritidis* infected laying hens. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(1): 69–75. (in Chinese)  
刘聪, 黄世猛, 赵丽红, 张建云, 计成, 马秋刚. 凝结芽孢杆菌对感染肠炎沙门氏菌蛋鸡肠道形态、抗氧化能力及沙门氏菌定植的影响. *中国农业大学学报*, 2019, 24(1): 69–75.
- [4] Qiang WJ, Wang Y, Lu Q, Wang Z. Effect of  $\beta$ -1,3-glucan on intestinal redox state of in chickens infected with *Salmonella enteritidis*. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46(23): 51–55. (in Chinese)  
强文军, 王莹, 路茜, 王忠.  $\beta$ -1,3-葡聚糖对肠炎沙门氏菌感染鸡肠道氧化还原状态的影响. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(23): 51–55.
- [5] Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews*, 2008, 9(2): 149–158.
- [6] Kojima K, Musch MW, Ren HY, Boone DL, Hendrickson BA, Ma A, Chang EB. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 2003, 124(5): 1395–1407.
- [7] 罗建杰. 日粮添加不同益生菌对肉仔鸡益生作用分子机制研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2013.
- [8] Yang L, Xia ST, Hu RZ, Ouyang FL, He JH. *Clostridium butyricum*: research progress on biological function and application in livestock and poultry production. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(11): 3077–3085. (in Chinese)  
杨玲, 夏嗣廷, 胡睿智, 欧阳富龙, 贺建华. 丁酸梭菌的功能性研究进展及其在畜禽生产中的应用. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(11): 3077–3085.
- [9] Liu TT, Zhang S, Deng FY, Cao GT, Chen AG, Yang CM. Effects of glutamine and *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, small intestinal morphology and microflora in weanling piglets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(6): 998–1005. (in Chinese)  
刘婷婷, 张帅, 邓斐月, 曹广添, 陈安国, 杨彩梅. 谷氨酰胺与丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、免疫功能、小肠形态和肠道菌群的影响. *动物营养学报*, 2011, 23(6): 998–1005.
- [10] Du YP, Zhou QF, Lai WY, Liang JL, Li XJ, Bi YZ. Effects of adding *Clostridium butyricum* to diets on performance of breeding hens. *Feed China*, 2010, (1): 25–26. (in Chinese)  
杜云平, 周庆丰, 赖万勇, 梁健良, 李小军, 毕英佐. 日粮中添加丁酸梭菌对种鸡生产性能的影响. *饲料广角*, 2010, (1): 25–26.
- [11] Wei RF, Li MY, Xu DM, Gao R. Establishment and phenotypic analysis of a C57BL/6 mouse model of *S. Typhimurium* infection. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2017, 27(6): 33–36, 45. (in Chinese)  
韦荣飞, 李梦媛, 徐大模, 高葶. 鼠伤寒沙门氏菌 *S. Typhimurium* 感染 C57BL/6 小鼠肠道模型的建立及表型分析. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(6): 33–36, 45.
- [12] Lu R, Wu SP, Liu XY, Xia YL, Zhang YG, Sun J. Chronic effects of a *Salmonella* type III secretion effector protein AVRA *in vivo*. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10505.
- [13] Liao XD, Ma G, Cai J, Fu Y, Yan XY, Wei XB, Zhang RJ. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers. *Poultry Science*, 2015, 94(4): 662–667.
- [14] 赵旭. 丁酸梭菌对肉鸡脂肪代谢的影响及其机理研究. 中国农业大学博士学位论文, 2014.
- [15] Geng ZY, Shi LX, Liu P, Lu WQ. Effects of dietary supplemented with *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidant capacity and immune function in weaned piglets. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(8): 1651–1660. (in Chinese)  
耿正颖, 史林鑫, 刘萍, 陆文清. 日粮中添加丁酸梭菌对断

