



地衣芽孢杆菌对脂多糖诱导的仔猪肝脏炎症及抗氧化功能的影响

俞晓蓉^{1#}, 代兵^{1#}, 刘金松², 崔振川¹, 史雪艳¹, 吴艳萍¹, 张瑞强¹, 杨彩梅^{1*}

1 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江 杭州 311300

2 浙江惠嘉生物科技股份有限公司, 浙江 湖州 313307

俞晓蓉, 代兵, 刘金松, 崔振川, 史雪艳, 吴艳萍, 张瑞强, 杨彩梅. 地衣芽孢杆菌对脂多糖诱导的仔猪肝脏炎症及抗氧化功能的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1283-1294.

YU Xiaorong, DAI Bing, LIU Jinsong, CUI Zhenchuan, SHI Xueyan, WU Yanping, ZHANG Ruiqiang, YANG Caimei. Effects of *Bacillus licheniformis* on lipopolysaccharide-induced liver inflammation and antioxidant function in weaned piglets [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1283-1294.

摘要:【目的】本文旨在研究地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* HJ0135)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)应激断奶仔猪肝脏指数、炎症因子、抗氧化功能及相关基因表达的影响。

【方法】选择 24 头 28 日龄健康状况良好的三元杂交断奶仔猪(杜×长×大), 随机分成 4 个试验组: 对照组(control, CON), 500 mg/kg 地衣芽孢杆菌 HJ0135 组(BL)、LPS 应激组(LPS)以及 LPS+500 mg/kg 地衣芽孢杆菌 HJ0135 组(BL-LPS), 在试验第 28 天, 给 LPS 组和 BL-LPS 组仔猪腹腔注射 1.5 mL 浓度为 1 mg/mL 的 LPS, 给 CON 组和 BL 组仔猪注射等量生理盐水, 1.5 h 后屠宰并采样。

【结果】与 CON 组相比, BL 组血清谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)的含量降低, 肝脏的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)提升且过氧化氢酶(catalase, CAT)和总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性均增强。肝脏中促炎因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)含量减少, 同时肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量下降, 肝脏 CAT、SOD1、SOD2、谷胱甘肽过氧化物酶-1 (glutathione peroxidase, GSH-Px1)、核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、醌氧化还原酶 1 (NADPH: quinone oxidoreductase 1, NQO1)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4)、髓

资助项目: 浙江省重点研发计划(2021C02008); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2022C02043, 2022C02059); 杭州市农业和社会发展一般项目(202203B18); 浙江省重点农业企业研究院(2021Y30004)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2021C02008), the Research and Development Plan of “Spearhead” and “Leading Goose” of Zhejiang Province (2022C02043, 2022C02059), the Hangzhou General Project of Agricultural and Social Development (202203B18), and the Key Agricultural Enterprise Research Institute of Zhejiang Province (2021Y30004).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: yangcaimei2012@163.com

Received: 2022-08-03; Accepted: 2022-10-30; Published online: 2022-11-03

样分化因子(myeloid differentiation factor 88, *MyD88*)和核因子- κ B (nuclear factor kappa beta, *NF- κ B*)的基因表达水平增高;与 LPS 组相比, BL-LPS 组肝脏指数降低,血清 AST 和 ALT 的含量降低,肝脏中 CAT、GSH-Px、T-AOC 含量均提高,而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量降低。另外,肝脏炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和 TNF- α 含量减少,而白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)的含量增加,肝脏 *CAT*、*SOD2*、*GSH-Px1*、*Nrf2*、*TLR4*、*MyD88* 和 *NF- κ B* 的基因表达量提高。【结论】断奶仔猪日粮中添加地衣芽孢杆菌 HJ0135,能够激活 *Nrf2* 和 *TLR4* 相关基因表达,降低脂多糖刺激引起的肝脏损伤和炎症因子的分泌,提高断奶仔猪抗氧化能力。

关键词:地衣芽孢杆菌;脂多糖;肝脏;炎症;抗氧化

Effects of *Bacillus licheniformis* on lipopolysaccharide-induced liver inflammation and antioxidant function in weaned piglets

YU Xiaorong^{1#}, DAI Bing^{1#}, LIU Jinsong², CUI Zhenchuan¹, SHI Xueyan¹, WU Yanping¹, ZHANG Ruiqiang¹, YANG Caimei^{1*}

1 College of Animal Science and Technology and College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 Zhejiang Vegamax Value Service Co., Ltd., Huzhou 313307, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the protective effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on the liver index, inflammatory cytokines, antioxidant function, and related gene expression of the weaned piglets exposed to lipopolysaccharide (LPS). [Methods] A total of 24 healthy 28-day-old weaned piglets (Duroc \times Landrace \times Yorkshire) were randomly assigned into 4 groups: control (CON) group, 500 mg/kg *B. licheniformis* HJ0135 (BL) group, LPS stress (LPS) group, and LPS+500 mg/kg *B. licheniformis* HJ0135 (BL-LPS) group, with 6 piglets in each group. On day 28 of the experiment, the piglets in the LPS and BL-LPS groups were injected intraperitoneally with 1.5 mL of 1 mg/mL LPS, and those in the CON and BL groups with equal amounts of saline. All the piglets were sacrificed after 1.5 h. [Results] Compared with the CON group, BL treatment decreased the content of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), increased the total antioxidant capacity (T-AOC), the activities of catalase (CAT) and total superoxide dismutase (T-SOD), reduced the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver, and up-regulated the expression of *CAT*, superoxide dismutase 1 (*SOD1*), *SOD2*, glutathione peroxidase 1 (*GSH-Px1*), nuclear factor erythroid 2-related factor (*Nrf2*), NADPH: quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*), Toll-like receptor 4 (*TLR4*), myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*), and nuclear factor- κ B (*NF- κ B*) in the liver. Compared with the LPS group, BL-LPS treatment decreased liver index and serum AST and ALT levels, increased the levels of CAT, GSH-Px, and T-AOC, and reduced the content of malondialdehyde (MDA), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and TNF- α . In addition, BL-LPS treatment up-regulated the mRNA levels of *CAT*, *SOD2*, *GSH-Px1*, *Nrf2*, *TLR4*, *MyD88*, and *NF- κ B* in the liver. [Conclusion] Dietary *B. licheniformis* HJ0135 can activate the expression of

Nrf2 and TLR4-related genes, reduce liver damage and inflammatory cytokine secretion induced by lipopolysaccharide, and improve the antioxidant capacity in weaned piglets.

