

研究报告

酸马奶提取 *Kluyveromyces marxianus* 代谢抗菌复合物对感染致病性 *Escherichia coli* O₈ 小鼠的免疫机能及其盲肠菌群的影响

陈玉洁¹ 敖日格乐^{1*} 王纯洁² 畅旺东¹ 徐东贺¹ 白丹丹¹

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古农业大学 兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】酸马奶可防治心血管、消化系统、肺结核、糖尿病和腹泻等疾病,尤其马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* 对单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 有抑菌作用,但对酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物抑菌作用的研究报道较少。为此,研究酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物对感染致病性大肠杆菌 *Escherichia coli* O₈ 小鼠免疫机能及其盲肠菌群的影响。【方法】将 128 只小鼠随机分为 4 组,空白组、致病对照组、K2 组和 K8 组,致病对照组小鼠连续 7 d 灌胃无菌 PBS,并于第 4 天注射 *E. coli* O₈; K2 组灌胃抗菌复合物 *K. marxianus* pH 2.0,并注射 *E. coli* O₈; K8 组灌胃抗菌复合物 *K. marxianus* pH 8.0,并注射 *E. coli* O₈。采用常规 HE 染色法观察 0、4 和 7 d 小鼠小肠病理切片,称重法测定小鼠免疫器官指数,ELISA 法测定血清中免疫球蛋白,流式细胞术测定 T 细胞亚群,平板涂布法测定盲肠菌群。【结果】致病对照组小鼠在实验第 4 天注菌后出现一系列患病临床症状和小肠组织病理变化。K2 组和 K8 组小鼠整体精神状态好于致病对照组,死亡小鼠数量较少,可一定程度上缓解和改善感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的小肠组织病理变化。致病对照组在第 7 天胸腺指数显著低于空白组($P < 0.05$)。K2 组和 K8 组在第 4 天和第 7 天脾脏指数显著高于空白组($P < 0.05$)。致病对照组在第 7 天 IgA 显著低于空白组($P < 0.05$)。K2 组在第 4 天 IgA、IgG 显著高于空白组($P < 0.05$)。K2 组在第 7 天 IgG 和 IgM 显著高于空白组($P < 0.05$)。K8 组在第 7 天 IgM 显著高于空白组($P < 0.05$)。K2 组在第 4 天和第 7 天 CD8⁺显著低于空白组,CD4⁺/CD8⁺显著高于空白组($P < 0.05$)。K8 组在第 4 天 CD8⁺显著低于空白组($P < 0.05$)。K8 组在第 7 天 CD8⁺显著低于空白组,CD4⁺/CD8⁺显著高于空白组($P < 0.05$)。致病对照组在第 7 天盲肠 *E. coli* 数量显著高于空白组,双歧杆菌数量显著低于空白组($P < 0.05$)。K2 组在第 7 天盲肠 *E. coli* 数量显著低于空白组,肠球菌数量显著低于空白组,乳酸杆菌数量显著高于空白组($P < 0.05$)。K8 组在第 7 天盲肠肠球菌数量显著低于空白组,乳酸杆菌数量显著高于空白组($P < 0.05$)。【结论】酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 K2 和 K8 能缓解感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠临床症状,提高其免疫机能,并影响其盲肠菌群,提高双歧杆菌和乳酸杆菌,降低 *E. coli* 和肠球菌的数量。

关键词: 酸马奶, 抗菌复合物, 大肠杆菌, 盲肠菌群, T 细胞亚群

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31060318, 31260570, 31260590); 国家科技支撑计划(No. 2012BAD12B09-3); 内蒙古自治区研究生教育创新计划项目(No. B20141012911)

*通讯作者: ✉; aori6009@163.com

收稿日期: 2015-04-22; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-12-20

Effect of antimicrobial compounds of *Kluyveromyces marxianus* in Koumiss on immune function and caecal microflora in mice challenged with pathogenic *Escherichia coli* O₈

CHEN Yu-Jie¹ CHEN Aorigele^{1*} WANG Chun-Jie² CHANG Wang-Dong¹
XU Dong-He¹ BAI Dan-Dan¹

