



百里酚和香芹酚改变肠道微生物组成抑制羔羊腹泻的作用研究

徐养滨¹, 张婷¹, 杨雨鑫¹, 陈玉林¹, 王小龙¹, 张科^{1*}, 陈宁^{2*}

1 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100

2 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 新疆 石河子 832000

徐养滨, 张婷, 杨雨鑫, 陈玉林, 王小龙, 张科, 陈宁. 百里酚和香芹酚改变肠道微生物组成抑制羔羊腹泻的作用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1128-1140.

XU Yangbin, ZHANG Ting, YANG Yuxin, CHEN Yulin, WANG Xiaolong, ZHANG Ke, CHEN Ning. Mechanism of thymol and carvacrol altering gut microbial composition to inhibit diarrhea in lambs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1128-1140.

摘要:【目的】本试验研究百里酚和香芹酚对滩羊羔羊腹泻、肠道短链脂肪酸和微生物组成的影响, 旨在为利用植物提取物手段治疗羔羊腹泻提供可用的添加剂和理论基础。【方法】本研究选择腹泻发病时间为 2–3 d 的 10 只腹泻羔羊, 随机分为 2 组, 分为腹泻羔羊组(CON 组)和百里酚和香芹酚处理组(SCAT 组), 试验期间 SCAT 组羔羊补充 200 mg/只/d 的百里酚和香芹酚 1:1 混合品, 处理时间为 7 d。【结果】百里酚和香芹酚处理能够显著提高腹泻羔羊日增重, 降低羔羊腹泻指数和腹泻率($P<0.05$), 降低血清促炎因子表达水平($P<0.05$), 提高肠道短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)丁酸浓度($P<0.05$); 同时百里酚和香芹酚能够改变腹泻羔羊肠道微生物组成, 提高肠道中双歧杆菌(*Bifidobacteriaceae*)和阿克曼氏菌(*Akkermansiaceae*)的相对丰度, 降低肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)相关菌的相对丰度。【结论】百里酚和香芹酚能够提高肠道有益菌相对丰度和有益代谢物丁酸的浓度, 降低致病菌相对丰度, 从而有效抑制羔羊腹泻, 可作为新型替代抗生素产品研究和开发。

关键词: 滩羊; 羔羊腹泻; 百里酚; 香芹酚; 肠道微生物; 短链脂肪酸

资助项目: 兵团重点领域科技攻关计划(2020AB016); 兵团科技创新人才计划(2021CB049); 国家绒毛用羊产业技术体系(CARS-39-12)

This work was supported by the Key Science and Technology Projects of Xinjiang (2020AB016), the Science and Technology Innovation Projects of Xinjiang (2021CB049), and the Agricultural Technical System of China (CARS-39-12).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Ke, kezhang@nwafu.edu.cn; CHEN Ning, 53499850@qq.com

Received: 2022-07-18; Accepted: 2022-09-29; Published online: 2022-10-10

Mechanism of thymol and carvacrol altering gut microbial composition to inhibit diarrhea in lambs

XU Yangbin¹, ZHANG Ting¹, YANG Yuxin¹, CHEN Yulin¹, WANG Xiaolong¹,
ZHANG Ke^{1*}, CHEN Ning^{2*}

1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of thymol and carvacrol on diarrhea, short-chain fatty acids (SCFA), and microbial composition of Tan lambs, thus to provide plant extracts-derived additives for the treatment of lamb diarrhea, and lay a theoretical basis for the treatment. [Methods] A total of ten diarrhea lambs (diarrhea had lasted 2–3 days) were randomized into diarrhea group (CON) and thymol and carvacrol group (SCAT). The lambs in the SCAT group were supplemented with a mixture of thymol and carvacrol (1:1) at 200 mg/d for 7 days. [Results] Thymol and carvacrol improved the daily weight gain, decreased the diarrhea index, diarrhea rate ($P < 0.05$), and concentration of serum pro-inflammatory factors ($P < 0.05$), and increased the concentration of intestinal butyric acid ($P < 0.05$) of the diarrhea lambs. Thymol and carvacrol also changed the gut microbial composition of diarrhea lambs, raised the relative abundance of *Bifidobacteriaceae* and *Akkermansiaceae*, and decreased the relative abundance of *Enterobacteriaceae*. [Conclusion] Thymol and carvacrol can improve the relative abundance of gut probiotics and butyric acid concentration and reduce the relative abundance of pathogenic bacteria, therefore, it can effectively inhibit lamb diarrhea, and can be used as a new type of anti-diarrhea product for research and development.

Keywords: Tan lambs; lamb diarrhea; thymol; carvacrol; gut microbiota; short-chain fatty acids

羔羊细菌性腹泻是一种常见且多发的流行性疫病,具有发病率高、致死率高的特点,腹泻羔羊治愈后,与同龄健康羔羊相比,生长发育迟滞,严重影响羊产业绿色健康、可持续发展^[1-3]。传统的养殖中一般使用抗生素进行羔羊腹泻的防治,但抗生素过度使用造成了抗生素残留和超级耐药菌等系列问题,严重威胁食品安全和公共卫生安全^[4-5]。因此寻找和开发可替代抗生素且绿色健康的添加剂产品是目前畜牧养殖产业亟待解决的问题。

百里酚和香芹酚是植物提取物牛至精油的主效成分,具有抗炎^[6]、抗氧化^[7]及体外抑菌^[8-9]等功能。研究表明,百里酚和香芹酚能够显著提

高绵羊生长性能,提高胴体肉品质,且其效果显著优于莫能菌素的作用效果^[10]。百里酚和香芹酚也可显著提高致病性大肠杆菌感染的断奶仔猪生长性能,降低仔猪肠道损伤^[11];百里酚和香芹酚的添加可显著降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肉仔鸡脾脏中促炎因子 *TNF- α* 、*TLR4* 等基因的表达水平,提高仔鸡肠道黏膜完整性^[12]。体外试验表明,百里酚可抑制人腹膜间皮细胞 Toll 样受体 4 (*TLR4*)的表达,进而抑制其介导的核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)信号通路来缓解炎症^[13]。分析其抑菌机理发现,百里酚和香芹酚协同作用能

够使大肠杆菌细菌质膜的通透性增加,细菌胞质外渗,造成细菌质膜内外电位失衡,从而导致致病性大肠杆菌的死亡^[14];当香芹酚进入细菌细胞质时,香芹酚羟基氧上的离域孤电子对可以形成一个 $p-\pi$ 结构与其苯环共轭,促进酚羟基上的质子释放到细菌细胞质中,从而增加细菌细胞质的酸性,此时细菌为维持胞质的中性环境,将过量的质子转运出细胞,此过程需要消耗大量 ATP,最终耗尽细菌内 ATP 致其死亡,因此,细胞内 ATP 的耗竭是香芹酚的重要抗菌机制^[15-16]。目前,百里酚和香芹酚应用于反刍动物的研究,特别是应用于反刍动物腹泻的研究较少,其在反刍动物肠道中抗炎的机理尚不明确。

