



常振宇, 董海龙, 叶炳涛, 陈永旭, 曾江勇, 吴庆侠. 乳酸杆菌对牦牛小肠黏膜屏障的保护作用及机制[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(3):155-163.

CHANG Zhenyu, DONG Hailong, YE Bingtao, CHEN Yongxu, ZENG Jiangyong, WU Qingxia. Protective effect and mechanism of *Lactobacillus* on the mucosal barrier of the small intestine in yaks[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(3):155-163.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.03.14

乳酸杆菌对牦牛小肠黏膜屏障的保护作用及机制

常振宇¹ 董海龙¹ 叶炳涛¹ 陈永旭¹ 曾江勇² 吴庆侠^{1*}

(1. 西藏农牧学院 动物科学学院, 西藏 林芝 860000;

2. 西藏自治区农牧科学院 畜牧兽医研究所, 拉萨 850000)

摘要 为探讨乳酸杆菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)对犏牦牛大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)所致小肠黏膜屏障损伤的治疗机制, 本研究将24头健康犏牦牛随机分为4组: 空白对照组、模型组(*E. coli* O78)、低LAB组(*E. coli* O78+ 1×10^7 CFU LAB)和高LAB组(*E. coli* O78+ 1×10^{11} CFU LAB)。HE染色评估犏牦牛小肠病理变化, 并计算小肠各肠段肠绒毛长度(VH)与隐窝深度(CD)比值(V/C), Western blot检测小肠黏膜p38和MAPK蛋白表达水平。结果表明: 1) *E. coli* O78处理的模型组犏牦牛小肠绒毛排列紊乱, 隐窝深度增加, 且界限模糊, 黏膜固有层和下层有炎性细胞浸润, 经LAB干预治疗, 犏牦牛小肠绒毛组织病理结构得到改善。2) 模型组小肠VH指数与V/C比值显著低于空白对照组, 而随着LAB干预治疗剂量增加, 小肠VH指数和V/C比值升高, 其中高LAB组VH指数显著高于模型组和低LAB组($P<0.05$), 同时高LAB组V/C比值显著高于模型组($P<0.05$), 且高LAB组VH指数和V/C比值与对照组对比无显著性差异($P>0.05$)。3) 与对照组相比, 模型组p38和MAPK蛋白表达水平极显著升高($P<0.01$), 且p38和MAPK蛋白表达水平随着LAB干预治疗剂量的增加而降低, 其中高LAB组p38和MAPK蛋白表达水平显著低于模型组和低LAB组, 与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。综上, LAB可通过改善小肠形态结构, 调节p38、MAPK等MAPK相关通路蛋白表达, 对*E. coli* O78所致的犏牦牛腹泻起到治疗作用。本研究为益生菌抑菌产品的研发提供一定理论基础。

关键词 牦牛; 乳酸杆菌; 大肠埃希氏菌; 肠道黏膜; 保护机制

中图分类号 823.8+5

文章编号 1007-4333(2024)03-0155-09

文献标志码 A

Protective effect and mechanism of *Lactobacillus* on the mucosal barrier of the small intestine in yaks

CHANG Zhenyu¹, DONG Hailong¹, YE Bingtao¹, CHEN Yongxu¹, ZENG Jiangyong², WU Qingxia^{1*}

(1. Animal Science College, Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Tibet Nyingchi 860000, China;

2. Tibet Livestock Research Institute, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Science, Lhasa 850000, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the therapeutic effects and mechanisms of *lactic acid bacteria* (LAB) on intestinal mucosal barrier damage caused by *E. coli* in calf yaks. A total of 24 healthy calf yaks were randomly divided into four groups: control group, model group (*E. coli* O78), low-dose LAB group (*E. coli* O78+ 1×10^7 CFU LAB), and high-dose LAB group (*E. coli* O78+ 1×10^{11} CFU LAB). The morphologic evaluation of small intestine was processed by HE staining, and the ratio of villus height (VH) to crypt depth (CD) in each segment of small intestine was calculated (C/V). The expression levels of p38

收稿日期: 2023-03-28

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(32160857); 西藏自治区科技重大专项(XZ202101ZD0002N-05-01)

第一作者: 常振宇(ORCID:0000-0001-7306-3641), 讲师, 主要从事畜禽营养代谢病与中毒病方面的研究, E-mail: 1782492444@qq.com

通讯作者: 吴庆侠(ORCID:0000-0002-8818-6107), 教授, 主要从事高原动物病理的研究, E-mail: 1406449919@qq.com

and MAPK proteins in small intestine were detected by Western blot. The results showed that: 1) In the model group, calf yaks were treated with *E. coli* O78, the villi of small intestine of calf yaks were disorderly arranged, the crypt were deepen, and the boundary was fuzzy. There were inflammatory cell infiltration in the lamina propria and submucosa. After the intervention of LAB, the histopathological structure of small intestine villi of calf yaks were improved. 2) The VH index and V/C ratio of small intestine in the model group were significantly lower than those in the control group. With the increase of LAB intervention dose, the VH index and V/C ratio of small intestine in the high-dose LAB group were significantly higher than those in the model group and the low-dose LAB group ($P < 0.05$), while the V/C ratio in the high-dose LAB group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in VH index and V/C ratio between the high-dose LAB group and the control group ($P > 0.05$). 3) Compared with the control group, the expression levels of p38 and MAPK proteins in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expression levels of p38 and MAPK decreased with the increase of LAB intervention dose. The expression levels of p38 and MAPK proteins in the high-dose LAB group were significantly lower than those in the model group and the low-dose LAB group, and there was no significant difference compared with the control group ($P > 0.05$). In conclusion, the LAB can improve the morphology and structure of small intestine, regulate the expression of p38 and MAPK proteins, and play a role in treatment of *E. coli* O78 induced diarrhea in calf yaks, which provides a theoretical basis and experimental basis for the research and development of probiotic products.