Keywords: *Bacillus licheniformis*; lipopolysaccharide; liver; inflammation; antioxidant

早期断奶可诱导仔猪氧化应激^[1], 并引起仔猪肠道菌群紊乱, 黏膜免疫功能受损, 采食量减少, 引起仔猪腹泻, 降低生长性能^[2]。肝脏是机体应对氧化应激^[3]、发挥免疫防御功能^[4]的重要器官。由于氧化应激, 仔猪体内产生大量活性氧, 导致抗氧化水平失衡, 线粒体功能受损, 机体抗病力降低, 使动物发病率和死亡率增加, 给养殖业造成重大经济损失^[5]。因此, 探寻一种优质、环保、无害的绿色添加剂对提高养殖业可持续发展具有重要作用。

目前, 益生菌作为一种绿色健康、提高生长性能并能够有效改善动物肠道健康的饲料添加剂已经得到了市场的广泛认可。Lan 等^[6]在饲料中添加复合益生菌(凝结芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、丁酸梭菌), 可提升断奶仔猪的生长性能、改善肠道菌群平衡, 并减少粪便有毒气体排放。Wang 等^[7]研究显示干酪乳杆菌和酿酒酵母可以提高育肥猪后期平均日增重和钙、磷表观消化率, 增加粪便中短链脂肪酸含量及产短链脂肪酸菌群的相对丰度。大肠杆菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌外膜的主要成分, 能够激活 TLR4 的表达, 是多种疾病发生的致病因素, 常用来构建炎症和氧化应激模型^[8]。Qiu 等^[9]研究显示, 枯草芽孢杆菌可以缓解 LPS 诱导的乳腺组织中促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生, 能够提高肠道中紧密连接蛋白分布的比例。Pézsza 等^[10]研究发现地衣芽孢杆菌对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌诱导的肠上皮细胞 IPEC-J2 具有显著的抗氧化和抗炎作用。目前, 关于地衣芽孢杆菌对断奶仔猪肝脏炎症及抗氧化功能的影响研究较少, 本试验旨在探究在饲料中添加地衣芽孢杆

菌 HJ0135 对脂多糖应激断奶仔猪肝脏指数、抗氧化能力、炎症因子及相关基因表达的影响, 以期地为地衣芽孢杆菌的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验室前期筛选了地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) HJ0135, 并对其鉴定并冻存, 活菌数为 1×10^9 CFU/g。本试验用大肠杆菌脂多糖 LPS 构建攻毒模型, 该大肠杆菌的血清型为 O55:B5, LPS 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 试验设计和饲养管理

试验选择 24 头体重相近、健康状况良好的 28 日龄三元杂交断奶仔猪(杜×长×大), 将其随机分为 4 个试验组, 每组 6 头仔猪, 试验期为 28 d。对照组(CON), 饲喂基础饲料; 地衣芽孢杆菌组(BL), 饲喂基础饲料+500 mg/kg 地衣芽孢杆菌 HJ0135; LPS 应激组(LPS), 饲喂基础饲料; LPS+500 mg/kg 地衣芽孢杆菌 HJ0135 组(BL-LPS), 饲喂基础饲料+500 mg/kg 地衣芽孢杆菌 HJ0135, 其中添加的地衣芽孢杆菌中含 1×10^9 CFU/g 活菌数。在试验第 28 天, 给 LPS 组和 BL-LPS 组仔猪腹腔注射 1.5 mL 浓度为 1 mg/mL 的 LPS, 给 CON 组和 BL 组仔猪注射等量生理盐水, 1.5 h 后屠宰并采样。试验在杭州正兴牧业有限公司进行, 试验期间, 不限制试验仔猪采食与饮水, 采食与饮水均可自由进行, 并且按照养殖场的常规流程和制度对场所及物品进行消毒。断奶仔猪饲喂的基础日粮组成及营养水平如表 1 所示。

表 1 基础饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrition levels of basal diets (air-dry basis)

Ingredients	Content (%)	Nutrient level	Content
Corn	55.00	DE, MJ/kg	14.17
Wheat middling	3.50	CP, %	20.35
Phospholipid	2.00	Lys, %	1.34
Whey powder	5.00	Met+Cys, %	0.77
Extruded soybean	7.30	Thr, %	0.80
Soybean meal	18.50	Ca, %	0.95
Fish meal	5.00	TP, %	0.65
Dicalcium phosphate	1.00	AP, %	0.48
Limestone	1.10		
NaCl	0.10		
L-lysine HCl	0.35		
DL-methionine	0.15		
Vitamin-Mineral premix ¹	1.00		
Total	100.00		

¹: Supplied the following per kg of diet. Vitamin A, 10 000 IU; Vitamin D₃, 400 IU; Vitamin E, 10 mg; Pantothenic acid, 15 mg; Vitamin B₆, 2 mg; Biotin, 0.3 mg; Folic acid, 3 mg; Vitamin B₁₂, 0.009 mg; Ascorbic acid, 40 mg; Fe, 150 mg; Cu, 130 mg; Mn, 60 mg; Zn, 120 mg; I, 0.3 mg; and Se, 0.25 mg.