基于此,本研究通过在腹泻滩羊羔羊日粮中添加百里酚和香芹酚,研究百里酚和香芹酚对腹泻羔羊生长性能、腹泻指数、血清炎症因子水平、粪便短链脂肪酸浓度和肠道微生物组成的影响,旨在阐明百里酚和香芹酚对羔羊腹泻作用的初步机制,为百里酚和香芹酚应用于调节反刍动物肠道健康提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

试验所用的百里酚和香芹酚由 Novus 公司赠送;测定血清中的促炎因子浓度所用的 ELISA 试剂盒购买自凡科维公司。

1.2 试验设计

本试验选取吴忠市红寺堡区天源良种羊繁育养殖有限公司的滩羊共 10 只。所选滩羊遗传背景一致,年龄均为 3–4 月龄,均具有 2–3 d 的

腹泻情况,粪便检测为稀便。所选羔羊在 3 个月之内无抗生素、益生菌和药物使用史,试验前将 10 只腹泻滩羊按照每组平均体重相近原则分为 2 组,每组 5 只,试验组(SCAT)除基础日粮外,采用百里酚和香芹酚的 1:1 混合品饲喂,饲喂剂量每天 200 mg^[10],处理 7 d,试验滩羊采食的基础日粮见表 1。

1.3 样品采集与测定

腹泻指数评分标准:以滩羊粪便形态、肛门周围皮肤洁净程度及炎症情况为评价指标,按照表 2 分为 0、1、2、3 等级将羔羊腹泻进行量化^[17]。

表 1 滩羊的基础日粮组成和营养水平

Table 1 Basal diet composition and nutrient level of Tan lambs

Items	Content
Compositions (%)	
Corn	32.60
Bean pulp	7.40
Millet straw	25.68
Medicago	29.32
Premix ¹	5.00
Amount	100.00
Nutrient level	
Dry matter (%)	88.31
Digestive energy (MJ/kg) ²	8.96
Crude protein (%)	11.20
Crude fat (%)	1.97
Crude fibre (%)	21.97
Crude ash (%)	5.40
Ca (%)	1.24
P (%)	0.40

¹: Premix is provided per kilogram of diet. VA 7500 IU, VD 1050 IU, VE 1000 IU, Fe 5.5 g, Cu 0.5 g, Mn 5 g, Zn 4 g, Se 32.5 mg, I 100 mg, Co 32.5 mg. ²: Digestive energy calculated value.

表 2 羔羊腹泻指数评分标准

Table 2 Scoring criteria for diarrhea index of lambs

Score	Diarrhea	Skin cleanliness around anus	Inflammation
0	Well-formed stools	Clean and pollution-free	No inflammation
1	Soft and pasty stools	Relatively clean and pollution-free	Slight inflammation
2	Loose stools	Fecal contamination around anus	Moderate inflammation and edema
3	Watery stools	Fecal contamination around the anus and inside the tail	Severe inflammation, edema and ulcers

血清炎症因子浓度检测: 试验第 0、4、7 天时, 通过羊颈部静脉采集血液, 4 000 r/min 离心收集血清, 血清中炎症因子检测利用 ELISA 试剂盒进行, 严格按照试剂盒说明书方法测定。

短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)测定: 称取 0.3 g 粪便于离心管中, 加入 1 mL 双蒸水, 60 Hz 组织研磨, 4 °C 静置过夜; 13 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液 800 μ L 至离心管中, 加入 400 μ L 25% 偏磷酸溶液, 涡旋振荡混匀, 4 °C 离心 15 min, 弃去沉淀, 吸取上清液 1 mL 于离心管中, 加入 200 μ L 巴豆酸溶液, 混匀后 4 °C 静置 0.5–1 h, 将静置后的上清液使用注射器吸取, 过 0.45 μ m 滤膜转移至气相瓶中, 4 °C 保存, 等待上机。气相色谱仪为安捷伦 7820A, 色谱柱为 AE-FFAP, 进样量 1 μ L, 进样口温度 250 °C, 氢气(H₂)流量 30 mL/min, 分流比为 20:1。

16S rRNA 基因测序: 试验第 0、4、7 天时, 通过直肠采集粪便, 保存于冻存管中, 储存于 -80 °C 超低温冰箱中备用。取适量样品解冻后使用 E.Z.N.A. stool DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA) 试剂盒提取粪便微生物总 DNA, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 质量, 使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。使用 FASTP 软件(version 0.20.0) 对原始测序序列进行质控, 使用 FLASH 软件 (version 1.2.7) 进行拼接^[18], 拼接条件如下: (1) 设置 50 bp 的窗口, 过滤质控后 50 bp 以下的 reads; (2) 根据 PE reads 之间的重叠(overlap)关系, 将成对 reads 拼接成 overlap 长度 $\geq$ 10 bp 的序列; (3) 设置 overlap 区错配率阈值为 0.2, 剔除不合格序列;

(4) 根据序列及引物区分样品和序列方向, 序列和引物错配率阈值分别设置为 0 和 2。使用 QIIME2 (v2020.2) 软件中的 DADA2 插件对质控拼接之后的优化序列进行降噪处理, 通过上海美吉生物医药科技有限公司的多样性云分析平台(cloud.majorbio.com) 进行后续的数据分析。

1.4 数据统计分析

动物生长性能、血清免疫指标和短链脂肪酸数据统计分析采用软件 SPSS 23.0 进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 组间多重比较显著性检验选择 Duncan's 方法, 结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 以 $P<0.05$ 作为差异显著判断标准。微生物原始数据经优化降噪后使用 QIIME2 (v2020.2) 软件中 bayes 方法对 ASV 进行分类学注释, 使用数据库 silva138/16s_bacteria 进行序列比对, 默认置信度阈值为 0.7。对各样本的数据以样本中最少数据量为标准进行均一化处理, 后续多样性分析均基于均一化后的数据进行。使用软件 mothur-1.30 计算 Chao 指数和绘制稀释性曲线, 并进行 α 多样性指数组间差异分析。使用 R 软件 vegan (3.3.1) 进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)。线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] 使用软件 R-3.3.1 进行, 选择 LDA 阈值为 3.5。图表绘制使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 百里酚和香芹酚对腹泻滩羊生长性能和腹泻的影响