Keywords yak; Lactic acid bacteria; *Escherichia coli*; intestinal mucosa; protection mechanism

牦牛是青藏高原的特有牛种,为西藏农牧民的衣食住行做出了贡献,在当地农牧结构中发挥着至关重要的作用^[1]。犏牦牛大肠埃希氏菌病(俗称“牦牛瘦死病”)是牦牛养殖业的常见疾病,以腹泻、血便、高热和咳嗽为典型症状^[2],具有极高的致死率,在川藏地区尤为常见^[3]。通常,牧民通过使用抗生素以及对牦牛注射疫苗的方式防治该病发生,但随着抗生素的过度使用,耐药菌株也不断增多^[4-6]。因此寻找一种可替代抗生素的药物显得日益迫切。

益生菌是一类可调节肠道菌群平衡、保护肠道黏膜及促进肠道吸收营养的微生物^[7],包括乳酸菌属、双歧杆菌属、枯草芽孢杆菌属等,在国内外广泛应用于腹泻病的治疗^[8-9]。乳酸杆菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)是一类益生菌,对碳水化合物进行发酵可产生大量乳酸,并能通过复杂的调控通路改善肠道黏膜屏障,对肠道功能的正常发挥有重要促进作用^[10-11]。研究报道称,LAB对大肠杆菌具有良好的防治作用,日粮中混合LAB可减轻大肠杆菌引起的小鼠肝脏和肠道炎症^[12]。范国歌等^[13]研究发现,含有高占比LAB成分的高效复合益生菌对大肠杆菌具有良好的抑制作用。易力等^[14]通过体外抑菌试验发现,肠源性LAB对同源性和部分异源性大肠杆菌具有生长抑制作用。此外,有报道称日粮中添加LAB可降低肠毒性大肠杆菌对断奶仔猪生长性

能的抑制作用,LAB可通过提高粘蛋白的表达并阻止大肠杆菌对猪肠上皮细胞的粘附,并改善仔猪空肠绒毛高度,起到良好的治疗效果^[15-18]。总之,LAB作为一种来源广泛,易于生产的益生菌,在代替抗生素防治牦牛大肠杆菌病具有潜在的功效。

动物肠道是食物消化和营养吸收的主要场所,同时肠道黏膜所形成的黏膜屏障也是抵御致病菌、内毒素等有害物质的重要防线^[19-20]。当大肠埃希氏菌进入肠道,其表面存在的大量黏附物质会在小肠或结肠表面黏附定植,随后分泌出肠毒素刺激小肠上皮细胞分泌环腺苷酶,从而引起小肠上皮细胞分泌大量的环磷酸腺苷(cAMP),而cAMP会激活一系列的蛋白酶,促使非神经细胞膜上的特异性蛋白发生磷酸化,不仅改变构型,也会改变细胞膜的通透性,释放大量水分及黏液致使机体发生腹泻。p38和MAPKs是一类保守的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,在诱导炎症反应中发挥重要作用。过去的研究已证实致病性大肠杆菌感染可介导p38/MAPK途径引发包括肠道在内的宿主细胞炎症^[21-22]。同时,报道指出LAB可通过MAPK信号通路减轻细胞炎症、氧化应激、以及异常的增殖和凋亡,以缓解肠道疾病症状^[23]。尽管过去的研究在不同细胞系、动物载体上报道了LAB对肠道的保护作用以及对致病性大肠杆菌的防治作用以及相关机制,但关于LAB

对防治犏牦牛大肠杆菌病的机制研究,目前鲜有报道。研究LAB对犏牦牛肠道菌群及肠道黏膜屏障的影响,对替代抗生素治疗的益生菌制剂的研发具有重要意义。本研究探究了乳酸杆菌(LAB)对犏牦牛大肠埃希氏菌所致小肠黏膜屏障损伤的治疗机制,为后期研发牦牛专用益生菌制剂及其应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验动物分组及处理

试验动物分组及处理如表1所示:选取24头西藏林芝本地40~50日龄健康犏牦牛,按照每组6头的方式将其随机分配为4组:空白对照组、模型组(*E. coli*

O78)、低LAB组(低剂量乳酸杆菌, 1×10^7 CFU/mL)和高LAB组(高剂量乳酸杆菌, 1×10^{11} CFU/mL)。空白对照组犏牦牛每日灌服生理盐水10 mL,持续10 d;模型组犏牦牛每日灌服生理盐水10 mL,持续5 d,第6天灌服生理盐水配制的*E. coli* O78 10 mL,总量为 5×10^8 CFU,第7~10天每天灌服生理盐水10 mL;低LAB组犏牦牛1~6 d与模型组一致,第7~10天每天灌服生理盐水配制的LAB制剂10 mL,总量为 10^7 CFU。高LAB组犏牦牛1~6 d与模型组一致,第7~10天每天灌服生理盐水配制的LAB制剂10 mL,总量为 10^{11} CFU。第11天宰杀牦牛,每头牛分别取十二指肠、空肠和回肠段固定于10%的中性福尔马林及液氮中待进一步试验。

表1 试验动物分组与处理
Table 1 Groups and treatment of Yaks

组别 Group	试验周期/d Experiment period			
	1~5	6	7~10	11
空白对照组 Blank control group	灌服生理盐水	灌服生理盐水	灌服生理盐水	宰杀采样
模型组 Model group	灌服生理盐水	灌服 <i>E. coli</i> O78	灌服生理盐水	宰杀采样
低LAB组 Low-dose LAB group	灌服生理盐水	灌服 <i>E. coli</i> O78	灌服低剂量LAB	宰杀采样
高LAB组 High-dose LAB group	灌服生理盐水	灌服 <i>E. coli</i> O78	灌服高剂量LAB	宰杀采样