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] Koumiss had beneficial therapeutic effects on cardiovascular disease, digestion disease, tuberculosis, diabetes and diarrhea, especially *Kluyveromyces marxianus* had antibacterial effect on *Listeria monocytogenes*. There was limited knowledge about antimicrobial compounds of *K. marxianus* in Koumiss, so, we evaluated the effect of antimicrobial compounds of *K. marxianus* in Koumiss on immune function and caecal microflora in mice challenged with pathogenic *Escherichia coli* O₈. [Methods] Kunming strain mice (128 heads, 20±2 g) were divided into 4 groups, the control group, the challenged control group, K2 group, and K8 group. Mice in the challenged control group were oral administrated sterile PBS by gavage for 7 d, then were administered intraperitoneally *E. coli* O₈ at 4 d. Mice in K2 group were oral administrated *K. marxianus* pH 2.0 and K8 group were oral administrated *K. marxianus* pH 8.0, then were administered intraperitoneally *E. coli* O₈. The pathological section of small intestine of mice were observed by HE staining at 0, 4, 7 d. The thymus index and spleen index were weighed and calculated. Immunoglobulins in serum were monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). T subsets were analyzed by flow cytometry. The caecal microflora was calculated by the spread plate method. [Results] Mice in the challenged control group appeared clinical symptoms and pathological changes of small intestine after they were challenged with *E. coli* O₈ at 4 d. Mice in K2 and K8 groups had better mental state, and less died mice than the challenged control group, K2 and K8 could improve pathological changes of small intestine after mice were challenged with *E. coli* O₈. Compared with the control group, the thymus index was decreased at 7 d by the challenged control group, while the spleen index was increased at 4 d and 7 d by K2 and K8 groups ($P<0.05$). Compared with the control group, IgA was decreased at 7 d by the challenged control group, while IgA and IgG were increased at 4 d, IgG and IgM were increased at 7 d by K2 group, IgM was increased at 7 d by K8 group ($P<0.05$). Compared with the control group, CD8⁺ was decreased and CD4⁺/CD8⁺ was increased at 4 d and 7 d by K2 group, CD8⁺ was decreased at 4 d by K8 group, CD8⁺ was decreased and CD4⁺/CD8⁺ was increased at 7 d by K8 group ($P<0.05$). Compared with the control group, *E. coli* was increased and *Bifidobacterium* was decreased at 7 d by the challenged control group ($P<0.05$), while *E. coli* was decreased, *Enterococcus* was decreased, and *Lactobacillus* was increased at 7 d by K2 group ($P<0.05$), *Enterococcus* was decreased, *Lactobacillus* was increased at 7 d by K8 group ($P<0.05$). [Conclusion] These results suggested that antimicrobial compounds of *K. marxianus* in Koumiss named K2 and K8 could ease clinical symptoms after mice were challenged with pathogenic *E. coli* O₈, enhance their immune function, influence their caecal microflora as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* increased, *E. coli* and *Enterococcus* decreased.

Keywords: Koumiss, Antimicrobial compound, *Escherichia coli*, Caecal microflora, T subsets

酸马奶是经酵母菌等微生物以马奶为原料发酵而成的卫生保健乳饮料, 可防治心血管病、消化系统病、肺结核、糖尿病和腹泻等疾病^[1]。在内蒙

古和新疆地区的酸马奶样品中, 马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* 为酵母菌中的优势菌^[2-3], 有报道称其对单核细胞增生李斯特菌 *Listeria*

monocytogenes 有抑菌作用^[4-5], 源于该菌代谢产生毒素蛋白、抗生素因子、有机酸、过氧化氢等抗菌复合物^[6], 其中毒素蛋白是一种有抑菌活性的糖蛋白, 能结合于敏感菌的细胞壁, 降低敏感菌细胞内 pH, 抑制细胞代谢, 导致细胞死亡^[7]。近些年, 以酿酒酵母 *Saccharomyces* 属酵母菌为主的益生菌或微生态制剂如活酵母菌、酵母菌细胞壁、酵母菌培养物逐渐被应用到动物生产中^[8-10], 但针对酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物在动物上的应用未见报道。

养牛业中致病性大肠杆菌 *Escherichia coli* 会引起犊牛腹泻——一种急性肠道疾病, 常用抗生素来治疗。但抗生素的长期使用会引起严重的耐药性, 且在牛体中的残留会直接威胁到人体健康和安全^[11]。酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物在体外实验中能有效抑制致病性 *E. coli* O₈ 的生长, 有望成为新的抗生素替代品^[12]。为此, 本文给小鼠连续灌胃 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 *K. marxianus* pH 2.0 和 *K. marxianus* pH 8.0, 并用致病性 *E. coli* O₈ 感染小鼠进行对比实验, 论证 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物对致病性 *E. coli* O₈ 感染小鼠的免疫机能及其盲肠菌群的影响, 为进一步的应用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试材料: 1 号液体培养基(g/L, 麦芽提取物 39, 酵母浸膏 3, 细菌学蛋白胨 5, 乳糖 10, pH 6.0), 广东环凯生物技术有限公司。免疫荧光单克隆抗体: PE anti-mouse CD4+(12-0041), PE anti-mouse CD8+(12-0081), 美国 Affymetrix 公司。*E. coli* O₈: 奶牛粪样中分离的内蒙古优势血清型致病性 *E. coli*。 *K. marxianus*: 内蒙古锡林郭勒盟地区牧民家庭的酸马奶样品中分离的酵母菌, 由常规生化鉴定方法和 26S rDNA 扩增共同鉴定。*K. marxianus* 代谢抗菌复合物: 将 *K. marxianus* 接种于 1 号液体培养基中 25 °C 下培养 72 h, 过滤培养

液后参照文献[13]采用乙酸乙酯萃取法制得抗菌复合物 *K. marxianus* pH 2.0 (K2)和 *K. marxianus* pH 8.0 (K8), 主要成分为丙酸(分别为 2 711.3 mg/100 g 和 1 874.7 mg/100 g)、乳酸(680.8 mg/100 g 和 672.0 mg/100 g)、苹果酸(673.1 mg/100 g 和 13.2 mg/100 g)、抗坏血酸 (743.9 mg/100g 和 405.3 mg/100 g)和毒素蛋白(75.0 mg/100 g 和 74.1 mg/100 g)。

