

胃肠炎肉鸡肠黏膜及血清抗氧化因子和 5-羟色胺变化规律研究

褚秀玲¹,王进圣^{2*},董月斌²,苏建青^{1,2},刘思当^{3*}

1. 聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059

2. 山东凤祥股份有限公司, 山东 阳谷 252300

3. 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271000

摘要: 为阐明胃肠炎肉鸡的肠黏膜和血清抗氧化指标 SOD、GSH-Px、T-AOC 和 MAD 及炎症因子 5-羟色胺 (5-HT) 的含量变化规律。本实验以自然发病的胃肠炎肉鸡为研究对象, 采用 ELISA 法测定十二指肠、空肠、回肠和血清中的 SOD、GSH-Px、T-AOC 和 MAD 以及 5-HT 的含量。实验结果显示, 胃肠炎肉鸡的消化道和血清中的 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 在数值上都低于健康对照组, 而 MAD 的含量高于健康对照组, 绝大部分指标差异达到显著水平 ($P<0.05$), 其中十二指肠的抗氧化功能最低。胃肠炎肉鸡血清 5-HT 含量显著高于健康肉鸡 ($P<0.05$); A 组空肠和回肠, B、C 组十二指肠和空肠 5-HT 含量显著高于健康对照组 ($P<0.05$); 说明胃肠炎肉鸡的血清和肠黏膜 5-HT 含量明显上升, 抗氧化功能显著下降, 活性氧代谢产物明显增加。

关键词: 肉鸡; 消化道疾病; 抗氧化因子; 活性氧代谢产物; 5-羟色胺

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)03-0351-04

Study on the Changes of Antioxidant Factors and 5- Serotonin in Intestinal Mucosa and Serum of Gastroenteritis Broilers

CHU Xiu-ling¹, WANG Jin-sheng^{2*}, DONG Yue-bin², SU Jian-qing^{1,2}, LIU Si-dang^{3*}

1. College of Agriculture/Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

2. Shandong Fengxiang Group Limited Liability Company, Yanggu 2523002, China

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine/Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China

Abstract: This paper aims to elucidate the change of antioxidant indexes SOD, GSH-Px, T-AOC, MAD and inflammatory factor 5-HT in digestive tract mucosa and serum of broiler chickens with digestive tract diseases. The natural cases of broiler chickens with gastroenteritis were selected as research object. Duodenum, jejunum, ileum and the contents of SOD, GSH-Px, T-AOC, MAD and 5-HT in serum were determined by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA). The results showed the levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in the digestive tract and serum of broilers were significantly lower than those in healthy controls, the content of MAD was higher than that of healthy controls. Most index difference reached a significant level ($P<0.05$), the antioxidant function of the duodenum was lowest. The content of serum 5-HT in gastroenteritis broilers was significantly higher than that in healthy broilers ($P<0.05$). The content of 5-HT in jejunum and ileum of group A, duodenum and jejunum of group B,C, was significantly higher than that in healthy controls. The content of 5-HT in serum of gastroenteritis broiler and intestinal mucosa increased evidently, the antioxidant function decreased obviously and the active oxygen metabolites increased significantly.

Keywords: Broiler chickens; digestive tract; antioxidant; reactive oxygen metabolites; 5-HT

随着肉鸡规模化、集约化和标准化饲养方式的逐步推进, 生物安全措施的有效执行, 现代化肉鸡规模养殖场的常见传染性疾病得到了良好的防控^[1]。但是近年来高密度、快速生长的肉鸡经常发生以腹泻、拉料粪或棕红色粪便为特征的消化道疾病^[2], 该类疾病往往发病急, 发病率高, 剖检常表现腺胃炎、肌胃角质膜糜烂^[3]、小肠卡他性炎症, 肉鸡表现生长发育迟缓, 免疫功能下降和死亡率增加, 严重影响肉鸡的生长速度和养殖经济效益^[4]。

肉鸡的肠道不仅是营养物质消化吸收的最终场所, 也是机体防御体系的第一道屏障, 维护肠道健康对保障肉鸡生产至关重要。肠道是机体应激反应的中心, 各种应激因素会导致肠道功能紊乱, 从而引起炎症和组织损伤^[5]。自由基是机体进行氧化还原反应中产生的中间代谢产物, 正常情况下很快会被机体的抗氧化系统消灭, 但是在应激和疾病等情况下, 自由基会大量产生, 导致抗氧化因子严重消耗, 多余的自由基引起正常组织的损伤, 降低机体的抵抗力^[6]。5-羟色胺 (5-HT) 是参与