1.2 试验菌株

大肠埃希氏菌:从腹泻牦牛肠道分离牦牛源病原性*E. coli* O78,分离自西藏自治区林芝市腹泻牦牛。在使用前,取出保存在-80℃冰箱的乳酸杆菌菌株,分别接种MRS液体培养基、营养肉汤,接种完成后将MRS液体培养基置于37℃恒温无氧条件下培养24 h,营养肉汤置于37℃恒温有氧条件下培养24 h。连续接种3代后,菌株活性恢复正常保存备用。乳酸杆菌Lac-2为西藏农牧学院动物科学学院临床重点实验室分离培养,体外抑菌试验显示该菌株具有良好的抑菌特性(大肠杆菌、沙门菌和葡萄球菌)^[24]。使用前一天复苏菌株,接种于MRS液体培养基。

1.3 主要试剂

p38、MAPK Rabbit pAb 一抗(ABclonal), Goat Anti Rabbit 二抗(Immunoway)均购自博士德生物

工程有限公司;RIPA裂解液(强)、PMSF(蛋白酶抑制剂混合物-通用型)购自成都市科龙化工试剂厂;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司。

1.4 组织切片HE染色

将固定在中性福尔马林溶液的组织器官修块,并使用4%中性多聚甲醛溶液固定24 h。随后进行梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色、封片,随后使用光学显微镜进行观察、拍照,并进一步分析。

1.5 Western blot检测p38和MAPK蛋白表达量

取犏牦牛小肠肠道黏膜用于肠道黏膜组织总蛋白提取,黏膜组织经过破碎,加入含PMSF的RIPA裂解液处理,并通过低温高速离心获得肠道黏膜组织蛋白原液。取部分原液通过BCA法测定原液蛋白含量,并使用Loading Buffer通过煮沸的方式使蛋白变性。取等量蛋白样进行SDS-PAGE凝

胶电泳,并将蛋白电转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭,随后使用p38和MAPK一抗(1:1 000)在4℃的环境下孵育抗体16 h。室温孵育二抗(1:10 000),2 h,ECL显影液处理,采用凝胶成像分析仪曝光成像。使用ImageJ图像分析软件对PVDF膜上的蛋白条带灰度值进行分析,以 β -actin蛋白作为内参蛋白,对p38和MAPK蛋白进行相对定量分析。

1.6 统计学处理

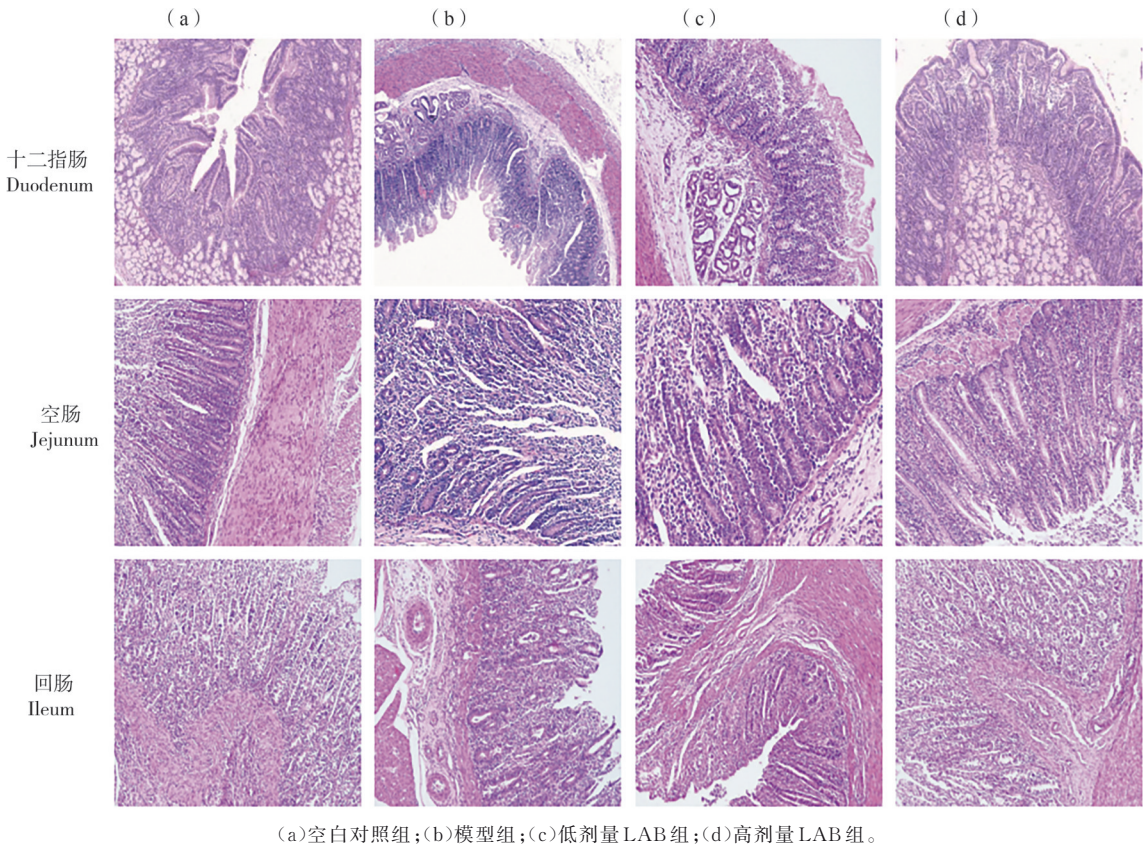
各组犍牦牛小肠绒毛长度和隐窝深度采用Image-Pro Plus 6.0软件进行测量,用GraphPad Prism 8软件进行柱状图制作,本研究所得数据以均数±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示,首先实行方差齐性检验,方差齐时,组间比较应用单因素的方差分析,多个样本均数的多重分析依据LSD-*t*法检验,方差不齐时采用Dunnett's检验。数据若不符合正态分布