1.1.2 实验动物与实验设计: 选用 128 只昆明系小白鼠, 体重 20±2 g, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 空白组、致病对照组、K2 组和 K8 组, 每组 32 只, 实验方案见表 1。50%致死浓度(Minimum lethal dose, MLD) *E. coli* O₈ 为 4.7×10⁹ CFU/mL。小鼠饲喂颗粒饲料, 不含任何抗生素, 笼养, 自由饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠临床及小肠病理学观察: 观察各组小鼠临床表现, 对病情严重的小鼠进行剖检, 采集小肠样品, 观察其主要病理变化, 并用中性福尔马林固定, 制成石蜡切片, HE 染色后用显微镜观察。

1.2.2 免疫器官指数的测定: 分别于实验第 0、4 天(注菌前)、第 7 天每组取 8 只小鼠颈部脱臼致死, 取胸腺和脾脏称湿重计算相应脏器指数: 脾脏指数=脾脏重量(mg)/体重(g), 胸腺指数=胸腺重

表 1 实验设计
Table 1 Experimental design

组别 Group	实验方案 Testing program
空白组 The control group	连续灌胃无菌磷酸盐缓冲液 PBS 7 d, 每天一次, 每次 0.2 mL/只
致病对照组 The challenged control group	连续灌胃无菌 PBS 7 d, 第 4 天腹腔注射 50% MLD <i>E. coli</i> O ₈ 菌悬液 0.3 mL/只
K2 组 K2 group	连续灌胃溶于无菌 PBS 中的 K2 [剂量为 2 500 mg/(kg bw)] 7 d, 第 4 天腹腔注射 50% MLD <i>E. coli</i> O ₈ 菌悬液 0.3 mL/只
K8 组 K8 group	同 K2 组类似, 灌胃溶于无菌 PBS 中的 K8 [剂量为 2 500 mg/(kg bw)], 并注菌

量(mg)/体重(g)^[14]。

1.2.3 血清免疫球蛋白的测定: 采集血液后分离血清, 用酶联免疫吸附实验 ELISA 试剂盒(购于南京博尔迪生物科技有限公司)测定血清中 IgA、IgG 和 IgM^[14]。

1.2.4 T 细胞亚群的测定: 采集血液于抗凝管, 取 200 μ L 血样, 加 10 倍稀释的溶血素 5 mL, 摇匀, 静置 12 min, 1 500 r/min 离心 7 min, 弃上清, 加 3 mL PBS 洗 3 次, 加 100 μ L PBS 稀释, 调细胞浓度为 1×10^6 个/ μ L。分成 2 份, 每份 50 μ L, 加入上样管, 分别加入抗体 CD8-PE 和 CD4-PE, 4 $^{\circ}$ C 避光标记 30 min, 加 2 mL PBS 离心, 弃上清, 沉淀中加 300 μ L PBS, 振荡悬浮, 用 Facsealibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)测定 CD4⁺和 CD8⁺细胞百分率, 并计算 CD4⁺/CD8⁺^[15-16]。

1.2.5 盲肠菌群的分析: 在无菌条件下取全部盲肠, 置于灭菌离心管中。将盲肠内容物 10 倍梯度稀释 8 管, 为原液的 10^{-1} – 10^{-8} 倍, 分别吸取 50 μ L 涂布于双歧杆菌培养基(BBL)上, 厌氧罐中 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 检测双歧杆菌数量。接着分别吸取 50 μ L 涂布于乳杆菌选择性培养基(LBS)上, 厌氧罐中 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 检测乳酸杆菌数量。再分别吸取 50 μ L 涂布于胆盐硫乳琼脂培养基(DHL)上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 检测 *E. coli* 数量。再分别吸取 50 μ L 涂布于 KF 链球菌琼脂培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 检测肠球菌数量。待菌落长出, 选适合的稀释度计数菌落数(同稀释度平均菌落数为 X), 菌群数量用 lg CFU/g 盲肠内容物表示^[17], 计算公式为: 盲肠菌群数量(lg CFU/g)=lg[X/0.05 \times 稀释倍数/盲肠内容物质量(g)]。培养基购于青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.3 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 8.0 进行单因素方差分析, 组间差异进行 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠临床症状和小肠病理变化的影响

2.1.1 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠临床症状的影响: 空白组小鼠 7 d 内无明显变化。致病对照组小鼠在实验第 4 天注菌后 8–12 h, 部分小鼠精神不振, 开始聚堆。注菌后 24–36 h 出现明显临床症状, 主要为眯眼、腹泻、厌食、精神萎靡、行动迟缓、聚堆, 部分小鼠死亡。注菌后 48–72 h (实验第 7 天)死亡小鼠数量增加, 但未死亡小鼠精神状态出现好转, 行动比先前敏捷。K2 组和 K8 组小鼠整体精神状态好于致病对照组, 死亡小鼠数量较少。

2.1.2 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠小肠病理变化的影响: 由图 1 可知, 空白组小鼠小肠绒毛排列整齐, 且细长紧密。致病对照组小鼠在第 7 天小肠组织出现病理改变, 小肠绒毛矮短, 松散, 小肠绒毛间隙变大, 有些绒毛甚至断裂脱落。K2 组和 K8 组小鼠在第 4 天小肠绒毛比空白组更长且紧密; 在第 7 天小肠绒毛形态也有病理改变, 但相对于致病对照组有所好转。表明小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后小肠组织出现病理变化, 灌胃 K2 和 K8 可以一定程度上缓解和改善感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的小肠组织病理变化。