收稿日期: 2015-10-29

修回日期: 2015-11-09

基金项目: 山东凤祥股份有限公司博士后基金资助(130101)

作者简介: 褚秀玲(1968-),女,副教授,主要从事中药保健. E-mail:chuxiuling@lcu.edu.cn

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:wangjinsheng@fengxiang.com;E-mail:liusid@sda.edu.cn

调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质信号分子^[7],也是动物机体最为重要的炎症因子之一,5-HT 与胃肠道炎症及功能性消化不良等疾病密切相关^[8,9]。本研究以患胃肠炎肉鸡自然病例为研究对象,检测患病肉鸡小肠黏膜和血清的抗氧化因子、活性氧代谢产物和 5-羟色胺的含量变化,为肉鸡胃肠炎的诊断防治和发病机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化力(T-AOC)和丙二醛(MDA)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。鸡 5-HT 检测试剂盒购自泰安联星。BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自上海碧云天。无水乙醇、氯化钠、磷酸二氢钠等均为国产分析纯试剂。

1.1.2 仪器 Bio-rad 酶标仪(美国伯乐);HH-8 数显恒温水浴锅(金坛市双捷实验仪器厂);QL-901 漩涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);TDZ5-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 病料来源 病鸡来自山东凤祥股份有限公司,品种为 AA 肉鸡,22 日龄。分别从三栋鸡舍随机采集具有消化道症状的病鸡,每栋 8 只,同时采集 8 只健康肉鸡作对照。

1.2.2 血液采集 使用一次性无菌注射器心脏采集血液 5 mL,置于离心管中,待血清析出后,在 4 °C 离心机中以 3000 r/min 离心 15 min,取血清分装, -20 °C 保存备用。

1.2.3 消化道黏膜采集 颈部放血致死肉鸡,剖检观察消化道病变。采取十二指肠乙状弯曲升段、卵黄蒂前部和回肠中部肠管 5 cm,用眼科剪纵向剖开肠管,用生理盐水洗去表层食糜后,平铺于准备好的冰盒上,用载玻片刮取黏膜,4 °C 生理盐水 10 倍体积稀释后匀浆,3000 r/min 4 °C 离心 20 min,取上清液分装, -80 °C 保存备用。

1.2.4 抗氧化指标的测定 按照试剂盒说明书采用羟胺法测定 SOD 活性,采用二硫代硝基苯甲酸法测定 GSH-Px,采用 Fe³⁺还原法测定 T-AOC 活性,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA;血清样品直接测定。消化道上清液先用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量,然后用氧化试剂盒测定各项指标。

1.2.5 5-HT 测定 按试剂盒说明书进行。通过预试验确定样本的最佳稀释倍数。

1.2.6 数据处理及统计分析 数据用 Microsoft Excel 和 SPSS.V16.0 软件处理,以“平均数±标准误”表示,用 One-Way ANOVA 进行方差分析,组间差异显著性用 LSD 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 消化道病变观察

剖检显示,病鸡主要表现为腺胃肿胀变硬,腺胃黏膜充血、出血,前段小肠肿胀,剖开肠管后,肠黏膜有不同程度的充血水肿,肠壁外翻,个别肉鸡肠黏膜有出血点。后段肠道病变较轻。整个消化道内容物较少,只见少量未消化的饲料样食糜。健康对照肉鸡剖检未见明显的消化道病变。

2.2 抗氧化指标检测结果

分别对肉鸡血清和小肠黏膜抗氧化因子和活性氧代谢产物进行检测,A、B、C 分别代表三栋具有消化道疾病的肉鸡,D 代表健康肉鸡(表 1)。结果显示,患病肉鸡血清抗氧化因子指标下降,低于对照组。A、B、C 三组的 SOD 水平分别比 D 组低 16.1%、12.3%和 13.8%,统计分析显示 A、B、C 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。A、B、C 三组的 GSH-Px 水平分别比 D 组低 12.5%、9.5%和 9.2%,统计分析显示 A、B、C 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。A、B、C 三组的 T-AOC 水平分别比 D 组低 4.0%、7.4%和 7.0%,统计分析显示 B 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。A、B、C 三组的 MDA 水平分别比 D 组高出 21.8%、16.4%和 15.6%,统计分析显示 A、B、C 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。