选择秩和检验。其中, $P<0.01$ 表示差异极显著, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同剂量的LAB对感染大肠杆菌犍牦牛组织病理学的影响

如图1所示,空白对照组牦牛十二指肠、空肠、回肠黏膜形态结构完整,肠绒毛内柱状细胞排列整齐,细胞结构正常,隐窝深度较浅,且界限明显,无病理损伤(图1(a));模型组牦牛各肠段肠绒毛顶端缺失,隐窝深度增加,且界限不明显,黏膜固有层和黏膜下层有炎性细胞浸润(图1(b));低LAB组各肠段黏膜固有层和黏膜下层有炎性细胞浸润及轻微病理损伤(图1(c));低LAB组各肠段肠绒毛内柱状细胞排列较整齐,隐窝深度较浅,无病理损伤(图1(d))。结果表明,LAB对感染*E. coli* O78犍牦牛肠道结构具有保护作用,使其免受侵害。



(a)空白对照组;(b)模型组;(c)低剂量LAB组;(d)高剂量LAB组。
(a)Blank control group; (b) Model group; (c) Low-dose LAB group; (d) High-dose LAB group。

图1 LAB对牦牛十二指肠、空肠和回肠组织病理变化的影响(HE染色×400)

Fig.1 Histopathological sections of the duodenum, jejunum and ileum of the yak (HE staining ×400)

2.2 不同剂量的 LAB 对感染大肠杆菌犍牦牛各肠段绒毛长度、隐窝深度及 V/C 比值的影响

如表 2 所示,与空白对照组相比,模型组、低 LAB 组十二指肠、空肠以及回肠段绒毛长度(Villus height, VH)显著降低($P<0.05$);模型组小肠 VH 与隐窝深度(Crypt depth, CD)比值(V/C)与空白对照组相比显著

降低($P<0.05$);与模型组 and 低 LAB 组相比,高 LAB 组犍牦牛肠道损伤状况得到显著改善,并能显著升高犍牦牛各肠段 V/C 比值($P<0.05$)。结果表明,高剂量和低剂量 LAB 干预均能通过调节 VH 和 CD 等肠道结构发挥治疗作用,以保护小肠免受 *E. coli* O78 的侵害,且高剂量 LAB 治疗效果较低剂量 LAB 更为显著。

表 2 LAB 对牦牛不同肠段黏膜结构的影响
Table 2 Effects of LAB on mucosal structure in different intestinal segments of yaks

项目 Item		空白对照组	模型组	低 LAB 组	高 LAB 组
小肠黏膜	指标/ μm	Blank control	Model group	Low-dose LAB	High-dose LAB
Small intestinal mucosa	Index	group		group	group
十二指肠黏膜 Duodenal mucosa	绒毛长度(VH)	263.23 $\pm$ 23.21 a	208.42 $\pm$ 15.66 b	215.67 $\pm$ 24.03 b	260.75 $\pm$ 26.76 a
	隐窝深度(CD)	131.76 $\pm$ 23.84	154.46 $\pm$ 25.04	141.82 $\pm$ 24.81	137.31 $\pm$ 22.85
	V/C	1.99 $\pm$ 0.29 a	1.34 $\pm$ 0.35 b	1.52 $\pm$ 0.29 bc	1.89 $\pm$ 0.33 ac
空肠黏膜 Jejunal mucosa	绒毛长度(VH)	663.14 $\pm$ 27.29 a	506.28 $\pm$ 19.91 b	556.68 $\pm$ 23.39 b	616.68 $\pm$ 23.39 a
	隐窝深度(CD)	145.75 $\pm$ 24.29	174.42 $\pm$ 31.77	162.37 $\pm$ 25.14	148.71 $\pm$ 31.21
	V/C	4.55 $\pm$ 0.42 a	2.90 $\pm$ 0.32 b	3.42 $\pm$ 0.38 b	4.48 $\pm$ 0.47 a
回肠黏膜 Ileal mucosa	绒毛长度(VH)	358.03 $\pm$ 22.21 a	275.04 $\pm$ 18.38 b	332.77 $\pm$ 29.92 c	360.49 $\pm$ 21.14 ac
	隐窝深度(CD)	170.67 $\pm$ 21.36	201.47 $\pm$ 23.63	184.12 $\pm$ 22.58	178.31 $\pm$ 29.57
	V/C	2.09 $\pm$ 0.33 a	1.37 $\pm$ 0.31 b	1.80 $\pm$ 0.38 bc	2.02 $\pm$ 0.29 ac

注:同行数据肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$);小写字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Different lowercase letters of shoulder tags in peer data indicate significant differences ($P<0.05$); The same lowercase letter means the difference is not significant ($P>0.05$).