2.2 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠脏器指数的影响

由表 2 可知, 各组小鼠在第 0 天脏器指数无差别($P > 0.05$)。致病对照组在第 4 天脏器指数与空白组无差别($P > 0.05$)。致病对照组在第 7 天脾脏指数与空白组无差别($P > 0.05$), 胸腺指数显著低于空白组($P < 0.05$)。K2 组和 K8 组在第 4 天和第 7 天脾脏指数显著高于空白组($P < 0.05$), 胸腺指数与空白组无差别($P > 0.05$)。表明小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后会降低胸腺指数, 灌胃 K2 和 K8 可以提高感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的脏器指数。

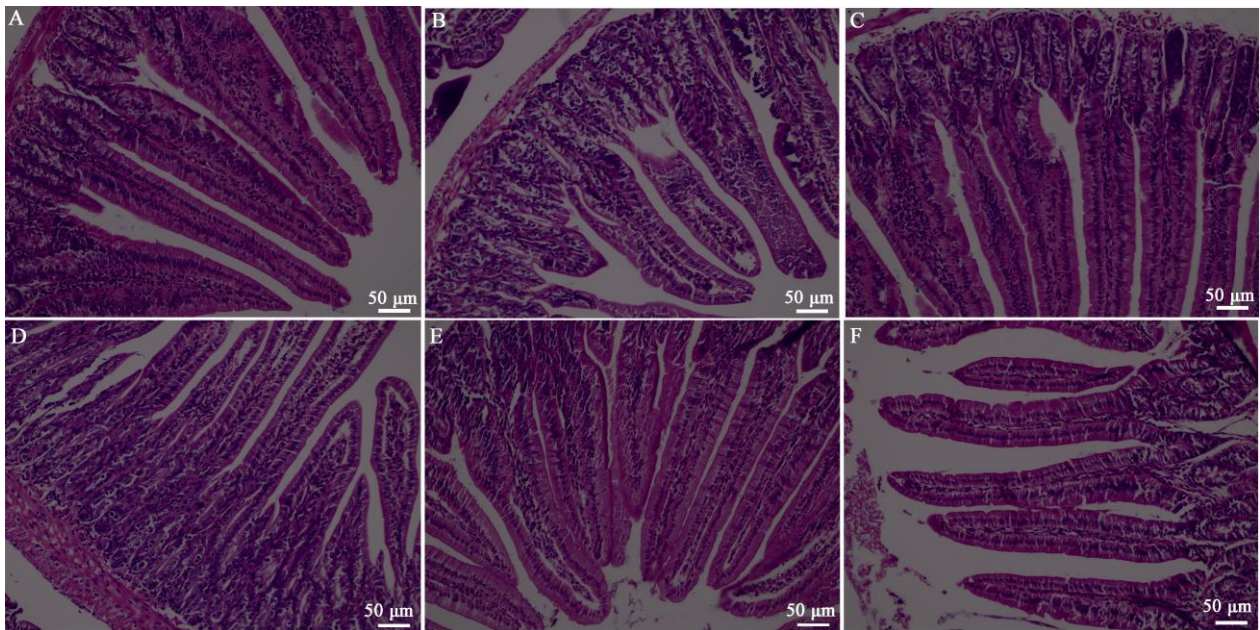


图 1 小鼠小肠组织病理形态学变化(HE 染色, 200×)

Figure 1 Pathomorphology of small intestinal in mice (HE staining, 200×)

注: A: 空白组; B: 7 d 致病对照组; C: 4 d K2 组; D: 7 d K2 组; E: 4 d K8 组; F: 7 d K8 组.

Note: A: The control group at 0 d; B: The challenged control group at 7 d; C: K2 group at 4 d; D: K2 group at 7 d; E: K8 group at 4 d; F: K8 group at 7 d.

表 2 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠脏器指数的影响

Table 2 Effect of K2 and K8 on the thymus index and spleen index in mice challenged with pathogenic *E. coli* O₈

项目 Item	时间 Time (d)	组别 Group			
		空白组 The control group	致病对照组 The challenged control group	K2 组 K2 group	K8 组 K8 group
脾脏指数 Spleen index	0	5.63±0.52	5.59±0.89	5.56±0.77	5.60±0.80
	4	5.71±1.48 ^b	5.75±1.70 ^b	8.19±2.54 ^a	8.22±2.34 ^a
	7	5.83±1.72 ^b	5.40±0.35 ^b	9.35±1.54 ^a	8.64±1.98 ^a
胸腺指数 Thymus index	0	2.64±0.49	2.60±0.31	2.65±0.90	2.61±0.27
	4	2.78±0.67	2.70±0.52	3.22±2.04	2.99±1.60
	7	3.32±0.86 ^a	1.72±0.54 ^b	3.00±0.17 ^a	2.93±0.23 ^a

注: 同行肩注字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 字母相同者或未标注者表示差异不显著($P>0.05$).