研究发现, 试验 7 d 内 SCAT 组滩羊的平均日增重显著高于 CON 组($P<0.05$) (图 1A)。从第 4 天开始, SCAT 组的腹泻指数与腹泻率显著低于 CON 组($P<0.05$) (图 1B、1C)。

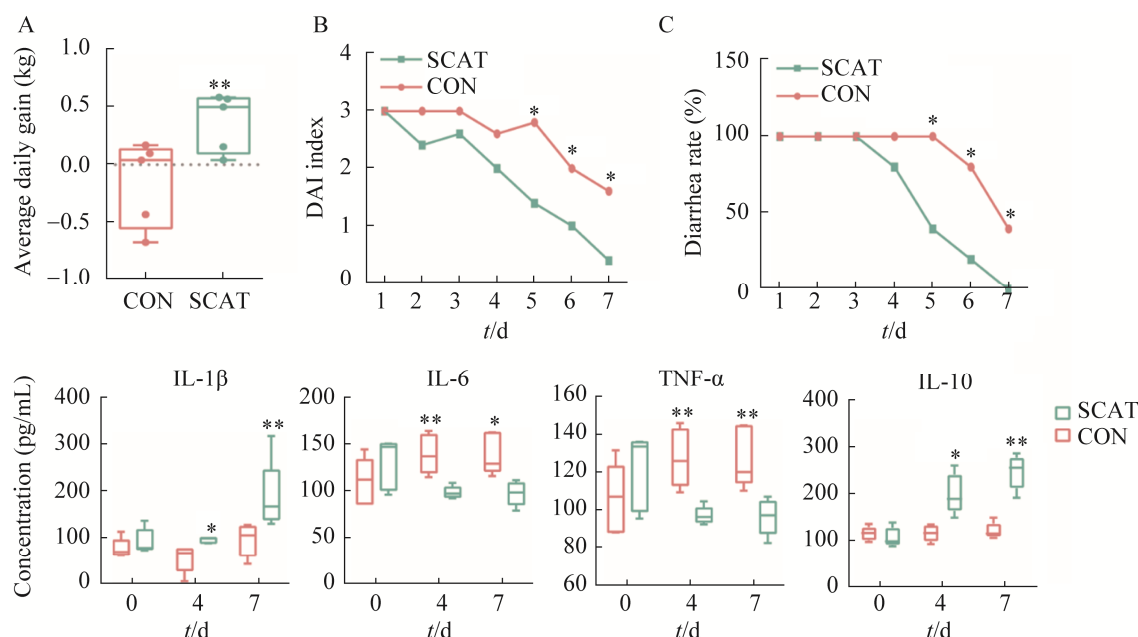


图1 百里酚和香芹酚对腹泻羔羊生长性状及炎症因子表达的影响 A: 平均日增重. B: 腹泻指数. C: 腹泻率. D: 血清促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和抑炎因子 IL-10 表达水平

Figure 1 Effects of thymol and carvacrol on growth traits and the concentration of inflammatory factors in lambs. A: Average daily gain. B: Diarrhea index. C: Diarrhea rate. D: The concentration of pro-inflammatory cytokines of TNF- α , IL-6, IL-1 β and anti-inflammatory cytokines of IL-10 in serum. Data represent mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

检测滩羊血清中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的浓度水平发现, 在试验起始时 2 组滩羊血清中促炎因子浓度差异不显著($P > 0.05$), 经过百里酚和香芹酚处理 4 d 后, SCAT 组滩羊血清中 IL-1 β 浓度显著升高, IL-6 和 TNF- α 浓度显著降低($P < 0.05$), 处理的第 7 天, CON 组血清中 IL-6 和 TNF- α 浓度显著高于 SCAT 组($P < 0.05$). 同时分析血清中抑炎因子 IL-10 的浓度发现, 试验起始时 2 组滩羊血清中 IL-10 浓度差异不显著($P > 0.05$), 经过百里酚和香芹酚的处理, SCAT 组滩羊血清中 IL-10 浓度显著高于 CON 组($P < 0.05$).

进一步比较 2 组羔羊的腹泻情况, 如图 2 所示, CON 组稀便情况更为严重, 试验 7 d 中持续性腹泻, 肛门处稀便情况肉眼可见, SCAT 组在百里酚和香芹酚饲喂的第 3 天时腹泻现象

明显好转, 至试验第 7 天时 SCAT 组滩羊在肛门处稀便情况肉眼观察已消失, 恢复效果显著, 但 2 组羔羊恢复速度的快慢仍具有个体差异. 综上所述, 上述结果表明百里酚和香芹酚可有效降低滩羊羔羊的腹泻率。

2.2 百里酚和香芹酚处理对羔羊肠道短链脂肪酸浓度的影响

为评估百里酚和香芹酚对腹泻滩羊肠道中短链脂肪酸(SCFA)浓度的影响, 本研究使用气相色谱法测定试验第 0、4、7 天滩羊粪便的 SCFA 浓度, 结果见图 3. 结果表明, 试验第 4 天和第 7 天, 肠道中乙酸、丙酸、异丁酸、异戊酸、戊酸的浓度 2 组间差异不显著($P > 0.05$), 与 CON 组相比, SCAT 组显著提高了第 4 天和第 7 天粪便中丁酸的浓度($P < 0.05$).

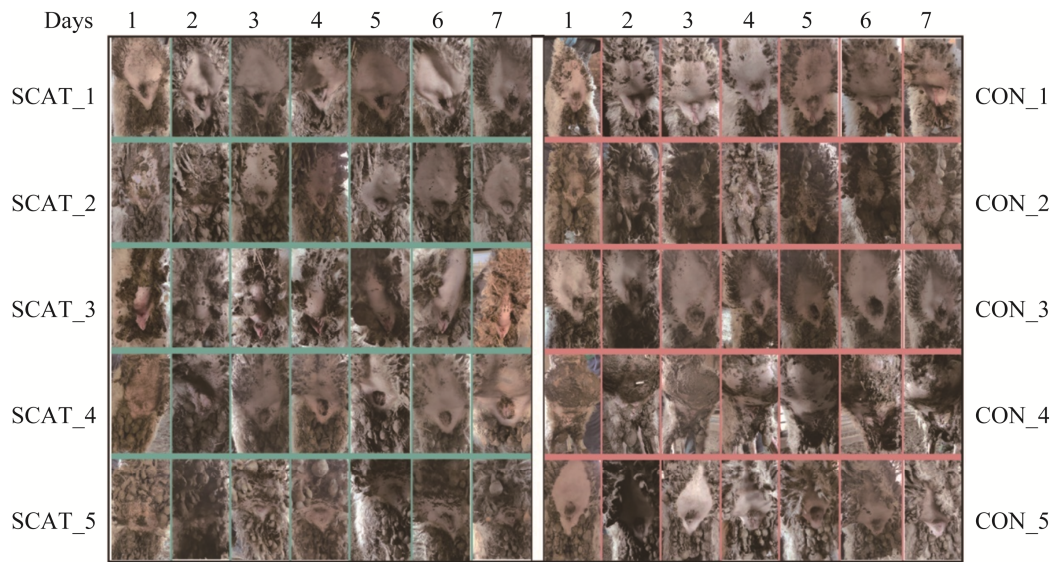


图 2 滩羊羔羊腹泻情况

Figure 2 Lamb diarrhea occurred in this study.