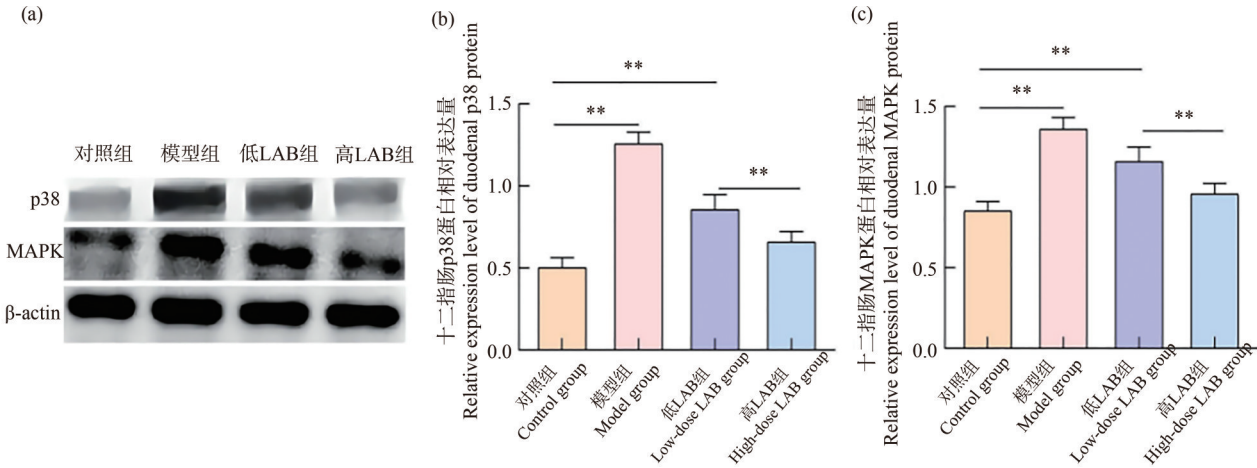
2.3 不同剂量的 LAB 对感染大肠杆菌犍牦牛肠道黏膜屏障 p38 和 MAPK 蛋白表达的影响

结果表明(图 2~4),与对照组相比,模型组 p38 和 MAPK 蛋白在十二指肠、空肠和回肠中的相对表达量极显著升高($P<0.01$);经不同剂量 LAB 干预治疗后, p38 和 MAPK 蛋白表达水平随 LAB 剂量升高而降低,其中高 LAB 组 p38 和 MAPK 蛋白表达水平极显著低于低 LAB 组($P<0.01$);此外,高 LAB 组 p38 和 MAPK 蛋白表达水平与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。总之,不同剂量 LAB 均可通过降低 *E. coli* O78 侵害小肠黏膜 p38 和 MAPK 蛋白表达量表达发挥治疗作用。

3 讨论与结论

小肠是动物机体营养物质消化吸收的重要场所,绒毛长度的增加可以导致小肠吸收面积的增

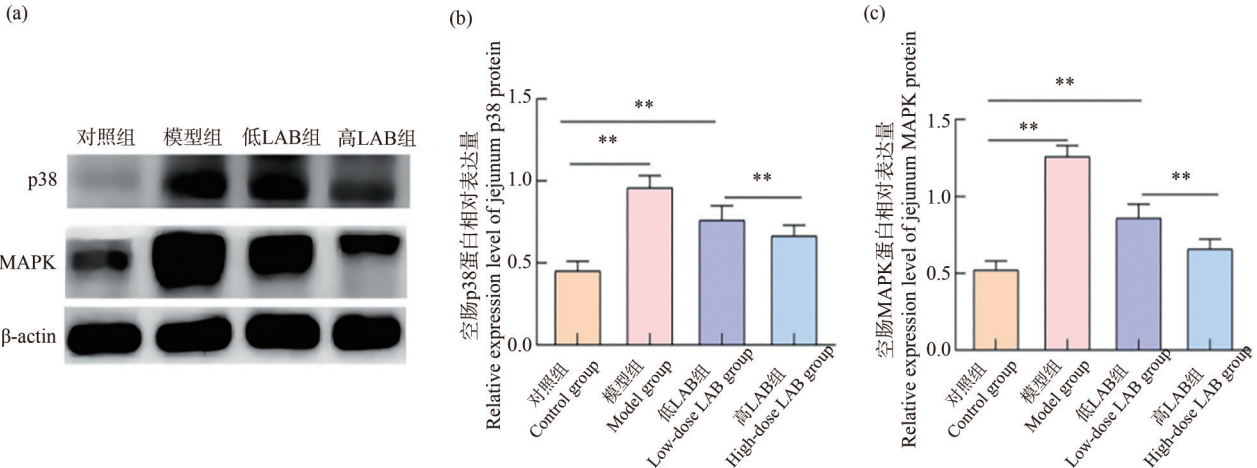
加,而肠绒毛越长、黏膜上皮细胞越多、肠黏膜隐窝越浅,说明小肠消化吸收能力越高^[26-27]。本研究表明,模型组的牦牛小肠绒毛均比空白对照组的长度明显减少,但高 LAB 干预组的肠绒毛长度显著高于模型组。由此表明高剂量 LAB 对小肠绒毛具有保护和修复作用。小肠隐窝是绒毛组织基底膜和顶膜高表达的肌球蛋白陷入固有层形成的管状腺,开口于相邻绒毛之间。小肠隐窝深度是反映细胞生成率的重要指标,上皮细胞不断从隐窝基部向绒毛端迁移,分化为具有吸收能力的绒毛细胞,如果这一过程减慢,隐窝基部的细胞生成率就会降低,隐窝也会随之变浅^[28]。本研究中的空白对照组各肠段隐窝深度小于模型组 and 低 LAB 干预组,与高 LAB 干预组差异不显著。绒毛长度(VH)与隐窝深度(CD)的比值是反映出小肠结构完整性的重要指标之一^[29], V/C 比值递减,表示小肠消化吸收功能



(a) p38 和 MAPK 蛋白表达; (b) p38 蛋白表达量分析; (c) MAPK 蛋白表达量分析。
(a) Expression of p38 and MAPK; (b) Evaluation of p38 protein expression level; (c) Evaluation of MAPK protein expression level.
**表示差异极显著 ($P<0.01$), *表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。
** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), * indicates significant difference ($P<0.05$). The same below.

图2 p38 和 MAPK 蛋白在十二指肠组织中的表达分析

Fig. 2 Expression levels of p38 and MAPK in duodenum



(a) p38 和 MAPK 蛋白表达; (b) p38 蛋白表达量分析; (c) MAPK 蛋白表达量分析。
(a) Expression of p38 and MAPK; (b) Evaluation of p38 protein expression level; (c) Evaluation of MAPK protein expression level.
**表示差异极显著 ($P<0.01$), *表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。
** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), * indicates significant difference ($P<0.05$). The same below.