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

表3 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠免疫球蛋白的影响
Table 3 Effect of K2 and K8 on immunoglobulin in mice challenged with pathogenic *E. coli* O₈ (mg/L)

项目 Item	时间 Time (d)	组别 Group			
		空白组 The control group	致病对照组 The challenged control group	K2组 K2 group	K8组 K8 group
IgA	0	83.08±0.64	82.87±1.70	83.50±1.48	82.44±0.85
	4	83.29±0.42 ^b	83.71±1.27 ^b	94.10±3.18 ^a	90.50±1.27 ^{ab}
	7	84.77±0.64 ^{ab}	74.17±1.48 ^c	88.59±1.91 ^a	81.59±0.85 ^b
IgG	0	116.59±0.90	116.29±1.79	115.39±2.09	116.89±2.99
	4	116.89±1.19 ^b	117.19±3.29 ^b	132.12±3.88 ^a	127.04±2.39 ^{ab}
	7	117.19±0.30 ^{bc}	112.41±2.69 ^c	130.33±3.88 ^a	124.65±1.19 ^{ab}
IgM	0	309.17±3.01	310.37±1.81	306.16±8.42	308.56±14.44
	4	305.55±4.21	309.17±13.84	351.89±13.24	328.42±16.25
	7	306.76±5.42 ^b	270.05±2.41 ^b	421.68±15.64 ^a	392.20±15.04 ^a

注: 同行肩注字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 字母相同者或未标注者表示差异不显著($P>0.05$).

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.3 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠血清免疫球蛋白的影响

由表3可知, 各组在第0天各免疫球蛋白无差别($P>0.05$)。致病对照组在第4天各免疫球蛋白与空白组无差别($P>0.05$)。致病对照组在第7天IgA显著低于空白组($P<0.05$), IgG和IgM与空白组无差别($P>0.05$)。K2组在第4天IgA、IgG高于空白组($P<0.05$), IgM与空白组无差别($P>0.05$)。K2组在第7天IgA与空白组无差别($P>0.05$), IgG和IgM显著高于空白组($P<0.05$)。K8组在第4天各免疫球蛋白与空白组无差别($P>0.05$)。K8组在第7天IgA和IgG与空白组无差别($P>0.05$), IgM显著高于空白组($P<0.05$)。表明小鼠注射致病性 *E. coli* O₈后体内IgA降低, 灌胃K2和K8可以提高感染致病性 *E. coli* O₈小鼠免疫球蛋白, 其中K2组效果更优。

2.4 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠T细胞亚群的影响

由表4可知, 各组CD4⁺无差别($P>0.05$)。各组在第0天CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺无差别($P>0.05$)。致

病对照组在第4天和第7天CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺与空白组无差别($P>0.05$)。K2组在第4天和第7天CD8⁺显著低于空白组($P<0.05$), CD4⁺/CD8⁺显著高于空白组($P<0.05$)。K8组在第4天CD8⁺显著低于空白组($P<0.05$), CD4⁺/CD8⁺与空白组无差别($P>0.05$)。K8组在第7天CD8⁺显著低于空白组($P<0.05$), CD4⁺/CD8⁺显著高于空白组($P<0.05$)。表明小鼠注射致病性 *E. coli* O₈后T细胞亚群变化不大, 灌胃K2和K8会降低感染致病性 *E. coli* O₈小鼠CD8⁺, 提高CD4⁺/CD8⁺, 且K2组效果更优。

2.5 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠盲肠菌群的影响

由表5可知, 各组在第0天和第4天 *E. coli*、肠球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌数量无差别($P>0.05$)。致病对照组在第7天 *E. coli* 数量显著高于空白组($P<0.05$), 肠球菌数量与空白组无差别($P>0.05$), 乳酸杆菌数量与空白组无差别($P>0.05$), 双歧杆菌数量显著低于空白组($P<0.05$)。K2组在第7天 *E. coli* 数量显著低于空白组($P<0.05$), 肠球菌数量显著低

表4 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠 T 细胞亚群的影响
Table 4 Effect of K2 and K8 on T cell subsets in mice challenged with pathogenic *E. coli* O₈ (%)

项目 Item	时间 Time (d)	组别 Group			
		空白组 The control group	致病对照组 The challenged control group	K2组 K2 group	K8组 K8 group
CD4+	0	36.25±0.85	36.43±0.49	36.16±0.37	36.63±0.47
	4	36.35±0.94	36.41±0.80	36.59±1.04	36.46±2.79
	7	36.28±2.06	36.17±5.87	36.85±4.35	36.52±2.61
CD8+	0	25.57±3.43	25.31±2.89	25.32±2.93	25.56±1.43
	4	25.60±4.86 ^a	25.50±1.86 ^a	19.17±2.25 ^b	19.94±2.16 ^b
	7	25.70±1.32 ^a	26.69±0.59 ^a	17.86±2.30 ^b	17.97±1.89 ^b
CD4+/CD8+	0	1.45±0.21	1.46±0.16	1.45±0.15	1.44±0.09
	4	1.47±0.29 ^b	1.43±0.10 ^b	1.94±0.23 ^a	1.85±0.24 ^{ab}
	7	1.42±0.13 ^b	1.36±0.23 ^b	2.12±0.46 ^a	2.04±0.13 ^a