1.3 样品采集

在第 28 天对断奶仔猪前腔静脉注射 LPS 或生理盐水, 1.5 h 后对断奶仔猪进行前腔静脉采血, 之后屠宰采集肝脏并进行称重, 剪取部分仔猪肝脏置于冻存管中, 将血清和肝脏保存于 -80 °C 冰箱, 用于后续各项指标的测定。

1.4 血清肝脏功能指标

血清肝脏功能相关指标血清谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 采用从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒检测。

1.5 肝脏抗氧化功能指标

取 0.1 g 肝脏组织样品, 加入 1 mL 生理盐水, 使用匀浆机进行充分匀浆, 12 000×g 离心 10 min, 取上清检测抗氧化指标。检测指标包括总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase,

GSH-Px) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA)。试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 各项指标按照对应的试剂盒说明书步骤进行检测。

1.6 肝脏炎症因子指标

ELISA 试剂盒检测肝脏组织样炎症因子, 包括白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)。上述指标交由南京奥青生物科技有限公司检测。

1.7 肝脏基因表达

使用 RNAiso Plus 试剂 (TaKaRa) 提取肝脏总 RNA。使用超微量分光光度计对提取的 RNA 浓度进行检测, 再使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒将 1 μ L 浓度为 500 ng/ μ L 的 RNA 反转录成 cDNA。cDNA 的合成按照试剂盒的操作说明书进行, 最后将 cDNA 储存在 -80 °C 冰箱备用。以 cDNA 为模板, 分别选取与肝脏抗氧化功能、肝脏炎症因

子和 TLR4/MyD88 信号通路相关的基因进行荧光定量 PCR, 引物见表 2。按照 TB Premix EX Taq™ II 操作说明书, 于 CFX96 荧光定量 PCR 仪进行定量检测。该反应体系如下: TB Green Premix 5 μ L, cDNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游

引物(10 μ mol/L)各 0.3 μ L, DEPC 水 3.4 μ L。试验的反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s; 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对所需基因相对表达量进行分析计算, 本次试验选择 β -actin 基因作为内参基因。

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Sequence of primers of real-time PCR

Gene names	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Accession number
<i>CAT</i>	AGCTTTGCCCTTGACAAAC	TCCATATCCGTTTCATGTGCCTGTG	NM_214301.2
<i>SOD1</i>	AAGGCCGTGTGTGTGCTGAA	GATCACCTTCAGCCAGTCCTTT	NM_001190422.1
<i>SOD2</i>	GGCCTACGTGAACAACCTGA	TGATTGATGTGGCCTCCACC	NM_214127.2
<i>GSH-Px1</i>	CCTCAAGTACGTCCGACCAG	GTGAGCATTTCGCCATTCA	NM_214201.1
<i>IL-1β</i>	ACCTGGACCTTGTTCTC	GGATTCTTCATCGGCTTC	NM_214055.1
<i>IL-6</i>	TTCAGTCCAGTCGCCTTCT	GTGGCATCACCTTTGGCATCTTCTT	NM_214399.1
<i>TNF-α</i>	ACGCTCTTCTGCCTACTGC	TCCCTCGGCTTTGACATT	NM_214022.1
<i>IL-10</i>	CACTGCTCTATTGCCTGATCTTC	AAACTCTTCACTGGGCCGAAG	NM_214041.1
<i>NQO1</i>	CATGGCGGTCAGAAAAGCAC	ATGGCATAACAGGTCCGACAC	NM_001159613.1
<i>Nrf2</i>	GCCCCCTGGAAGCGTTAAAC	GGACTGTATCCCCAGAAGGTTGT	XM_003133500.5
<i>Keap1</i>	ACGACGTGGAGACAGAAACGT	GCTTCGCCGATGCTTCA	NM_001114671.1
<i>TLR4</i>	TGGATTATCCAGCCAGGACG	GCTGGGACACCACGACAATA	NM_001293317.1
<i>MyD88</i>	CACCATTGAGATGACCCCC	CTAGCAATGGACCAGACGCA	NM_001099923.1
<i>NF-κB</i>	TTCTGGACCGCTTGGGTAAC	CACCGTTGGGGTGGTTGATA	NM_001048232.1
β -actin	CTACACCGCTACCAGTTCGC	TAGGAGTCCTTCTGGCCCAT	DQ452569.1

1.8 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 用最小显著差异法(least significant difference, LSD)多重比较法分析数据间的显著性差异。采用 GraphPad Prism 8 进行作图, 试验结果用平均值 \pm 标准误表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏指数的影响

由图 1 可得, 饲料中添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对断奶仔猪肝脏指数无显著影响($P>0.05$), LPS 应激使肝脏指数较对照组提高 8.3%, 而 BL-LPS 组的肝脏指数较 LPS 组显著降低 9.4% ($P<0.05$)。

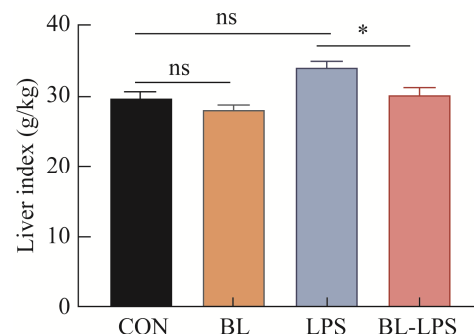


图 1 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏指数的影响

Figure 1 Effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on liver index of weaned piglets induced by LPS. CON: The control piglets; BL: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135; LPS: The piglets induced by LPS; BL-LPS: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135 and induced by LPS. *: $P<0.05$; ns: $P>0.05$.