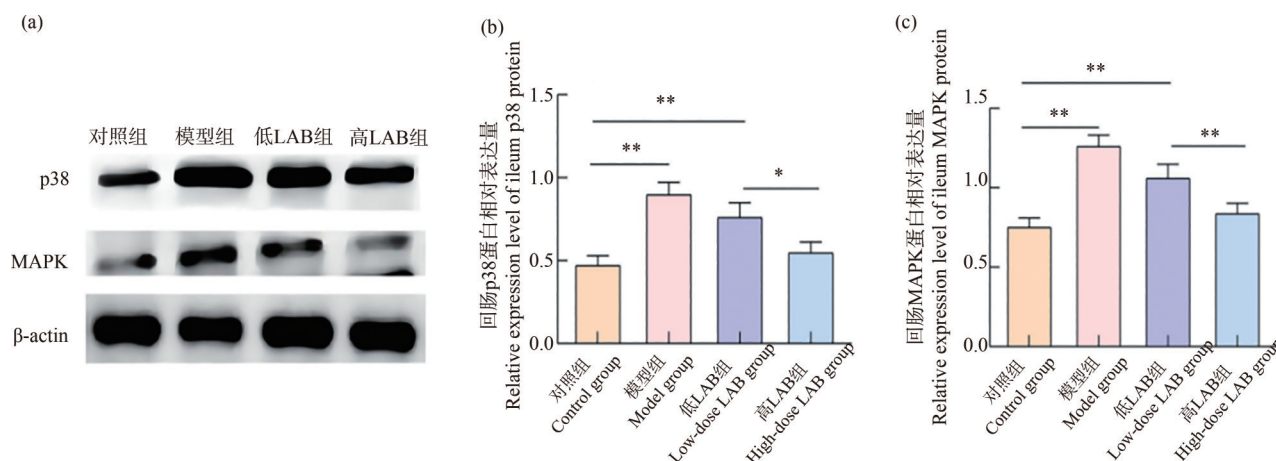
图3 p38 和 MAPK 蛋白在空肠组织中的表达分析

Fig. 3 Expression levels of p38 and MAPK protein in jejunum

减退; V/C 比值升高, 表示其消化吸收功能增强、腹泻减少、生长发育加快^[30]。本研究表明高 LAB 干预组各肠段的 V/C 值显著高于模型组, 而模型组中 *E. coli* O78 会导致犊牛肠道 VH 和 V/C 的极显著降低, 进一步说明高剂量乳酸杆菌对犊牛肠道黏膜的结构完整性有较好的保护作用, 减少了 *E. coli* O78 所致的肠道黏膜损伤, 可有效治疗犊牛腹泻症状。

肠道的机械屏障作用主要由细胞间的紧密连

接、黏附连接、肠道黏膜上皮细胞等组成^[31-33]。Zonulin 是动物肠道内目前所知唯一的调节紧密连接的因子, 可调节肠道通透性及消化道壁细胞紧密连接的渗透性^[34-35]。而 MAPK 信号通路在调节膜蛋白 (Occludin)、连蛋白 (Zonulin) 等表达及其磷酸化过程中起着关键作用^[36-37], 益生菌 (如乳酸杆菌) 可以通过抑制 p38 和 MAPK 的表达来调控 Zonulin, 从而起到保护肠道黏膜屏障的作用。p38 和 MAPK 属于 MAPKs 蛋白激酶家族成员之一, 其存



(a) p38 和 MAPK 蛋白; (b) p38 蛋白表达量分析; (c) MAPK 蛋白表达量分析。

(a) Protein of p38 and MAPK; (b) Evaluation of p38 protein expression level; (c) Evaluation of MAPK protein expression level.

图4 p38 和 MAPK 蛋白在回肠组织中的表达

Fig. 4 Expression levels of p38 and MAPK protein in ileum

在于胞浆内,主要参与细胞增殖、分化和凋亡等^[38-39]。p38、MAPK 信号通路是细胞适应环境变化的主要信号转导通路之一,对于细胞的应激性、适应性等生理过程至关重要^[40-41],p38 和 MAPK 的激活与诱导细胞凋亡的正相关性已被证实^[42]。通过这一研究发现,模型组 p38 和 MAPK 的蛋白表达水平均显著或极显著高于对照组和 LAB 组,证明模型组犏牦牛发病可能与这 2 种蛋白的表达有一定关联。p38 和 MAPK 信号通路被激活后,造成细胞凋亡,肠道通透性发生改变。LAB 组犏牦牛肠道中 p38 和 MAPK 的蛋白表达水平显著下降,说明 LAB 可抑制这 2 种蛋白的表达,对细胞凋亡起到积极调控作用,从而有助于犏牦牛肠道功能的正常发挥。与低剂量 LAB 组相比,高剂量 LAB 在降低 p38 和 MAPK 蛋白的表达水平上更优,这为以后临床选择药物剂量提供思路,并为今后研发牦牛专用益生菌制剂提供一定的理论和技术支撑。目前,乳酸杆菌在生产实践中的应用正在逐步加强,以乳酸杆菌为基础制备的各种微生态制剂越来越广泛地应用于食品工业和医疗保健等方面。乳酸杆菌除了能够维护肠道健康,还具有促进营养物质吸收、调节机体脂质代谢、抗肿瘤、抗衰老等功效,其作用机制及应用前景值得进一步探讨与研究。并且乳酸杆菌维护肠道健康的作用具有种属差异,不同种属的乳酸杆菌,其主要作用途径和部位可能不同,今后还有待进一步研究。