消化道黏膜的抗氧化指标检测结果显示:A、B、C 组十二指肠黏膜的 SOD 含量比 D 组分别低 17.7%、9.0%和 17.1%。A、C 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。A、B、C 组十二指肠黏膜的 GSH-Px 的含量比 D 组分别低 14.8%、10.12%和 10.31%,统计分析显示,A、B、C 组和 D 组的差异显著($P<0.05$)。A、B、C 组十二指肠黏膜的 T-AOC 的含量比 D 组分别低 23.1%、15.4%和 20.5%,统计分析显示,

A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组十二指肠黏膜的MDA的含量比D组分别高出12.8%、14.1%和12.8%，统计分析显示，A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。

A、B、C组空肠黏膜的SOD含量比D组分别低10.8%、9.0%和17.1%，统计分析显示，A、B、C组和D组的差异不显著 ($P>0.05$)。A、B、C组空肠黏膜的GSH-Px含量比D组分别低14.8%、10.12%和10.31%，统计分析显示，A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组空肠黏膜的T-AOC的含量比D组分别低23.1%、15.4%和20.5%，统计分析显示，A、B、C组和D组的差异不显著 ($P>0.05$)。A、B、C组空肠黏膜的MDA的含量比D组分别高出12.8%、14.1%和12.8%，统计分析显示，A组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。

A、B、C组回肠黏膜的SOD含量比健康对照D组分别低17.7%、9.0%和17.1%，统计分析显示，A、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组回肠黏膜的GSH-Px的含量比健康对照D组分别低14.8%、10.12%和10.31%，统计分析显示，A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组回肠黏膜的T-AOC含量比健康对照D组分别低23.1%、15.4%和20.5%，统计分析显示，A、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组回肠黏膜的MDA的含量比健康对照D组分别高出12.8%、14.1%和12.8%，统计分析显示，B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。

表1 肉鸡血清和消化道抗氧化性能指标的检测结果

项目 Item	指标 Index	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
血清	SOD(U/ml)	218.67±12.50 ^a	222.00±6.56 ^a	218.00±13.75 ^a	253.33±4.04 ^b
	GSH-Px(U/ml)	294.33±7.02 ^a	304.33±9.71 ^a	305.33±6.66 ^a	336.00±9.54 ^b
	T-AOC(U/ml)	12.40±0.63 ^{ab}	11.96±0.40 ^b	12.02±0.58 ^{ab}	12.92±0.27 ^a
	MDA(nmol/ml)	9.04±0.31 ^a	8.64±0.58 ^a	8.58±0.69 ^a	7.42±0.50 ^b
十二指肠	SOD(U/ mg.prot)	5.38±0.82 ^b	5.95±0.46 ^{ab}	5.42±0.42 ^b	6.54±0.50 ^a
	GSH-Px(U/mg.prot)	8.67±0.40 ^c	9.15±0.20 ^b	9.13±0.12 ^{bc}	10.18±0.19 ^a
	T-AOC(U/ mg.prot)	0.30±0.03 ^b	0.33±0.05 ^b	0.31±0.02 ^b	0.39±0.02 ^a
	MDA(nmol/ mg.prot)	0.88±0.04 ^a	0.89±0.04 ^a	0.88±0.05 ^a	0.78±0.04 ^b
空肠	SOD(U/mg.prot)	4.88±0.36	4.85±0.33	4.98±0.67	5.47±0.37
	GSH-Px(U/mg.prot)	8.99±0.34 ^b	9.05±0.25 ^b	9.26±0.40 ^b	9.94±0.19 ^a
	T-AOC(U/ mg.prot)	0.40±0.04	0.37±0.03	0.35±0.04	0.41±0.03
	MDA(nmol/ mg.prot)	0.87±0.05 ^a	0.86±0.07 ^{ab}	0.83±0.04 ^{ab}	0.76±0.06 ^b
回肠	SOD(U/ mg.prot)	4.49±0.45 ^b	5.00±0.19 ^{ab}	4.81±0.20 ^b	5.41±0.24 ^a
	GSH-Px(U/mg.prot)	8.91±0.17 ^b	9.18±0.30 ^b	9.01±0.21 ^b	9.93±0.31 ^a
	T-AOC(U/ mg.prot)	0.35±0.04 ^b	0.39±0.03 ^{ab}	0.37±0.05 ^b	0.45±0.03 ^a
	MDA(nmol/ mg.prot)	0.82±0.04 ^{ab}	0.84±0.04 ^a	0.86±0.03 ^a	0.76±0.05 ^b

注: 同行数据肩标字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: data with same superscript letters in the same row means insignificant difference ($P>0.05$); data with different superscript letters in the same row means significant difference ($P<0.05$).