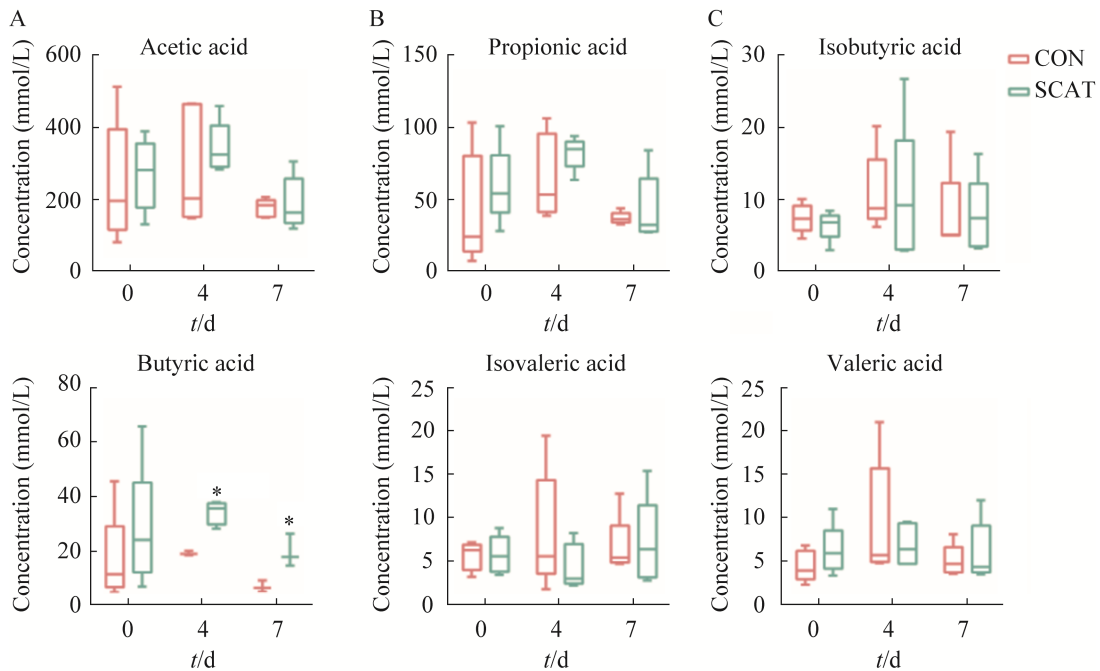


图 3 百里酚和香芹酚对肠道短链脂肪酸浓度变化的影响

Figure 3 Effects of thymol and carvacrol on changes in SCFA concentrations. Data represent mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

2.3 百里酚和香芹酚对羔羊肠道微生物组成的影响

为评估百里酚和香芹酚对腹泻滩羊肠道微生物组成的影响,本研究对 10 只腹泻滩羊 3 个时间点的 30 个粪便样品进行扩增子测序。共产生

了 1 686 046 个 reads, 平均每个样品产生 56 201 个 reads。利用稀释性曲线对数据量的深度进行评估发现,按照每个样本 24 000 条 reads 进行抽平后其物种丰富度完全达到平台期,见图 4A。分析 3 个时间点 2 组之间的 α 多样性发现,每个时