2.2 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪血清 AST 和 ALT 的影响

由图 2 可知, BL 组血清中 AST 和 ALT 水平较 CON 组显著降低($P<0.05$), 分别降低了 22.8% 和 17.9%。LPS 组仔猪血清中 AST 和 ALT 的含量较 CON 组分别显著增加 0.7 倍和 0.5 倍($P<0.05$)。

此外, 与 LPS 组相比, BL-LPS 组的仔猪血清中 AST 和 ALT 的含量均显著降低($P<0.05$)。

2.3 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏抗氧化功能的影响

由图 3 可得, BL 组肝脏 CAT、T-SOD 和 T-AOC 含量较对照组均显著增加($P<0.05$), 而

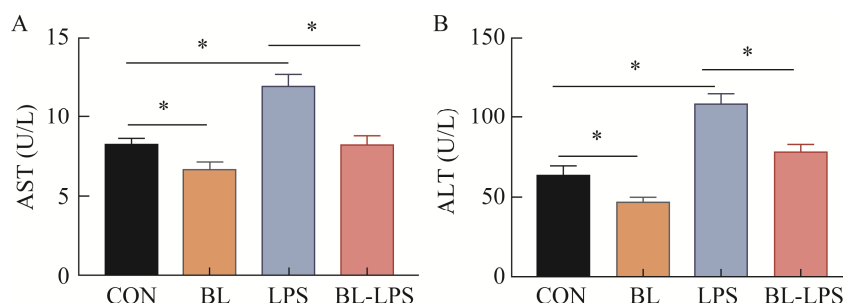


图 2 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪血清 AST (A)和 ALT (B)的影响

Figure 2 Effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on serum levels of AST (A) and ALT (B) in weaned piglets induced by LPS. CON: The control piglets; BL: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135; LPS: The piglets induced by LPS; BL-LPS: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135 and induced by LPS; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase. *: $P<0.05$.

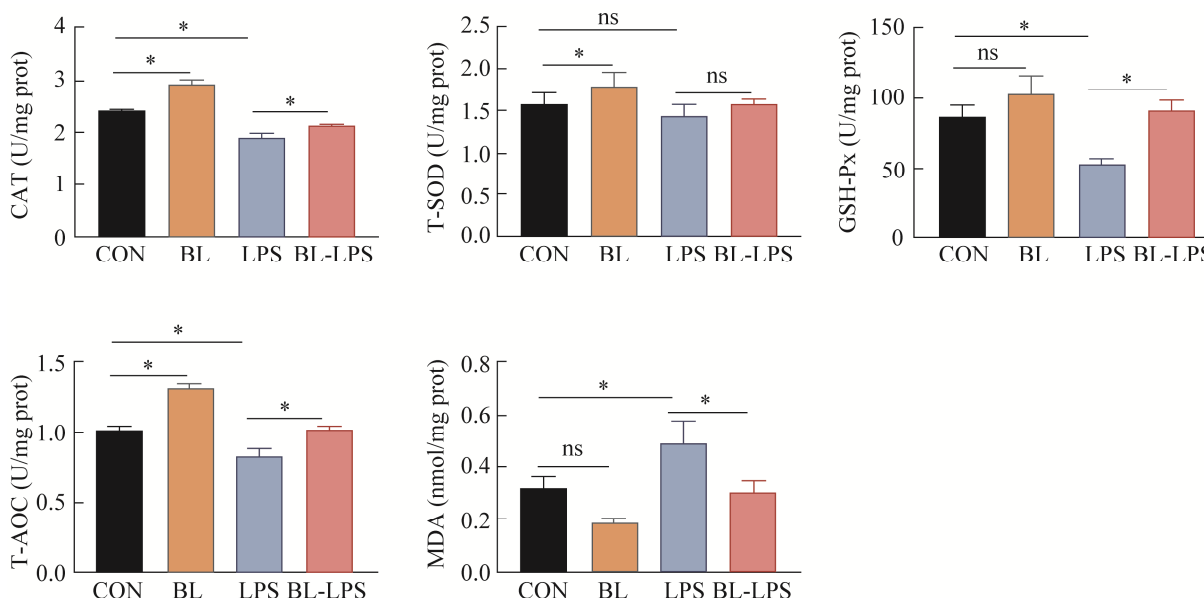


图 3 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏抗氧化功能的影响

Figure 3 Effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on liver antioxidant function of weaned piglets induced by LPS. CON: The control piglets; BL: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135; LPS: The piglets induced by LPS; BL-LPS: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135 and induced by LPS; CAT: Catalase; T-AOC: Total antioxidant capacity; T-SOD: Total superoxide dismutase; GSH-Px: Glutathione peroxidase; MDA: Malondialdehyde. *: $P<0.05$; ns: $P>0.05$.

LPS 组仔猪肝脏 CAT、GSH-Px 和 T-AOC 的含量较对照组相比分别显著减少 21.3%、38.2%和 18.6% ($P<0.05$), 而 MDA 的含量较对照组显著增加 52.5% ($P<0.05$)。另外, 与 LPS 组相比, BL-LPS 组的仔猪肝脏中 CAT、GSH-Px 和 T-AOC 等抗氧化相关指标的水平均显著增加 ($P<0.05$), 而 MDA 含量显著降低 37.4%, 接近于对照组 ($P<0.05$)。以上结果说明地衣芽孢杆菌 HJ0135 具有较好的抗氧化作用。

2.4 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏炎症因子的影响

由图 4 可知, 与 CON 组相比, BL 组仔猪肝脏中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 含量均显著降低 ($P<0.05$), 但 LPS 组的仔猪肝脏 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著增加 ($P<0.05$), IL-10 的水平则

显著下降 ($P<0.05$)。此外, 与 LPS 组相比, BL-LPS 组的仔猪肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平分别显著降低 3.0%、6.5%和 6.1% ($P<0.05$), IL-10 的含量显著增加 8.5% ($P<0.05$), BL-LPS 的炎症因子含量均与对照组接近, 说明地衣芽孢杆菌 HJ0135 具有良好的抗炎作用。

2.5 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏基因表达的影响

由图 5 可知, BL 组肝脏抗氧化基因 *CAT*、*SOD1*、*SOD2*、*GSH-Px1*、*Nrf2* 和 *NQO1* 的表达量较对照组分别显著增加 0.7、1.5、0.6、0.8、0.8、1.4 倍 ($P<0.05$), 而 LPS 组的 *SOD2* 的相对表达量较对照组显著降低 0.7 倍 ($P<0.05$), *Keap1* 的相对表达量较对照组则显著增加 1.6 倍 ($P<0.05$)。与 LPS 组相比, BL-LPS 组的抗氧化