注：同行肩注字母不同者表示差异显著($P<0.05$)，字母相同者或未标注者表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

表5 K2和K8对感染致病性 *E. coli* O₈小鼠盲肠菌群的影响
Table 5 Effect of K2 and K8 on caecal microflora in mice challenged with pathogenic *E. coli* O₈
(LgCFU/g of cecum wet weight)

项目 Item	时间 Time (d)	组别 Group			
		空白组 The control group	致病对照组 The challenged control group	K2组 K2 group	K8组 K8 group
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	0	6.85±0.88	6.82±0.01	6.83±0.16	6.80±0.14
	4	6.87±0.85	6.86±0.79	5.95±0.31	6.13±0.62
	7	6.83±0.84 ^b	10.05±0.14 ^a	5.29±0.23 ^c	5.56±0.77 ^{bc}
肠球菌 <i>Enterococcus</i>	0	6.60±0.32	6.55±0.14	6.57±0.20	6.62±0.09
	4	6.53±0.24	6.55±0.74	5.93±0.35	5.96±0.06
	7	6.64±0.26 ^a	6.56±0.74 ^a	4.59±0.38 ^b	5.22±0.32 ^b
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	0	6.11±0.06	6.09±0.15	6.08±0.07	6.11±0.09
	4	6.10±0.23	6.06±0.14	6.86±0.58	6.64±0.13
	7	6.17±0.04 ^b	5.58±0.55 ^b	7.34±0.27 ^a	7.27±0.69 ^a
双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	0	10.02±0.05	10.01±0.03	9.91±0.07	10.01±0.13
	4	10.03±0.30	10.00±0.57	10.53±0.38	10.41±0.36
	7	10.17±0.21 ^a	6.62±0.23 ^b	10.03±0.15 ^a	10.01±0.59 ^a

注：同行肩注字母不同者表示差异显著($P<0.05$)，字母相同者或未标注者表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

于空白组($P<0.05$), 乳酸杆菌数量显著高于空白组($P<0.05$), 双歧杆菌数量与空白组无差别($P>0.05$)。K8 组在第 7 天 *E. coli* 数量与空白组无差别($P>0.05$), 肠球菌数量显著低于空白组($P<0.05$), 乳酸杆菌数量显著高于空白组($P<0.05$), 双歧杆菌数量与空白组无差别($P>0.05$)。表明小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后会增加肠道中 *E. coli* 数量, 减少双歧杆菌数量, 灌胃 K2 和 K8 会降低感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠肠道中 *E. coli* 的数量, 增加乳酸杆菌和双歧杆菌的数量, 且 K2 组效果更优。

3 讨论

致病对照组小鼠腹腔注射致病性 *E. coli* O₈ 出现一系列的病理变化, 如腹泻、厌食、精神萎靡等, 与斯木吉德研究的致病性 *E. coli* 病理变化相似^[18], 观察小肠病理切片发现小肠绒毛形态结构遭到破坏, 与 Girard 等^[19]的报道相一致。灌胃 K2 和 K8 可以一定程度上缓解和改善感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的病症和小肠组织病理变化。

胸腺是机体淋巴细胞分化和成熟的主要中枢免疫器官, 而脾脏是机体最重要的外周淋巴器官。在胸腺中淋巴细胞发育成熟后, 经循环系统转移至脾脏及各级淋巴组织和淋巴器官中储存, 并发挥免疫作用。脾脏和胸腺增重是免疫器官生长发育快的表现, 而其指数提高意味着免疫系统成熟较快^[20]。实验结果表明: 致病对照组小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后, 导致胸腺指数降低。但实验鼠灌胃 K2 和 K8 可以提高感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠脾脏和胸腺指数, 认为 K2 和 K8 促进了感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠脾脏和胸腺的生长发育, 进而提高机体免疫功能。本实验结果与郭剑英等研究的中药复方对小鼠脏器指数的影响相一致^[21]。

免疫球蛋白是介导体液免疫的主要抗体, 血清抗体的高低在一定程度上反映机体对疾病的抵抗能力。IgA、IgG 和 IgM 可以代表血清免疫球蛋白的水平^[22]。实验结果表明: 致病对照组小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后, 血清 IgA 显著降低, 而且 IgG 和 IgM 也有降低的趋势。实验在第 4 天 K2 组小鼠

血清 IgA、IgG 显著高于空白组, 该结果与菊糖酸奶对小鼠免疫球蛋白的影响结果相一致^[23]。在第 7 天 K2 组小鼠血清 IgG 和 IgM 显著高于空白组。K8 组小鼠血清 IgM 显著高于空白组, 认为 K2 组和 K8 组由于 K2 和 K8 的干预在第 7 天时缓解了小鼠感染致病性 *E. coli* O₈ 的症状, 使部分指标恢复到正常水平。另外 K2 和 K8 有益于增强感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠机体的体液免疫能力, 从而提高其免疫机能, 起到抗炎免疫作用。