综上,高剂量 LAB 可通过改善小肠绒毛高度、

隐窝深度来调节小肠形态结构,同时,LAB 通过抑制 *E. coli* O78 诱导的肠道黏膜 p38 和 MAPK 等 MAPK 相关通路蛋白表达,对 *E. coli* O78 所致的犏牦牛腹泻起到治疗作用。

参考文献 References

- [1] Liu X J, Gao J, Liu S Z, Cheng Y F, Hao L Z, Liu S J, Zhu W Y. The uniqueness and superiority of energy utilization in yaks compared with cattle in the highlands: A review [J]. *Animal Nutrition*, 2023, 12: 138-144
- [2] Diao N C, Gong Q L, Li J M, Zhao D, Zhao B, Ge G Y, Li D L, Shi K, Du R, Li D. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in yaks between 1987 and 2019 in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 144: 104185
- [3] Shi Q J, Guo Y Y, Engelhardt S C, Weladji R B, Zhou Y, Long M, Meng X X. Endangered wild yak (*Bos grunniens*) in the Tibetan Plateau and adjacent regions: Population size, distribution, conservation perspectives and its relation to the domestic subspecies [J]. *Journal for Nature Conservation*, 2016, 32: 35-43
- [4] 汪洋, 易力, 王红宁, 李建文. 川西北牦牛致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(5): 36-37
Wang Y, Yi L, Wang H N, Li J W. Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Escherichia coli* from yaks in northwest Sichuan [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(5): 36-37 (in Chinese)
- [5] 孟含, 陈娟, 龙虎, 佟尧, 唐俊妮. 牦牛屠宰环境中大肠杆菌分离菌株的病原学特征研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(3): 80-84, 88
Meng H, Chen J, Long H, Tong Y, Tang J N. Pathogenetic characteristics of *Escherichia coli* isolates strains in yak slaughtering environment [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(3): 80-84, 88 (in Chinese)
- [6] 梁圆, 张丹丹, 程景, 李博, 靳光, 王栋才, 张元庆. 犏牦牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(5): 52-57, 63

- Liang Y, Zhang D D, Chen J, Li B, Jin G, Wang D C, Zhang Y Q. Isolation, identification and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* from Calf[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(5): 52-57, 63 (in Chinese)
- [7] 贡嘎, 王刚, 罗润波, 陈明勇, 索朗斯珠. 西藏牦牛源大肠杆菌分离株的致病性及遗传进化分析研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(10): 57-62
- Gongga, Wang G, Luo R B, Chen M Y, Suolangsizhu. Pathogenic and phylogenetic analysis on the *Escherichia coli* derived from Tibetan yak [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(10): 57-62 (in Chinese)
- [8] Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715-1731
- [9] El-Saadony M T, Alagawany M, Patra A K, Kar I, Tiwari R, Dawood M A O, Dhama K, Abdel-Latif H M R. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 117: 36-52
- [10] Reque P M, Brandelli A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114: 1-10
- [11] Langston C W, Bouma C. A study of the microorganisms from grass silage [J]. *Applied Microbiology*, 1960, 8(4): 223-234
- [12] Zhong Y F, Fu D Y, Deng Z X, Tang W J, Mao J D, Zhu T, Zhang Y, Liu J X, Wang H F. Lactic acid bacteria mixture isolated from wild pig alleviated the gut inflammation of mice challenged by *Escherichia coli* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 822754
- [13] 范国歌, 孙俊伟, 左瑞雨, 常娟, 管庆丰, 尹清强. 复合益生菌对大肠杆菌的抑制作用[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(8): 68-72
- Fan G G, Sun J W, Zuo R Y, Chang J, Guan Q F, Yin Q Q. Inhibition of complex probiotics on *Escherichia coli* [J]. *Animal husbandry and Veterinary medicine*, 2011, 43(8): 68-72 (in Chinese)
- [14] 易力, 刘璐, 杨伟平, 张海艳. 3种肠源性乳酸杆菌对大肠杆菌的体外抑菌效果[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(1): 96-98
- Yi L, Liu L, Yang W P, Zhang H Y. *In vitro* antibacterial test of three enterogenous lactobacillus against *Escherichia coli* [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(1): 96-98 (in Chinese)
- [15] 张连忠. 植物乳杆菌对感染肠毒性大肠杆菌断奶猪生长性能、绒毛形态及粪微生物含量的影响[J]. 中国饲料, 2021(18): 45-48
- Zhang L Z. Effect of lactobacillus plantarum on growth performance, villus morphology and fecal microorganism contents of weaned pigs infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *China Feed*, 2021(18): 45-48 (in Chinese)
- [16] Castro J, Barros M M, Araujo D, Campos A M, Oliveira R, Silva S, Almeida C. Swine enteric colibacillosis: Current treatment avenues and future directions[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022(9): 981207
- [17] Ksonzekova P, Bystricky P, Vlckova S, Patoprsty V, Pulzova L, Mudronova D, Kubaskova T, Csank T, Tkacikova L. Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E coli* to epithelial cells and inflammatory response[J]. *Carbohydr Polymers*, 2016 (141): 10-19
- [18] Ren C C, Dokter-Fokkens J, Figueroa L S, Zhang Q X, Zhang H, Faas M M, De V P. Lactic acid bacteria may impact intestinal Barrier function by modulating goblet cells[J]. *Molecular nutrition & food research*, 2018 (62): 1700572
- [19] Shakir S, Zaidi S S E A, Hashemi F S G, Nyirakanani C, Vanderschuren H. Harnessing plant viruses in the metagenomics era: From the development of infectious clones to applications[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(3): 297-311
- [20] Choudhary P, Kathuria D, Suri S, Bahndral A, Kanthi Naveen A. Probiotics- its functions and influence on the ageing process: A comprehensive review[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102389
- [21] Wang F, Liu C, Ren L Z, Li Y Y, Yang H M, Yu Y, Xu W P. Sanziguben polysaccharides improve diabetic nephropathy in mice by regulating gut microbiota to inhibit the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signalling pathway[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2023, 61(1): 427-436
- [22] Caspary W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55(1): 299S-308S
- [23] Zhuang X N, Chen Z J, He C X, Wang L, Zhou R X, Yan D P, Ge B X. Modulation of host signaling in the inflammatory response by enteropathogenic *Escherichia coli* virulence proteins [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2017, 14(3): 237-224
- [24] Wu Q X, Zhang H, Mehmood K, Li K, Chang Z Y, Jiang X, Tian F Y, Nabi F, Iqbal M, Ijaz M, Rehman M U, Dong H L, Li J K. Biological characteristics and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from free-range yaks (*Bos grunniens*) in qinghai-tibet plateau [J]. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2018, 20: 902-906
- [25] Yen H, Karino M, Tobe T. Modulation of the inflammasome signaling pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016(6): 89
- [26] Zhao T, Wang H, Liu Z J, Liu Y, Ji D, Li B, Huang X D. Recent perspective of *Lactobacillus* in reducing oxidative stress to prevent disease[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(3): 769
- [27] Samanya M, Yamauchi K E. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var natto [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(1): 95-104
- [28] 王子旭, 余锐萍, 陈越, 袁莉, 许江城, 康迪. 日粮锌硒水平对肉鸡小肠黏膜结构的影响[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(7): 18-21
- Wang Z X, She R P, Chen Y, Yuan L, Xu J C, Kang D. Effect of different levels of zinc and selenium in diet on the structure of mucosa epithelium in broiler small intestine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2003, 33(7): 18-21 (in Chinese)
- [29] Hampson D J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning[J]. *Research in Veterinary Science*, 1986, 40(1): 32-40
- [30] 王子旭. 锌硒互作对肉鸡肠黏膜结构及黏膜免疫相关细胞影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003
- Wang Z X. Effects of zinc and selenium interaction on intestinal mucosal structure and mucosal immune-related cells in broilers [D]. Beijing: China Agricultural University, 2003 (in Chinese)
- [31] Khoshbin K, Camilleri M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2020, 319(5): G589-G608
- [32] Dodd D, Spitzer M H, Van Treuren W, Merrill B D, Hryckowian A J, Higginbottom S K, Le A, Cowan T M, Nolan G P, Fischbach M A, Sonnenburg J L. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. *Nature*, 2017, 551 (7682): 648-652
- [33] Bischoff S C, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J D, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells J M. Intestinal permeability: A new target for disease prevention and therapy [J]. *BMC gastroenterology*, 2014, 14: 189
- [34] Wood Heickman L K, DeBoer M D, Fasano A. Zonulin as a potential

- putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity[J]. *Metabolism Research and Reviews*, 2020, 36(5): e3309
- [35] Hall K, Frederiksen B, Rewers M, Norris J M. Daycare attendance, breastfeeding, and the development of type 1 diabetes: The diabetes autoimmunity study in the young[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 203947
- [36] Chen X X, Ding Y L, Yang Y Q, Song C P, Wang B S, Yang S H, Guo Y, Gong Z Z. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 53-78
- [37] Bai J R, Zhang Y S, Tang C, Hou Y, Ai X P, Chen X R, Zhang Y, Wang X B, Meng X L. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 133:110985
- [38] Deng S L, Zhang B L, Reiter R J, Liu Y X. Melatonin ameliorates inflammation and oxidative stress by suppressing the p38 MAPK signaling pathway in LPS-induced sheep orchitis[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(12): 1277
- [39] Zhou R X, Qu Y, Huang Q, Sun X M, Mu D Z, Li X H. Recombinant CC16 regulates inflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy via the inhibition of the p38MAPK signaling pathway in the brain of neonatal rats with sepsis[J]. *Brain Research*, 2019, 1725: 146473
- [40] Kim Y G, Ohta T, Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, Yokokura T, Okada N, Danbara H. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- κ B and p38 MAP kinase signaling pathways[J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(4): 994-1005
- [41] 吕琴. 黄芪多糖调控 p38 MAPK/c-Jun/AQP5 通路对脾虚水湿不化大鼠水液代谢影响的研究[D]. 济南: 山东中医药大学 2021.
- Lv Q. Effect of Astragalus polysaccharide on water-liquid metabolism in rats with spleen deficiency and water-dampness dystrophy by regulating P38 MAPK/C-Jun/AQP 5 pathway [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2021 (in Chinese)
- [42] 张乐. 高通量药物筛选识别秋水仙碱作为甲状腺癌新型抑制剂的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016
- Zhang L. Study on screening and identification of colchicine as a new inhibitor of thyroid cancer with high throughput drugs [D]. Changchun: Jilin University, 2016 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 常振宇, 硕士, 讲师, 西藏农牧学院动物科学学院专任教师。主要从事高原畜禽营养代谢病与中毒病方面研究, 目前担任中国畜牧兽医学会兽医内科与临床诊疗学分会理事。主持西藏自治区科学技术厅项目 1 项, 获得西藏自治区西藏自治区科学技术奖“一等奖”, 参与国家自然科学基金基金项目 1 项, 以第一作者发表 SCI 论文 5 篇, 中文核心论文 6 篇、参与专利 3 项、参编教材 2 部。



通讯作者简介: 吴庆侠, 博士, 教授。主要从事高原动物健康养殖及高原动物疫病诊断与治疗方向的研究。主持国家自然科学基金 1 项、西藏自治区重点研发项目 1 项、西藏自治区自然科学基金 2 项。以第一作者发表 SCI 论文 3 篇。