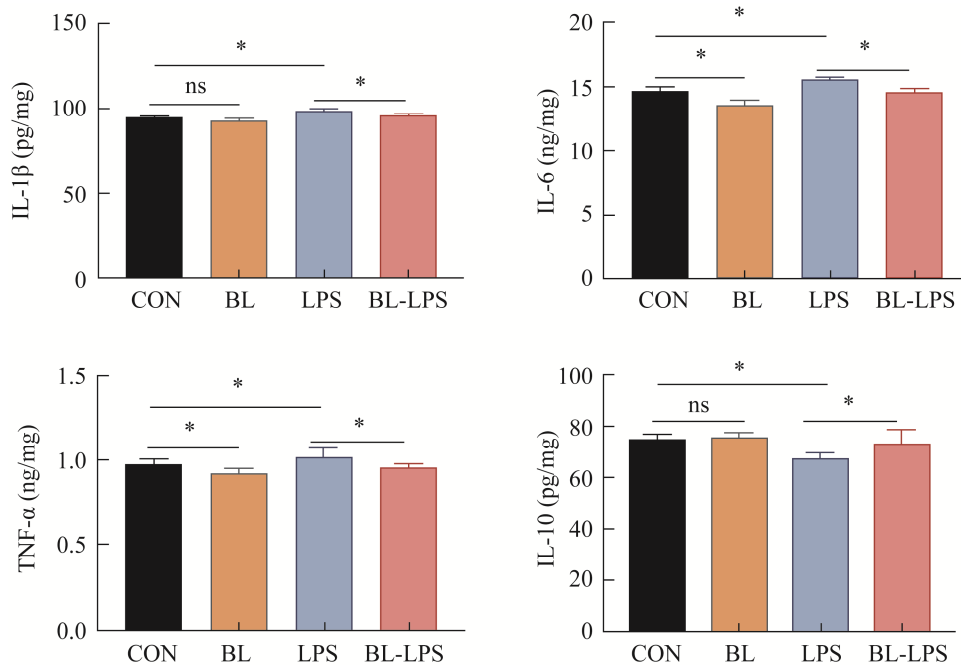


图 4 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏炎症因子的影响

Figure 4 Effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on liver inflammatory factors of weaned piglets induced by LPS. CON: The control piglets; BL: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135; LPS: The piglets induced by LPS; BL-LPS: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135 and induced by LPS; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-10: Interleukin-10. *: $P<0.05$; ns: $P>0.05$.

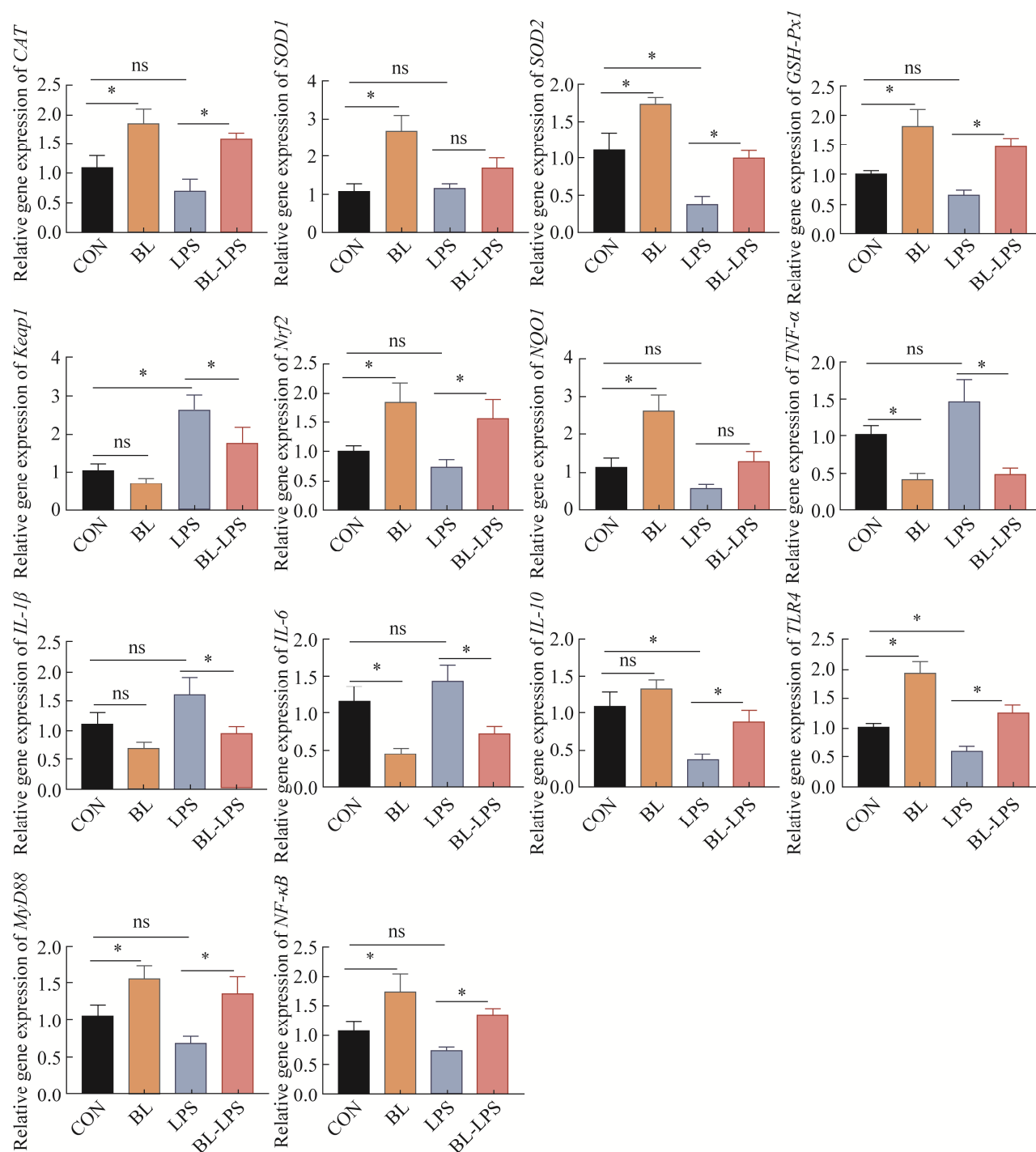


图5 添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 对 LPS 应激断奶仔猪肝脏基因表达的影响

Figure 5 Effects of *Bacillus licheniformis* HJ0135 on liver gene expression of weaned piglets induced by LPS. CON: The control piglets; BL: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135; LPS: The piglets induced by LPS; BL-LPS: The piglets supplemented with 500 mg/kg *Bacillus licheniformis* HJ0135 and induced by LPS; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; GSH-Px: Glutathione peroxidase; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NQO1: NADPH quinone oxidoreductase 1; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-10: Interleukin-10; TLR4: Toll-like receptors 4; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; NF- κ B: Nuclear factor kappa beta. *: $P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