免疫细胞的数量和活性的变化也能反映机体细胞免疫机能状态。参与机体细胞免疫功能的 T 淋巴细胞主要有 CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞。在一定范围之内, CD4⁺细胞百分含量较高或 CD4⁺/CD8⁺值较大, 说明机体免疫功能状态良好^[24-25]。实验结果表明: 小鼠灌胃 K2 和 K8 可以显著提高感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠血液中 CD4⁺/CD8⁺, 认为 K2 和 K8 有益于提高机体免疫功能状态。

肠道菌群指人体或动物肠道内存在的大量细菌, 随宿主自身饮食和环境因素的改变而变化, 肠道菌群平衡稳定是保障机体健康的必要条件, 盲肠菌群可以直接或间接反映肠道菌群变化。盲肠菌群主要由厌氧菌构成, 其优势菌包括双歧杆菌和乳酸杆菌等^[26]。*E. coli*、肠球菌是盲肠菌群中的条件致病菌。这几种细菌数量的变化是肠道健康的重要指标^[27-28]。实验结果表明: 致病对照组小鼠注射致病性 *E. coli* O₈ 后, 盲肠中 *E. coli* 数量增多, 双歧杆菌数量降低。认为致病性 *E. coli* O₈ 可使小鼠正常菌群失调, 促进 *E. coli* 快速增殖, 减少双歧杆菌的数量。小鼠灌胃 K2 和 K8 可以抑制感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠盲肠中 *E. coli* 和肠球菌的数量, 提高乳酸杆菌和双歧杆菌的数量, 由此可见 K2 和 K8 会促进有益菌在肠道内的生长和定殖。另外乳酸杆菌代谢产生的乳酸, 双歧杆菌发酵产生的醋酸, K2 和 K8 中的有机酸, 调节肠道内 pH, 抑制有害细菌繁殖和生长, 保持动物正常盲肠菌群比例, 防治疾病^[29-30]。本实验结果与魏刚研究的中药复方对小鼠肠道菌群的影响一致^[31]。

4 结论

(1) 小鼠注射致病性 *E. coli* O₈, 出现患病临床症状, 其小肠组织出现病理改变。盲肠中 *E. coli* 数量增多, 胸腺指数、血清 IgA、双歧杆菌数量降低。

(2) 酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 K2 影响感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠小肠病理变化。提高小鼠的脾脏指数和血清免疫球蛋白, 增高 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 减少 CD8⁺。同时抑制盲肠中 *E. coli* 数量和肠球菌, 促进乳酸杆菌繁衍。

(3) 酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 K8 影响感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠小肠病理变化。提高感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的脾脏指数和 IgM, 增高 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 减少 CD8⁺。同时抑制盲肠中肠球菌, 促进乳酸杆菌繁衍。

(4) 酸马奶提取 *K. marxianus* 代谢抗菌复合物 K2 和 K8 对感染致病性 *E. coli* O₈ 小鼠的影响 K2 更优。

参考文献

- [1] Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651
- [2] Ishii S, Kikuchi M, Takao S. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from "Chigo" in Inner Mongolia, China[J]. Nihon Chikusan Gakkaiho, 1997, 68(3): 325-329
- [3] Ni HJ, Bao QH, Sun TS, et al. Identification and biodiversity of yeasts isolated from Koumiss in Xinjiang of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 578-582 (in Chinese)
倪慧娟, 包秋华, 孙天松, 等. 新疆地区酸马奶中酵母菌的鉴定及其生物多样性分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 578-582
- [4] Goerges S, Aigner U, Silakowski B, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 313-318
- [5] Goerges S, Koslowsky M, Velagic S, et al. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(2): 83-89
- [6] Viljoen BC. Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents[A]//Querol A, Fleet G. Yeasts in Food and Beverages[M]. Berlin: Springer, 2006: 83-110
- [7] Wen WR, Chen H, Dai GS, et al. The killer activity of the yeast killer system[J]. Chinese Journal of Microecology, 1999, 11(4): 217-219 (in Chinese)
温旺荣, 陈红, 戴庚孙, 等. 酵母菌杀菌系统的杀菌活性[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(4): 217-219
- [8] Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs[J]. Journal of Nutrition, 2002, 132(5): 980-989
- [9] Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, et al. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs[J]. Archiv für Tierernährung, 2002, 56(4): 309-318
- [10] Chiquette J. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge[J]. Animal Feed Science and Technology, 2009, 153(3/4): 278-291
- [11] Piao FZ, Xia C. The occurrence characteristics of cow disease and their popular trend[J]. Veterinary Orientation, 2011(2): 33-35 (in Chinese)
朴范泽, 夏成. 当前牛病的发生特点和流行趋势[J]. 兽医导刊, 2011(2): 33-35
- [12] Chen YJ, Chen A, Wang CJ, et al. Effects of antimicrobial compounds of *Kluyveromyces marxianus* in Koumiss on pathogenic *Escherichia coli* and its cell surface characteristics[J]. Microbiology China, 2015, 42(4): 683-689 (in Chinese)
陈玉洁, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 酸马奶提取 *Kluyveromyces marxianus* 代谢抗菌复合物对致病性大肠杆菌的抑菌和细胞表面特性的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 683-689
- [13] He YF. Studies on isolation, identification of microorganisms and their antibacterial factors from koumiss[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2008 (in Chinese)
贺银凤. 酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌因子的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2008
- [14] Zhan YB. Screening of compound Mongolian medicine treating bovine mastitis and research of its mechanism on anti-inflammation and immunoenhancement[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese)
战永波. 治疗奶牛乳房炎蒙药复方的筛选及其抗炎免疫机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2010
- [15] Shen GX, Zhou RL. Modern Immunology Experiment Technology[M]. 2nd Edition. Wuhan: Hubei Science & Technology Press, 2002: 228-253 (in Chinese)
沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 第2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 228-253
- [16] Tuo JJ. Research on effect of the caulerpa racemosa var peltata polysaccharides and selenizing product on T lymphocytes and NK cells in mice[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Ji'nan University, 2007 (in Chinese)
唐菁菁. 总状蕨藻盾叶变种多糖及其硒化物对小鼠 T 细胞和 NK 细胞的调节[D]. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 2007
- [17] Wu SG, Gao CQ, Zhang HJ, et al. Effect of dietary isomalto-oligosaccharide on performance, caecal microflora and immune function of laying hens[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(9): 1560-1568 (in Chinese)
武书庚, 高春起, 张海军, 等. 低聚异麦芽糖对产蛋鸡生产性能、盲肠微生物和免疫机能的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(9): 1560-1568
- [18] Huasai S, Chen A, Wang CJ, et al. Isolation and identification of pathogenic *Escherichia coli* in fresh cow faeces[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(8): 42-43 (in Chinese)
斯木吉德, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 奶牛新鲜粪便致病性大肠杆菌分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(8): 42-43
- [19] Girard F, Frankel G, Phillips AD, et al. Interaction of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 with mouse intestinal mucosa[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 283(2): 196-202
- [20] Chen FX, Chen WY, Zhong XH. Effect of *Taraxacum* polysaccharides on immune function in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(3): 19-20 (in Chinese)