- 奶仔猪生长性能、抗氧化能力和免疫功能的影响. 畜牧兽医学报, 2018, 49(8): 1651–1660.
- [16] Wang SS, Liu LY, Wu GX, Tang H, Liu XY, Zhang H, Lu SH, Li XY. The effect of *Salmonella enteritidis* inoculation on immune organ index of Jining Bairi Chicken. *Poultry Science*, 2015, (12): 12–17. (in Chinese)  
王莎莎, 刘丽英, 吴桂贤, 唐辉, 刘肖意, 张浩, 陆诗海, 李显耀. 肠炎沙门氏菌接种对雏鸡免疫器官指数的影响. 家禽科学, 2015, (12): 12–17.
- [17] 付爱坤. 解淀粉芽孢杆菌影响小鼠巨噬细胞极化及其抵抗沙门氏菌感染的机理研究. 浙江大学博士学位论文, 2017.
- [18] 李建超. 鸡肠炎沙门氏菌感染早期免疫指标变化及全基因组甲基化研究. 扬州大学硕士学位论文, 2014.
- [19] Chen CY, Tsen HY, Lin CL, Yu B, Chen CS. Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks. *Poultry Science*, 2012, 91(9): 2139–2147.
- [20] Feng JC, Wang LH, Zhou LX, Yang X, Zhao X. Using *in vitro* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147630.
- [21] Liu LY, Zuo HN, Yang WF. Experimental study on combination of lactobacilli strain and clostridium butyricum strain in treatment of acute ulcerative colitis in mice. *Practical Preventive Medicine*, 2009, 16(4): 1255–1258. (in Chinese)  
刘凌云, 左和宁, 杨伟峰. 联用乳酸杆菌和丁酸梭菌治疗小鼠溃疡性结肠炎的实验研究. 实用预防医学, 2009, 16(4): 1255–1258.
- [22] Yang TR, Wang S, Huang S, Shang LJ, Yu HT, Zeng XF, Qiao SY. Comparative study on immunomodulatory effect of antimicrobial peptide Sublancin and *Astragalus* polysaccharide of mice. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(6): 2337–2345. (in Chinese)  
杨天任, 王帅, 黄烁, 尚丽君, 于海涛, 曾祥芳, 谯仕彦. 抗菌肽 Sublancin 与黄芪多糖对小鼠免疫调节作用的比较研究. 动物营养学报, 2018, 30(6): 2337–2345.
- [23] 高权新. 丁酸梭菌与肠道上皮细胞互作的分子机制的研究. 浙江大学博士学位论文, 2012.
- [24] 赵效南. 肠炎沙门氏菌致病机制及丁酸梭菌对其拮抗作用的探究. 山东农业大学博士学位论文, 2018.
- [25] Abasht B, Kaiser MG, Lamont SJ. Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 123(3/4): 314–323.
- [26] Wang SS, Wang JK, Liu JX. Regulation of host immune system by gut microbiota and its possible mechanisms. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(2): 375–382. (in Chinese)  
王珊珊, 王佳莹, 刘建新. 肠道微生物对宿主免疫系统的调节及其可能机制. 动物营养学报, 2015, 27(2): 375–382.
- [27] Hildebrand F, Nguyen TLA, Brinkman B, Yunta RG, Cauwe B, Vandenebeele P, Liston A, Raes J. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biology*, 2013, 14(1): R4.
- [28] Fan Y, Ye HB, Wang XL, Li L, Wang YQ, Diao J. Effects of *Clostridium butyricum* and *Bacillus coagulans* on growth performance, hepatic function and intestinal microbiota in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2019, 34(2): 198–203. (in Chinese)  
樊英, 叶海斌, 王晓璐, 李乐, 王勇强, 刁菁. 丁酸梭菌和凝结芽孢杆菌对虹鳟生长性能、肝功能及肠道菌群的影响. 大连海洋大学学报, 2019, 34(2): 198–203.
- [29] Zhao X, Guo YM, Guo SS, Tan JZ. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6477–6488.

# Effect of *Clostridium butyricum* on the pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in SPF mice

Lulu Cui<sup>1</sup>, Zijing Ju<sup>1</sup>, Yi Yang<sup>2</sup>, Fuyou Zhang<sup>1</sup>, Qingxiao Liu<sup>1</sup>, Guoqiang Zhu<sup>2</sup>, Shuhong Sun<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

<sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

<sup>3</sup> Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Tai'an 271000, Shandong Province, China

<sup>4</sup> Shandong Provincial Engineering Technology Research Center of Animal Disease Control and Prevention, Tai'an 271000, Shandong Province, China

**Abstract: [Objective]** To explore the effect of *Clostridium butyricum* on pathogenicity and protection mechanism of *Salmonella enteritidis* (CVCC3377) in SPF mice. **[Methods]** Mice were sacrificed on the 6th day post infection and samples of liver, spleen and cecum samples were collected. The pathological changes of liver and spleen tissue were detected by H.E staining, the expression levels of TLR4 and MyD88 protein in spleen tissue were detected by immunohistochemistry, and the expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in cecum tissue were detected by fluorescence quantitative PCR. The effect on intestinal flora was analyzed by high-throughput sequencing. **[Results]** *C. butyricum* could alleviate the weight loss of mice caused by *Salmonella enteritidis* infection. The results of HE staining show that *Clostridium butyricum* could alleviate the tissue damaged by *Salmonella enteritidis* infection. The results of immunohistochemistry show that *Clostridium butyricum* could decrease the expression levels of TLR4 and MyD88 protein in liver and spleen tissue cells. Fluorescence quantitative PCR shows that *Salmonella enteritidis* could significantly increase TNF- $\alpha$  in cecal tissue ( $P < 0.05$ ). The expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 decreased by feeding *Clostridium butyricum*. The results of high throughput sequencing show that the Chao 1 index, ACE index and Shannon index of *Clostridium butyricum* treatment group were higher than those of the control group and *Salmonella* infection group ( $P > 0.05$ ). *Clostridium butyricum* could significantly reduce the proportion of Actinobacteria and Verrucomicrobia in intestinal microorganisms ( $P < 0.05$ ). In addition, the relative abundance of Lactobacillus in intestinal microbial community increased by bacteria ( $P > 0.05$ ). **[Conclusion]** *Clostridium butyricum* could improve the immunity of mice, alleviate the inflammatory reaction caused by *Salmonella* infection, increase intestinal microflora diversity and regulate intestinal flora structure.

**Keywords:** *Clostridium butyricum*, *Salmonella enteritidis*, SPF mice, high-throughput sequencing, intestinal flora

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key National Research Developed Projects During the 13th Five Year Program (2016YFD0501608, 2017YFD0500105), by the Major Agricultural Application Technology Innovation Projects in Shandong Province (SD2019XM009) and by the "Double First Class" Plan of Shandong Province (SYL2017YSTD11)

\*Corresponding author. E-mail: sunshuhong@sda.edu.cn

Received: 17 July 2019; Revised: 28 November 2019; Published online: 20 December 2019