基因 *CAT*、*SOD2*、*GSH-Px1* 和 *Nrf2* 的表达水平显著提高($P<0.05$), *Keap1* 基因的表达水平显著降低($P<0.05$)。炎症因子的基因表达水平检测结果显示, BL 组的 *TNF- α* 和 *IL-6* 基因表达水平较 CON 组均显著下降($P<0.05$), LPS 组的 *IL-10* 基因表达水平较 CON 组显著下降($P<0.05$)。与 LPS 组相比, BL-LPS 组肝脏中 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-6* 基因表达水平显著下降($P<0.05$), 而 *IL-10* 基因表达水平显著提高($P<0.05$)。此外, TLR4/MyD88 信号通路相关基因表达结果显示, BL 组 *TLR4*、*MyD88*、*NF- κ B* 基因表达水平较对照组分别显著增加 47.9%、64.0% 和 91.3% ($P<0.05$)、LPS 组的 *TLR4* 基因表达水平较对照组显著降低 38.9% ($P<0.05$)。BL-LPS 组肝脏中 *TLR4*、*MyD88* 和 *NF- κ B* 基因表达水平较 LPS 组均显著提高, 且均高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

肝脏是机体营养代谢和解毒的主要中枢器官, 更易受到体内毒素和代谢物产生的氧化应激和炎症的影响^[11]。LPS 可引起肝损伤导致肝脏肿大^[12]。研究结果显示, 地衣芽孢杆菌预处理能够有效缓解 LPS 应激引起的肝脏肿大。Bhat 等^[13]研究表明鼠李糖乳杆菌可以降低血清 ALT 和乳酸脱氢酶的活性以维持肝脏和肾脏的正常功能。Gancarčíková 等^[14]研究显示乳酸菌能够通过降低血清 AST 和 ALT 活性来缓解鼠伤寒沙门氏菌感染引起的小鼠肝损伤。另外, 在四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤模型中, 丁酸梭菌降低了血清 ALT 和 AST 的活性^[15]。本试验研究结果显示, 地衣芽孢杆菌可显著降低仔猪血清中 ALT 和 AST 活性, 并且有效缓解 LPS 应激引起的血清 ALT 和 AST 活性的增加, 表明地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以缓解 LPS 应激引起的断奶仔猪肝损伤。

氧化应激主要是由氧自由基的积累引起的, 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和消除之间的动态平衡在维持身体健康中起着至关重要的作用^[16]。具有良好抗氧化能力的机体会含有较高的抗氧化酶活性, 如 T-AOC、T-SOD、GSH-Px、CAT 等, 良好的抗氧化酶活性能有效防止过多的氧自由基破坏细胞结构^[17]。Yin 等^[18]研究结果显示, 在仔猪饲料中添加地衣芽孢杆菌能提高仔猪血清中 SOD 活性, 降低血清中 MDA 浓度。Cheng 等^[19]研究显示, 饲喂含有地衣芽孢杆菌的复合益生菌能够降低肉鸡鸡肉中 MDA 浓度。地衣芽孢杆菌能够产生具有抗氧化特性的胞外多糖, 可有效作为各种 ROS 的清除剂, 具有强抗氧化活性^[20]。地衣芽孢杆菌 VS16 的代谢产物具有抗氧化、抗菌和抗黏附的作用^[21]。本试验研究结果显示, 地衣芽孢杆菌可以提高肝脏 CAT、T-SOD、T-AOC 的活性, 有效缓解 LPS 应激引起的肝脏 CAT、GSH-Px、T-AOC 活性降低, 降低由于 LPS 应激升高的 MDA 含量。以上结果表明地衣芽孢杆菌 HJ0135 能够提高肝脏的抗氧化能力。

诸多研究表明, 细胞因子在仔猪的炎症反应中发挥重要作用。地衣芽孢杆菌可诱导调节性 T 淋巴细胞向浆细胞分化, 从而增强免疫球蛋白分泌, 促进抗炎作用^[22]。Xu 等^[23]在肉鸡饲料中添加地衣芽孢杆菌后, 结果显示血清中 IL-1 β 和 IL-6 水平降低, IL-10 水平升高。Li 等^[24]研究发现地衣芽孢杆菌 PF9 能够显著降低产肠毒素大肠杆菌 F4 感染期间 TNF- α 、IL-8 和 IL-6 的表达水平。与上述研究结果相似, 本试验研究结果显示地衣芽孢杆菌 HJ0135 使肝脏中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 含量降低, 而 IL-10 水平升高, 有效减轻了 LPS 刺激导致的炎症反应, 表明地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以减少急性肝损伤