间点 2 组之间差异不显著($P>0.05$), 见图 4B。利用 Binary_Euclidean 距离算法进行主坐标分析

(PCoA)发现, 与 CON 组相比, SCAT 组羔羊肠道微生物区系组成发生显著变化(ANOSIM, $R=0.084$,

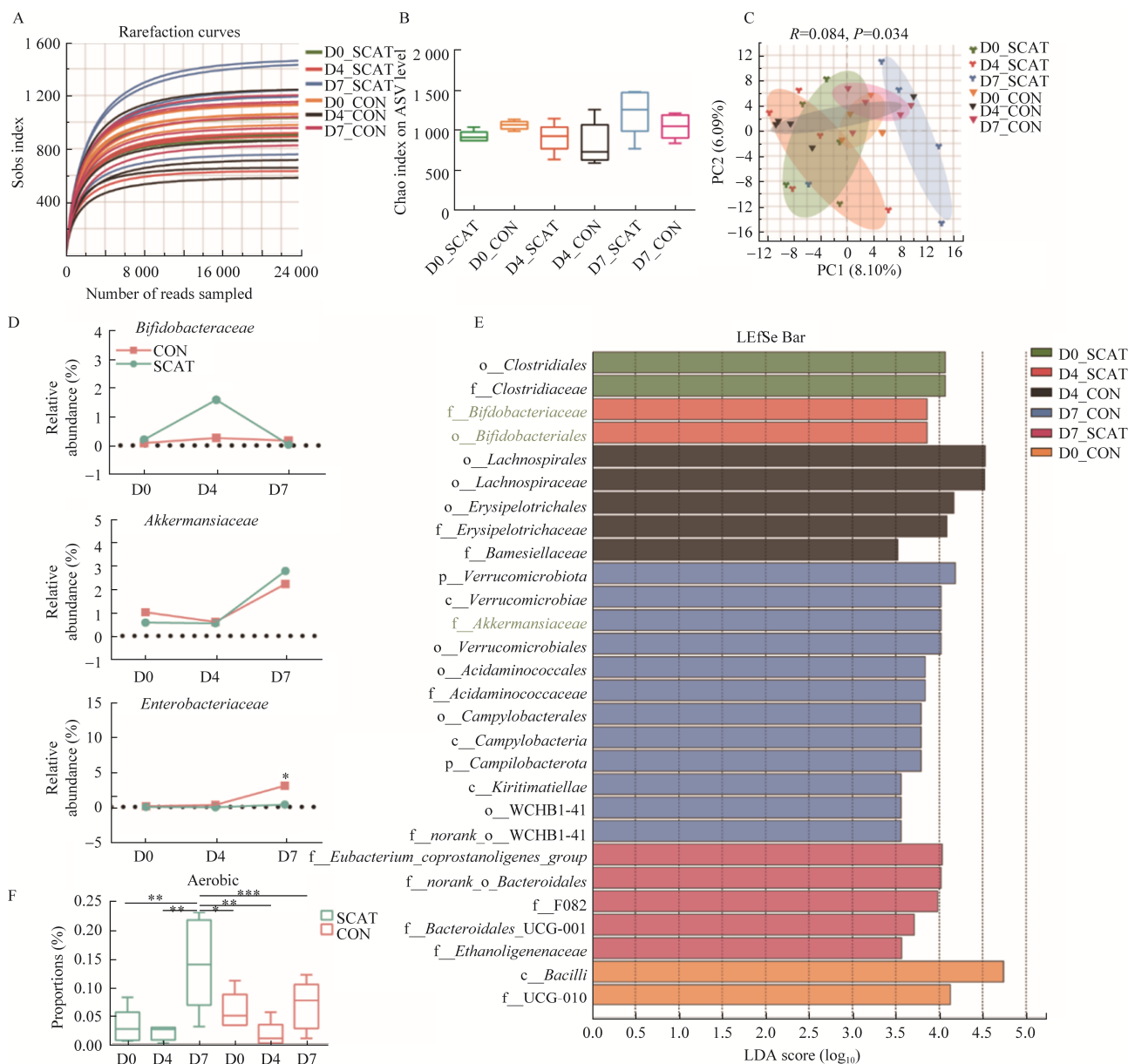


图 4 百里酚和香芹酚对滩羊肠道微生物组成和 BugBase 表型预测的影响 A: 稀释性曲线. B: 基于 ASV 水平的群落 α 多样性比较. C: 基于 ASV 水平的 PCoA 分析. D: 主要微生物基于科水平的相对丰度. E: LefSe 线性判别分析(LDA>3.5). F: 微生物群落 BugBase 表型预测

Figure 4 Effects of thymol and carvacrol on the microbiota composition, and BugBase phenotype of microbiota in Tan lambs. A: Rarefaction analysis based on sobs index. B: Comparison of alpha diversity of microbial communities at the ASV level. C: The PCoA analysis based on ASV level. D: The relative abundance of microbes in family level. E: Linear discriminant analysis of LefSe (LDA>3.5). F: Prediction of BugBase phenotype of microbiota. Data represent mean $\pm$ SEM. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

$P=0.034$), SCAT_D7 组羔羊肠道微生物组成与 SCAT_D0 组及 SCAT_D4 组羔羊的肠道微生物组成差异显著, 见图 4C。

在门水平上, 滩羊肠道中的优势菌门为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、毛螺菌门(*Spirochaetota*)、疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)和变形菌门(*Proteobacteria*), 比较百里酚和香芹酚在不同日龄对滩羊肠道微生物组成的影响发现, 门水平在 3 各时间点, 2 组差异不显著($P>0.05$), 见表 3。在科水平上分析滩羊肠道微生物组成发现, 与 CON 组相比, SCAT 组双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)的相对丰度在试验第 4 天显著升高, 第 7 天时两组间差异不显著; CON 组肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)相对丰度试验处理第 7 天时显著升高, 结果见图 4D。进一步利用 LEfSe 分析肠道差异菌群发现, 双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)是第 4 天 SCAT 组的代表性微生物, 第 7 天 SCAT 组的代表性微生物主要有阿克曼氏菌(*Akkermansiaceae*)、氨基酸球菌(*Acidaminococcaceae*)和疣微菌门(*Verrucomicrobiota*), 同时第 7 天时 CON 组代表性微生物主要为真杆菌属(*Eubacterium_coprostanoligenes_group*), 结果见图 4E。利用 BugBase 表型预测软件对肠道微生物的表型分析发现, SCAT 组第 7 天时肠道中好氧性微生物

的相对丰度显著($P<0.05$)增加, 结果见图 4F。综上所述, 百里酚和香芹酚能够提高羔羊肠道中有益菌的相对丰度, 抑制致病菌的定殖, 进一步抑制羔羊腹泻的发生。

3 讨论

本试验系统研究了百里酚和香芹酚影响肠道微生物组成抑制羔羊腹泻的作用机制, 初步阐明了百里酚和香芹酚协同抗炎的益生功能。前期研究发现, 百里酚和香芹酚作为替代抗生素饲料添加剂饲喂肉鸡时, 能够显著提高其体重增重和饲料转化率, 显著降低肠道中食糜黏度和血清总胆固醇浓度^[19]; 日粮中添加百里酚和香芹酚可显著提高仔猪的体重、平均日增重和采食量, 提高仔猪对氨基酸的利用率, 进而促进断奶仔猪的生长, 且香芹酚能够显著减少猪粪便中大肠杆菌的排放数量^[20-21]; 同时在荷斯坦奶牛日粮中添加牛至精油(主效成分为百里酚和香芹酚)能够显著提高其背最长肌中不饱和脂肪酸含量, 调节饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比值, 改善牛肉的氧化稳定性^[22]; 百里酚和香芹酚能够显著提高绵羊对干物质和粗蛋白质的表观消化率, 提高瘤胃中总挥发性脂肪酸(total volatile fatty acids, TVFA)的浓度和瘤胃纤维素降解菌的数量^[23]。日

表 3 百里酚和香芹酚对滩羊肠道门水平微生物相对丰度的影响

Table 3 The relative abundance of gut microbiota at phylum level

Microbiota	D0_CAT (%)	D0_CON (%)	D4_CAT (%)	D4_CON (%)	D7_CAT (%)	D7_CON (%)	SEM	P
<i>Firmicutes</i>	62.18	62.09	56.07	58.34	57.46	54.11	1.32	0.27
<i>Bacteroidota</i>	29.33	28.67	28.79	31.20	31.73	33.00	0.73	0.65
<i>Spirochaetota</i>	5.39	3.51	9.92	4.76	2.11	2.94	1.14	0.24
<i>Verrucomicrobiota</i>	0.79	1.19	0.67	0.97	4.05	3.13	0.58	0.00
<i>Proteobacteria</i>	0.63	2.17	0.56	1.47	0.85	3.50	0.47	0.92
<i>Actinobacteriota</i>	0.31	0.64	1.68	1.17	0.39	0.40	0.22	0.59
<i>Patescibacteria</i>	0.69	0.72	0.99	0.67	0.49	0.41	0.08	0.22
<i>Campilobacterota</i>	0.25	0.35	0.09	0.14	1.17	0.84	0.18	0.03
<i>Fibrobacterota</i>	0.09	0.30	0.44	0.65	0.45	0.81	0.10	0.90
<i>Desulfobacterota</i>	0.23	0.20	0.09	0.24	0.52	0.51	0.07	0.00

SEM: Standard error of the means.