- 陈福星, 陈文英, 钟秀会. 蒲公英多糖对小鼠免疫机能的影响[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(3): 19-20
- [21] Guo JY, Yan C, Wang JH, et al. Effect on blood metabolites and immunologic organ index in response to Chinese herbal ultra-fine powder treatment of mouse[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(5): 240-243 (in Chinese)
郭剑英, 颜诚, 王杰豪, 等. 饲料中添加复方中药对小鼠血液生理生化指标和免疫器官指数的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5): 240-243
- [22] Shanguan MJ, Wang F, Zhang HG, et al. Effects of inulin on growth performance, immune organs indices and serum immunoglobulin of laying chicklings[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(1): 118-122 (in Chinese)
上官明军, 王芳, 张红岗, 等. 菊粉对蛋雏鸡生长性能、免疫器官指数和血清免疫球蛋白的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(1): 118-122
- [23] Xiong ZW, Zheng Y, Lan Y, et al. Effect of inulin-supplemented yogurt on immune organ indexes and serum immunoglobulin in mice[J]. Food Science, 2014, 35(21): 216-218 (in Chinese)
熊政委, 郑韵, 兰洋, 等. 菊糖酸奶对小鼠免疫器官指数和血清免疫球蛋白的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 216-218
- [24] Hasisurong, Du XY, Jiang JS, et al. Study on immune stimulating properties of compound butafosfan solution in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(7): 574-578 (in Chinese)
哈斯苏荣, 杜小燕, 蒋金书, 等. 复方丁氨丙磷溶液对小鼠免疫机能的影响[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(7): 574-578
- [25] Hu YJ, Lin YC, Zheng L, et al. The effect of dietary active yeast supplement on performance and immunity of early weaned piglets[J]. Acta Zoonutrimenta Sinica, 2003, 15(4): 49-53 (in Chinese)
- 胡友军, 林映才, 郑黎, 等. 活性酵母对早期断奶仔猪生产性能和免疫机能的影响[J]. 动物营养学报, 2003, 15(4): 49-53
- [26] Wu SL, Liu F, Luo XQ, et al. Effect of Yacon powder on intestinal flora in mice[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2012, 37(2): 42-45 (in Chinese)
吴三林, 刘芳, 罗小琴, 等. 灌服雪莲果粉对小鼠肠道菌群的影响[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(2): 42-45
- [27] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118
- [28] Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, et al. Overview of gut flora and probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 41(2): 85-101
- [29] Qu MR, Ling BM, Lu DX, et al. Effect of fructooligosaccharides infusion on rumen fermentation characteristic in sheep[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2006, 37(8): 779-784 (in Chinese)
瞿明仁, 凌宝明, 卢德勋, 等. 灌注果寡糖对生长绵羊瘤胃发酵功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(8): 779-784
- [30] Ling BM, Qu MR, Lu DX, et al. Effects of functional oligosaccharides on the rumen fermentation of the growing sheep in vitro[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(2): 129-134 (in Chinese)
凌宝明, 瞿明仁, 卢德勋, 等. 利用体外法研究功能性寡糖对生长绵羊瘤胃发酵特性的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(2): 129-134
- [31] Wei G, Ba CF. Effects of traditional Chinese medicine compound on intestinal flora and activity of digestive enzymes in mice[J]. Feed Research, 2014(21): 86-88 (in Chinese)
魏刚, 巴彩凤. 中药复方对小鼠肠道菌群和消化酶活性的影响[J]. 饲料研究, 2014(21): 86-88