引起的促炎细胞因子的分泌。

本研究显示地衣芽孢杆菌通过抑制炎症和氧化应激的作用减轻了 LPS 导致的肝脏损伤。为了充分阐明其中的保护机制,我们研究了两个参与抗炎和抗氧化的关键信号通路,即 NF- κ B 和 Nrf2 信号通路。NF- κ B 和 Nrf2 通路形成复杂的信号网络,调节肠道炎症和氧化还原状态。LPS 刺激介导的 TLR4 信号通路,可以激活 NF- κ B,从而调节炎症细胞因子分泌,在免疫系统应对革兰氏阴性菌入侵中发挥重要作用^[25]。NF- κ B 是一种参与炎症反应的关键转录因子,它控制多种化合物的表达,例如 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)^[26]。通常 Nrf2 与 Keap-1 结合在一起, Nrf2 处于不活跃的状态。在氧化应激时, Nrf2 从 Keap-1 中分离并转入细胞核,促进 HO-1、NQO1 以及 T-SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶的表达,从而增强细胞对氧化应激的防御能力^[27-28]。NQO1 是一种广泛存在于真核细胞中黄素蛋白酶,能够保护细胞免受醌类等生物异源物质的氧化损伤^[29]。本试验研究结果显示,地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以提高断奶仔猪肝脏 Nrf2 的基因表达量,进而促进下游抗氧化相关基因如 CAT、SOD1、SOD2、GSH-Px1 和 NQO1 的表达水平,这与本试验中抗氧化酶活性结果一致。LPS 应激使肝脏中 SOD2 基因的表达式水平降低, Keap1 基因表达式水平升高,而地衣芽孢杆菌可以有效提高由 LPS 刺激机体引起肝脏中 CAT、SOD2、GSH-Px1 和 Nrf2 基因表达式水平降低,有效缓解 Keap1 基因表达式水平提高。Chang 等^[30]研究发现,在饲料中添加地衣芽孢杆菌发酵产物可以提高肉鸡十二指肠、空肠和回肠中 SOD 和黏糖蛋白 2 (MUC2)基因表达式量。此外, Zhang 等^[31]

研究显示,在饲料中添加含有葡萄糖氧化酶的枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和乳酸菌可增加肝脏和空肠中 Nrf2 基因表达式量,降低 Keap1 基因表达式量。这些结果表明地衣芽孢杆菌 HJ0135 可在一定程度上通过 Keap1/Nrf2 信号通路提高仔猪的抗氧化能力。Xu 等^[32]研究发现 LPS 刺激会提高断奶仔猪空肠 IL-6 基因表达式量。研究证明地衣芽孢杆菌能改善 LPS 诱导的大鼠急性炎症^[33]。Chang 等^[30]研究发现,在饲料中添加地衣芽孢杆菌发酵产物可以降低肉鸡十二指肠、空肠和回肠中 IL-6 基因表达式量。Wang 等^[25]试验结果表明,饲料中添加地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可提高仔猪回肠和结肠中促炎细胞因子和 TLR4 的水平。本研究显示, LPS 刺激能降低肝脏 IL-10 基因表达式水平,地衣芽孢杆菌 HJ0135 则能够降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 基因表达式水平并提高 IL-10 表达式水平。此外,地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以提高肝脏中 TLR4、MyD88、NF- κ B 基因表达式水平。以上结果表明地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以改变仔猪肝脏炎症因子的分泌,其抗炎作用可能是通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路来发挥的。

4 结论

饲料中添加地衣芽孢杆菌 HJ0135 可以激活 Nrf2 和 TLR4 信号通路,缓解 LPS 刺激引起的肝脏损伤和炎症因子的分泌,提高断奶仔猪抗氧化能力。

参考文献

- [1] ZHU LH, ZHAO KL, CHEN XL, XU JX. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(8): 2581-2589.
- [2] UPADHAYA SD, KIM IH. The impact of weaning stress on gut health and the mechanistic aspects of

- several feed additives contributing to improved gut health function in weanling piglets-a review[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(8): 2418.
- [3] 屈圣富, 田琦, 梅华迪, 李贞明, 李袁飞, 马现永, 高凤仙, 余苗. 厚朴酚对断奶仔猪生长性能、肝脏抗氧化功能及脂代谢的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(5): 2872-2883.
- QU SF, TIAN Q, MEI HD, LI ZM, LI YF, MA XY, GAO FX, YU M. Effects of magnolol on growth performance, liver antioxidant function and lipid metabolism of weaned piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(5): 2872-2883 (in Chinese).
- [4] SCHMÖCKER C, WEYLANDT KH, KAHLKE L, WANG JD, LOBECK H, TIEGS G, BERG T, KANG JX. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines[J]. *Hepatology: Baltimore, Md*, 2007, 45(4): 864-869t.
- [5] NOVAIS AK, DESCHÊNE K, MARTEL-KENNES Y, ROY C, LAFOREST JP, LESSARD M, MATTE JJ, LAPOINTE J. Weaning differentially affects mitochondrial function, oxidative stress, inflammation and apoptosis in normal and low birth weight piglets[J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0247188.
- [6] LAN RX, LEE SI, KIM IH. Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2016, 100(6): 1130-1138.
- [7] 王四新, 季海峰, 刘辉, 张董燕, 王晶, 陈美霞, 王雅民. 益生菌对育肥猪育肥后期生长性能、养分表观消化率、粪便菌群和短链脂肪酸的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(7): 4227-4236.
- WANG SX, JI HF, LIU H, ZHANG DY, WANG J, CHEN MX, WANG YM. Effects of probiotics on growth performance, nutrient apparent digestibility, fecal microbiota and short chain fatty acids of finishing pigs in later finishing period[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(7): 4227-4236 (in Chinese).
- [8] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [9] 邱敏, 冯炼君, 赵才军, 包丽娟, 李爽, 郝浩扬, 付云贺, 胡晓宇, 张乃生. 枯草芽孢杆菌通过抑制 NF- κ B 通路改善 LPS 诱导的小鼠乳腺炎[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(5): 1018-1022.
- QIU M, FENG LJ, ZHAO CJ, BAO LJ, LI S, HAO HY, FU YH, HU XY, ZHANG NS. *Bacillus subtilis* ameliorates LPS-induced mastitis through inhibiting NF- κ B signaling pathway in mice[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(5): 1018-1022 (in Chinese).
- [10] PÉZSA NP, KOVÁCS D, RÁCZ B, FARKAS O. Effects of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* on gut barrier function, proinflammatory response, ROS production and pathogen inhibition properties in IPEC-J2-*Escherichia coli*/*Salmonella typhimurium* co-culture[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 936.
- [11] LI S, TAN HY, WANG N, ZHANG ZJ, LAO LX, WONG CW, FENG YB. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 26087-26124.
- [12] 单春兰, 耿树香, 缪福俊, 宁德鲁. 核桃蛋白多肽对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国油脂*, 2021, 46(4): 33-37.
- SHAN CL, GENG SX, MIAO FJ, NING DL. Protective effect of walnut protein polypeptide on LPS-induced acute liver injury in mice[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(4): 33-37 (in Chinese).
- [13] BHAT MI, SINGH VK, SHARMA D, KAPILA S, KAPILA R. Adherence capability and safety assessment of an indigenous probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* MTCC-5897[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 130: 120-130.
- [14] GANCARČIKOVÁ S, NEMCOVÁ R, POPPER M, HRČKOVÁ G, SCIRANKOVÁ E, MAĐAR M, MUDROŇOVÁ D, VILČEK Š, ŽITŇAN R. The influence of feed-supplementation with probiotic strain *Lactobacillus reuteri* CCM 8617 and alginite on intestinal microenvironment of SPF mice infected with *Salmonella typhimurium* CCM 7205[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(2): 493-508.
- [15] LIU JM, FU YY, ZHANG H, WANG JD, ZHU J, WANG YQ, GUO YG, WANG GC, XU TQ, CHU MP, WANG FY. The hepatoprotective effect of the probiotic *Clostridium butyricum* against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mice[J]. *Food & Function*, 2017, 8(11): 4042-4052.
- [16] RAY PD, HUANG BW, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(5): 981-990.
- [17] YUAN QL, JIANG YC, FAN Y, MA YF, LEI HY, SU JM. Fumonisin B1 induces oxidative stress and breaks