粮中添加牛至精油也可提高山羊瘤胃和肠道组织中淋巴细胞数,提高机体免疫性能^[24],结合本研究结果表明,百里酚和香芹酚在日粮中的添加可显著降低滩羊 DAI 指数和腹泻率,改善羔羊腹泻,恢复羔羊自身的消化吸收功能,进而提高羔羊日增重。

前期研究表明,在体外条件下,百里酚和香芹酚能够通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路、降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达进而抑制结直肠癌细胞 HCT116 和 LoVo 的增殖、侵袭^[25-26]。百里酚可抑制人腹膜间皮细胞 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达,抑制其介导的 NF- κ B 信号通路来缓解炎症^[13]。同样在体外,百里酚和香芹酚具有广谱的抗菌特性且活性较强,0.25 mg/ml 即可完全抑制金黄色葡萄球菌的生长^[27];0.29 mg/ml 即对致病性真菌(如黄曲霉病菌)的孢子萌发具有较强毒性^[27-28];且 0.2 mg/ml 浓度时百里酚和香芹酚可通过损伤细菌细胞膜的完整性抑制阪崎克罗诺杆菌的生长^[29]。百里酚和香芹酚可通过提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的表达降低小鼠氧化应激,降低促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的表达抑制肠道炎症,并可显著降低结肠炎症向结肠癌转变的发生率^[30-31]。本研究结果表明百里酚和香芹酚能够降低血清中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度,提高抑炎因子 IL-10 的浓度,从而抑制炎症的发生。

肠道微生物产生的 SCFAs 可提供动物肠道细胞所需的大部分能量,多项研究证明 SCFAs 具有抑制肠道炎症的作用。日粮中添加百里酚和香芹酚可显著提高绵羊瘤胃内乙酸和丁酸的浓度,提高产琥珀酸丝状杆菌数量,促进瘤胃的微生物发酵^[23]。丁酸在肠道中能够调节巨噬细胞和杯状细胞的互作,并能够抑制肠上皮己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)表达,从而促进肠道屏障的修复,缓解肠道炎症,提高肠道免疫力^[32]。

丁酸盐能够促进 Th1 细胞产生抑炎因子 IL-10,并促进 CD4⁺T 细胞和先天淋巴细胞(ILCs)分泌 IL-22 保护肠道免受炎性损伤,维持肠道内环境的稳态^[33-34]。在肠道炎症的发生过程中,丁酸盐可通过调节中性粒细胞功能减少促炎介质及中性粒细胞胞外杀伤网络(neutrophil extracellular traps, NETs)的形成进而抑制肠道炎症^[35]。此外,研究表明丁酸盐及其他 SCFAs 在肠道中的抗炎作用主要由内源性大麻素(endocannabinoids, ECs)介导,增加肠道中 SCFA 产生菌的相对丰度,减少肠道促炎菌 *Collinsella* 的相对丰度^[28,36-37]。本研究中百里酚和香芹酚显著提高了腹泻羔羊肠道中丁酸的浓度,表明百里酚和香芹酚能够通过提高肠道中丁酸浓度发挥抑制肠道炎症、调节动物肠道稳态的作用。

肠道微生物在多种疾病发生过程中也扮演重要角色。志贺氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)是属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的革兰氏阴性菌,能够产生耐热(heat-labile enterotoxin, LT)和不耐热(heat-stable enterotoxin, ST)肠毒素释放到宿主肠道上皮细胞中,通过增加环核苷酸的合成导致上皮细胞电解质和水分流失,并在感染期间引起宿主肠道菌群失调,进而引起宿主腹泻^[38-39]。肠道菌群的失调极易导致宿主发生炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),在 IBD 的检测中,可将肠道微生物产生的代谢物作为疾病发生的生物标记进行检测,达到对疾病的检测和预防作用^[40-43]。在本研究中,百里酚和香芹酚能够显著降低肠道中肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)相关菌的相对丰度,抑制致病菌在羔羊肠道的定殖。研究表明,双歧杆菌(*Bifidobacterium*)能够通过以 IL-10 为介导促进 Treg 细胞的线粒体代谢,增强 Treg 细胞的免疫抑制功能,从而缓解小鼠结肠炎症^[44];同时双歧杆菌的外源补充能够显著改变小鼠肠道菌群的组成,提高糖降解

菌-拟杆菌(*Bacteroidetes*)的相对丰度, 并提高肠道 SCFA 的产生, 缓解小鼠肠道炎症^[45]。动物肠道中的丁酸盐能够调节肠-脑轴的反应, 而双歧杆菌可能是动物肠道中丁酸盐和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的关键产生菌^[46]。结合本研究结果表明, 百里酚和香芹酚能够显著提高肠道中双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)的相对丰度, 这也可能是肠道中丁酸浓度升高的潜在原因, 同时百里酚和香芹酚也提高了羔羊肠道中阿克曼氏菌(*Akkermansiaceae*)等益生菌的相对丰度。肠道微生物 BugBase 表型预测结果显示第 7 天 SCAT 组滩羊肠道好氧性微生物的相对丰度增加, 表明滩羊直肠好氧菌丰度增加, 而好氧菌的增加能够加速消耗肠腔中存在的氧气, 使肠道成为厌氧环境, 从而抑制好氧型致病菌的繁殖。

4 结论

日粮中添加百里酚和香芹酚可显著降低羔羊腹泻率和腹泻评分, 降低血清促炎因子表达水平, 提高抑炎因子表达水平, 同时也可提高羔羊肠道中丁酸产生菌双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)的相对丰度来提高肠道丁酸浓度, 并提高阿克曼氏菌(*Akkermansiaceae*)等益生菌的相对丰度, 抑制肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)相关菌的定殖, 进而改善羔羊肠道炎症, 恢复羔羊自身消化吸收能力, 进而提高腹泻羔羊日增重。综上所述, 百里酚和香芹酚可提高羔羊肠道益生菌相对丰度, 增加肠道丁酸的产生, 抑制羔羊腹泻的发生, 其可作为潜在的抗生素替代品进行深入研究和应用。