- barrier functions in pig iliac endothelium cells[J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 387.
- [18] 尹会方, 姚志翔, 杨守深. 丁酸梭菌和地衣芽孢杆菌对断奶仔猪生长性能及血液指标的影响[J]. *中国饲料*, 2019(20): 33-36.
- YIN HF, YAO ZX, YANG SS. Effects of *Clostridium butyricum*, *Bacillus licheniformis* on the growth performance and blood indexes of piglets[J]. *China Feed*, 2019(20): 33-36 (in Chinese).
- [19] CHENG YF, CHEN YP, LI XH, YANG WL, WEN C, KANG YR, WANG AQ, ZHOU YM. Effects of synbiotic supplementation on growth performance, carcass characteristics, meat quality and muscular antioxidant capacity and mineral contents in broilers[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(11): 3699-3705.
- [20] PETROVA P, ARSOV A, IVANOV I, TSIGORIYNA L, PETROV K. New exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* 24 display substrate-dependent content and antioxidant activity[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2127.
- [21] GIRI SS, RYU E, SUKUMARAN V, PARK SC. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 132: 66-72.
- [22] HAMADA H, HIROI T, NISHIYAMA Y, TAKAHASHI H, MASUNAGA Y, HACHIMURA S, KAMINOGAWA S, TAKAHASHI-IWANAGA H, IWANAGA T, KIYONO H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine[J]. *Journal of Immunology: Baltimore, Md: 1950*, 2002, 168(1): 57-64.
- [23] XU YL, YU Y, SHEN YY, LI Q, LAN JH, WU YP, ZHANG RQ, CAO GT, YANG CM. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(9): 101358.
- [24] LI Q, LI LY, CHEN YH, YU CN, AZEVEDO P, GONG J, YANG CB. *Bacillus licheniformis* PF₉ improves barrier function and alleviates inflammatory responses against enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 infection in the porcine intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2022, 13(1): 86.
- [25] WANG X, TIAN Z, AZAD MAK, ZHANG W, BLACHIER F, WANG Z, KONG X. Dietary supplementation with *Bacillus* mixture modifies the intestinal ecosystem of weaned piglets in an overall beneficial way[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(1): 233-246.
- [26] CHO HJ, LEE KW, PARK JHY. Erucin exerts anti-inflammatory properties in murine macrophages and mouse skin: possible mediation through the inhibition of NFκB signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(10): 20564-20577.
- [27] CANELLA R, BENEDUSI M, MARTINI M, CERVELLATI F, CAVICCHIO C, VALACCHI G. Role of Nrf2 in preventing oxidative stress induced chloride current alteration in human lung cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(8): 6018-6027.
- [28] XU DW, XU M, JEONG S, QIAN YH, WU HL, XIA Q, KONG XN. The role of Nrf2 in liver disease: novel molecular mechanisms and therapeutic approaches[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 9: 1428.
- [29] LIM JH, KIM KM, KIM SW, HWANG O, CHOI HJ. Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage[J]. *Pharmacological Research*, 2008, 57(5): 325-331.
- [30] CHANG WY, YU YH. Effect of *Bacillus* species-fermented products and essential oils on growth performance, gut morphology, cecal short-chain fatty acid levels, and microbiota community in broilers[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(8): 101970.
- [31] ZHANG J, LIU YJ, YANG ZB, YANG WR, HUANG LB, XU C, LIU M, GE JS, WANG YX, JIANG SZ. *Illicium verum* extracts and probiotics with added glucose oxidase promote antioxidant capacity through upregulating hepatic and jejunal Nrf2/Keap1 of weaned piglets[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(3): skaa077.
- [32] 徐启龙, 汪洋, 李先根, 肖勘, 肖世平, 魏伟群, 刘玉兰. 脂多糖刺激对断奶仔猪空肠形态结构、炎症反应和程序性坏死信号通路相关基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(4): 2606-2612.
- XU QL, WANG Y, LI XG, XIAO K, XIAO SP, WEI WQ, LIU YL. Effects of lipopolysaccharide challenge on jejunal morphology, inflammatory response and necroptosis signaling pathway related gene expression of weaned piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(4): 2606-2612 (in Chinese).
- [33] DENG B, WU J, LI XH, MEN XM, XU ZW. Probiotics and probiotic metabolic product improved intestinal function and ameliorated LPS-induced injury in rats[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(11): 1306-1315.