参考文献

- [1] JACOBSON C, LARSEN JW, BESIER RB, LLOYD JB, KAHN LP. Diarrhoea associated with gastrointestinal parasites in grazing sheep[J]. *Veterinary Parasitology*, 2020, 282: 109139.
- [2] 王燕, 滕晓晓, 杨柠芝, 李婷, 陈卓, 斯坎达尔·伊斯拉木, 王治, 祁来芳, 刘佳佳, 杨会国, 赵红琼, 姚刚. 粪菌移植法治疗非特异病原性羔羊腹泻的效果初报[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(8): 1878-1885.
WANG Y, TENG XX, YANG NZ, LI T, CHEN Z, ESKANDAR-ESLAM, WANG Z, QI LF, LIU JJ, YANG HG, ZHAO HQ, YAO G. Preliminary report of the therapeutic effect of fecal microbiota transplantation on non-specific pathogenic diarrhea in suckling lambs[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(8): 1878-1885 (in Chinese).
- [3] DUBREUIL JD, ISAACSON RE, SCHIFFERLI DM. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *EcoSal Plus*, 2016, 7(1): 10.
- [4] MANYI-LOH C, MAMPHWELI S, MEYER E, OKOH A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(4): 795.
- [5] SCHWARTZ B, VETVICKA V. Review: β -glucans as effective antibiotic alternatives in poultry[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2021, 26(12): 3560.
- [6] WANG L, ZHAO XQ, ZHU CL, XIA XJ, QIN WH, LI M, WANG TZ, CHEN SJ, XU YZ, HANG BL, SUN YW, JIANG JQ, RICHARD LP, LEI LC, ZHANG GP, HU JH. Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 203: 202-210.
- [7] 刘福鑫, 孔繁根, 王国洲, 张伟, 刘树栋, 陈赛娟, 陈宝江. 香芹酚对肉兔生长性能、养分表观消化率、肠道消化酶活性、免疫器官发育及抗氧化能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(3): 1875-1884.
LIU FX, KONG FG, WANG GZ, ZHANG W, LIU SD, CHEN SJ, CHEN BJ. Effects of carvacrol on growth performance, nutrient apparent digestibilities, intestinal digestive enzyme activities, immune organ development and antioxidant capacity of meat rabbits[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(3): 1875-1884 (in Chinese).
- [8] 胡艳芬, 江文斌, 蒋琳琳, 陈新凯, 程天印. 高百里香酚和香芹酚体外抑菌作用的研究[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(10): 107.
HU YF, JIANG WB, JIANG LL, CHEN XK, CHENG TY. Study on bacteriostasis of thymol and carvacrol *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010(10): 107 (in Chinese).

- [9] MARCHESE A, ORHAN IE, DAGLIA M, BARBIERI R, DI LORENZO A, NABAVI SF, GORTZI O, IZADI M, NABAVI SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature[J]. Food Chemistry, 2016, 210: 402-414.
- [10] 孔繁云, 吴建平, 张科, 豆思远, 李玉, 刘婷, 宫旭胤, 王建福, 雷赵民. 饲料中添加牛至精油、罗伊乳杆菌和莫能菌素对绵羊生长性能、屠宰性能、胴体性状、肉质性状及血清抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(8): 3771-3779.
- KONG FY, WU JP, ZHANG K, DOU SY, LI Y, LIU T, GONG XY, WANG JF, LEI ZM. Effects of dietary oregano essential oil, *Lactobacillus reuteri* and monensin on growth performance, slaughter performance, carcass traits and serum antioxidant indices of sheep[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(8): 3771-3779 (in Chinese).
- [11] 蒲俊宇. 苯甲酸、凝结芽孢杆菌和牛至油对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2017.
- PU JN. Effects of benzoic acid, *Bacillus coagulans* and oregano oil on growth performance and gut health in weaned piglets[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [12] 杜恩存. 百里香酚和香芹酚对肉仔鸡肠上皮屏障和免疫功能的调节作用[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016.
- DU EC. Effects of thymol and carvacrol on intestinal epithelial barrier and immune functions of broiler chickens[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [13] WANG QL, CHENG FJ, XU Y, ZHANG J, QI JJ, LIU X, WANG R. Thymol alleviates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response via downregulation of RhoA-mediated NF- κ B signalling pathway in human peritoneal mesothelial cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2018, 833: 210-220.
- [14] XU J, ZHOU F, JI BP, PEI RS, XU N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(3): 174-179.
- [15] dos SANTOS BARBOSA CR, SCHERF JR, de FREITAS TS, de MENEZES IRA, PEREIRA RLS, dos SANTOS JFS, de JESUS SSP, LOPES TP, de SOUSA SILVEIRA Z, de MORAIS OLIVEIRA-TINTINO CD, JÚNIOR JPS, COUTINHO HDM, TINTINO SR, da CUNHA FAB. Effect of carvacrol and thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2021, 53(4): 489-498.
- [16] SUNTRES ZE, COCCIMIGLIO J, ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(3): 304-318.
- [17] CASTILLO M, MARTÍN-ORÚE SM, TAYLOR-PICKARD JA, PÉREZ JF, GASA J. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function1[J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(1): 94-101.
- [18] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [19] HASHEMIPOUR H, KERMANSHAH H, GOLIAN A, KHAKSAR V. Effects of carboxy methyl cellulose and thymol+carvacrol on performance, digesta viscosity and some blood metabolites of broilers[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2014, 98(4): 672-679.
- [20] WANG YN, YANG ZP, ZHOU YF, TAN JJ, SUN HQ, SUN DF, MU YY, PENG J, WEI HK. Effects of different amino acid levels and a carvacrol-thymol blend on growth performance and intestinal health of weaned pigs[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2022, 13(1): 22.
- [21] VAREL VH. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils[J]. Current Microbiology, 2002, 44(1): 38-43.
- [22] 刘立山, 周瑞, 吴建平, 王彩莲, 宋淑珍, 韦胜, 郎侠. 日粮中添加牛至精油对牛肉脂肪酸以及血液生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2019(13): 47-51.
- LIU LS, ZHOU R, WU JP, WANG CL, SONG SZ, WEI S, LANG X. Effects of fatty acids in beef and blood biochemical index by adding oregano oil into ration[J]. China Feed, 2019(13): 47-51 (in Chinese).
- [23] 刘立山, 周瑞, 吴建平, 郎侠, 王彩莲. 香芹酚和百里香酚对绵羊养分表观消化率、瘤胃发酵特性及纤维降解菌数量的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(1): 478-487.
- LIU LS, ZHOU R, WU JP, LANG X, WANG CL. Effects of carvacrol and thymol on nutrient apparent digestibility, rumen fermentation characteristics and cellulose-decomposed bacteria counts of sheep[J].

- Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(1): 478-487 (in Chinese).
- [24] 王娟. 添加牛至精油与有机钴协同(EOC)对河西绒山羊生长代谢及消化道组织结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2018.
- WANG J. Effect of oregano essential oil and cobalt on growth metabolism and digestive tract structure of Hexi cashmere goat[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [25] 曾琼瑶. 百里酚通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抗结直肠癌作用研究[D]. 昆明: 昆明理工大学博士学位论文, 2020.
- ZENG QY. The study of thymol inhibiting colorectal cancer progression through Wnt/ β -catenin signaling pathway[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Kunming University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [26] FAN K, LI XL, CAO YG, QI HP, LI L, ZHANG QH, SUN HL. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells[J]. Anti-Cancer Drugs, 2015, 26(8): 813-823.
- [27] PREUSS HG, ECHARD B, DADGAR A, TALPUR N, MANOHAR V, ENIG M, BAGCHI D, INGRAM C. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2005, 15(4): 279-285.
- [28] 侯辉宇, 李敏, 李爽, 杜鹏强, 赵特, 周琳. 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对 16 种植物病原真菌的抑制活性[J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1362-1369.
- HOU HY, LI M, LI S, DU PQ, ZHAO T, ZHOU L. Inhibitory activities of *Origanum vulgare* essential oil, and its main components carvacrol and thymol against 16 plant pathogenic fungi[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(6): 1362-1369 (in Chinese).
- [29] 贾振宇, 孙慧慧, 郝旭昇, 康慎敏, 郑晓营, 郭都, 孙怡, 石超, 夏效东. 百里酚和香芹酚对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 79-86.
- JIA ZY, SUN HH, HAO XS, KANG SM, ZHENG XY, GUO D, SUN Y, SHI C, XIA XD. Inhibitory activity of thymol and carvacrol against *Cronobacter sakazakii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(20): 79-86 (in Chinese).
- [30] SAMPAIO LA, PINA L, SERAFINI MR, TAVARES D, GUIMARÃES AG. Antitumor effects of carvacrol and thymol: a systematic review[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 702487.
- [31] HASSAN HFH, MANSOUR AM, SALAMA SA, EL-SAYED ESM. The chemopreventive effect of thymol against dimethylhydrazine and/or high fat diet-induced colon cancer in rats: relevance to NF- κ B[J]. Life Sciences, 2021, 274: 119335.
- [32] HINRICHSSEN F, HAMM J, WESTERMANN M, SCHRÖDER L, SHIMA K, MISHRA N, WALKER A, SOMMER N, KLISCHIES K, PRASSE D, ZIMMERMANN J, KAISER S, BORDONI D, FAZIO A, MARINOS G, LAUE G, IMM S, TREMAROLI V, SOMMER F. Microbial regulation of hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis[J]. Cell Metabolism, 2021, 33(12): 2355-2366.e8.
- [33] SUN MM, WU W, CHEN L, YANG WJ, HUANG XS, MA CY, CHEN FD, XIAO Y, ZHAO Y, MA CY, YAO SX, CARPIO VH, DANN SM, ZHAO QH, LIU ZJ, CONG YZ. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3555.
- [34] YANG WJ, YU TM, HUANG XS, BILOTTA AJ, XU LQ, LU Y, SUN JR, PAN F, ZHOU J, ZHANG WB, YAO SX, MAYNARD CL, SINGH N, DANN SM, LIU ZJ, CONG YZ. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4457.
- [35] LI GF, LIN J, ZHANG C, GAO H, LU HY, GAO X, ZHU RX, LI ZT, LI MS, LIU ZJ. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1968257.
- [36] VIJAY A, KOURAKI A, GOHIR S, TURNBULL J, KELLY A, CHAPMAN V, BARRETT DA, BULSIEWICZ WJ, VALDES AM. The anti-inflammatory effect of bacterial short chain fatty acids is partially mediated by endocannabinoids[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1997559.
- [37] BARKI N, BOLOGNINI D, BÖRJESSON U, JENKINS L, RIDDELL J, HUGHES DI, ULVEN T, HUDSON BD, ULVEN ER, DEKKER N, TOBIN AB, MILLIGAN G. Chemogenetics defines a short-chain fatty acid receptor gut-brain axis[J]. eLife, 2022, 11: 73777.
- [38] REN WK, YIN J, XIAO H, CHEN S, LIU G, TAN B, LI NZ, PENG YY, LI TJ, ZENG BH, LI WX, WEI H,

- YIN ZN, WU GY, HARDWIDGE PR, YIN YL. Intestinal microbiota-derived GABA mediates interleukin-17 expression during enterotoxigenic *Escherichia coli* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 7: 685.
- [39] MA ZX, KANG M, MENG SY, TONG ZH, YOON SD, JANG Y, JEONG KC. Selective killing of shiga toxin-producing *Escherichia coli* with antibody-conjugated chitosan nanoparticles in the gastrointestinal tract[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(16): 18332-18341.
- [40] PAIK D, YAO LN, ZHANG YC, BAE SN, D'AGOSTINO GD, ZHANG MH, KIM E, FRANZOSA EA, AVILA-PACHECO J, BISANZ JE, RAKOWSKI CK, VLAMAKIS H, XAVIER RJ, TURNBAUGH PJ, LONGMAN RS, KROUT MR, CLISH CB, RASTINEJAD F, HUTTENHOWER C, HUH JR, DEVLIN AS. Human gut bacteria produce TH17-modulating bile acid metabolites[J]. *Nature*, 2022, 603(7903): 907-912.
- [41] PRATT M, FORBES JD, KNOX NC, van DOMSELAAR G, BERNSTEIN CN. Colorectal cancer screening in inflammatory bowel diseases—can characterization of GI microbiome signatures enhance neoplasia detection[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(5): 1409-1423.e1.
- [42] SERRANO-GÓMEZ G, MAYORGA L, OYARZUN I, ROCA J, BORRUEL N, CASELLAS F, VARELA E, POZUELO M, MACHIELS K, GUARNER F, VERMEIRE S, MANICHANH C. Dysbiosis and relapse-related microbiome in inflammatory bowel disease: a shotgun metagenomic approach[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 6481-6489.
- [43] RUSCONI B, GOOD M, WARNER BB. The microbiome and biomarkers for necrotizing enterocolitis: are we any closer to prediction[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2017, 189: 40-47.e2.
- [44] SUN S, LUO LJ, LIANG WH, YIN Q, GUO J, RUSH AM, LV ZB, LIANG QM, FISCHBACH MA, SONNENBURG JL, DODD D, DAVIS MM, WANG F. *Bifidobacterium* alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of T regulatory cells in the context of immune checkpoint blockade[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(44): 27509-27515.
- [45] YUNES RA, POLUEKTOVA EU, VASILEVA EV, ODORSKAYA MV, MARSOVA MV, KOVALEV GI, DANILENKO VN. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(3): 973-979.
- [46] DURANTI S, RUIZ L, LUGLI GA, TAMES H, MILANI C, MANCABELLI L, MANCINO W, LONGHI G, CARNEVALI L, SGOIFO A, MARGOLLES A, VENTURA M, RUAS-MADIEDO P, TURRONI F. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 14112.