2.3 5-羟色胺检测结果

结果发现患消化道病的肉鸡5-羟色胺含量明显高于健康肉鸡, 实验结果见表2。血清5-羟色胺含量的测定结果显示, A、B、C组5-羟色胺含量高于D组, A、B、C组分别比D组高出37.6%、22.4%和37.4%, A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。消化道黏膜5-羟色胺含量的检测结果显示, A、B、C组的5-羟色胺含量比D组高, A、B、C组十二指肠黏膜5-羟色胺含量分别比D组高出103.0%、181.0%和182.1%, 统计分析显示, B、C两组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。A、B、C组空肠黏膜5-羟色胺的含量分别比D组高出189.9%、308.7%和206.9%, 统计分析显示, A、B、C组和D组的差异显著 ($P<0.05$); A、B、C组回肠黏膜5-羟色胺含量分别比D组高出198.9%、125.2%和83.8%, 统计分析显示, A组和D组的差异显著 ($P<0.05$)。

表2 肉鸡血清和肠道黏膜5-羟色胺含量测定结果

项目 Item	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
血清 ($\mu\text{g/mL}$)	50.24±3.95 ^b	44.67±10.95 ^b	50.17±16.90 ^b	36.51±4.53 ^a
十二指肠 ($\mu\text{g/g}$)	152.74±59.07 ^a	211.43±124.14 ^b	212.25±57.10 ^b	75.24±52.05 ^a
空肠 ($\mu\text{g/g}$)	207.74±110.10 ^b	292.85±95.87 ^b	219.89±64.98 ^b	71.66±52.14 ^a
回肠 ($\mu\text{g/g}$)	361.27±172.79 ^a	272.30±129.39 ^b	222.25±71.03 ^b	120.89±29.60 ^b

注: 同行数据肩标字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: data with same superscript letters in the same row means insignificant difference ($P>0.05$); data with different superscript letters in the same row means significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

消化道是肉鸡最重要的病原侵入门户和机体最大的免疫器官, 绝大多数的传染性疾病都会侵害消化道, 如禽流感、新城疫、大肠杆菌病和魏氏梭菌病等。饲料中的霉菌毒素、致炎因子、重金属、消化道内的内毒素和氧自由基等都会直接或间接引起消化道的病变。饲养密度过大、舍温波动、断水、免疫和换料等各种应激因素是造成消化道黏膜损伤的重要诱发因素。消化道黏膜的损伤会影响饲料营养物质的消化吸收及消化道正常菌群的平衡, 并进一步加重胃肠道疾病的程度。因此, 无论是原发性消化道疾病, 还是继发性消化道疾病, 肉鸡消化道或血液的氧自由基和炎症因子都会发挥重要作用^[10,11]。MDA 是氧自由基与细胞多不饱和脂肪酸发生过氧化反应的主要产物, 是脂质过氧化损伤严重程度的指标, 对细胞具有毒性作用, 氧自由基在体内大量积累严重消耗机体抗氧化因子并引起 MDA 的含量迅速增加, 进而导致氧化损伤的病理过程^[12], 如降低机体免疫力, 生理功能紊乱, 甚至引发细胞组织病变或坏死^[13,14]。通过对患消化道病肉鸡的血清和小肠黏膜抗氧化指标检测发现, 两者的抗氧化指标 SOD、GSH-Px、T-AOC 的变化趋势相同, 都明显低于健康对照组, 而氧自由基主要代谢产物 MAD 显著高于健康对照组, 同时, 在程度上, 十二指肠的抗氧化因子指标最低, 与其病变程度最重相符。说明消化道黏膜和血液抗氧化因子的降低, 是消化道疾病的一个重要指标。抗氧化因子指标降低的发生机制可能与抗氧化物质过度消耗或产生受损有关, 张志浩^[15]给肉仔鸡口服亚铁离子造成消化道氧化应激模型, 也证实模型的消化道病变和抗氧化因子指标下降相关。

5-HT 是消化道的重要神经递质及致炎因子, 能刺激胃肠粘液分泌、平滑肌收缩和血管扩张, 并抑制胃酸分泌^[16], 并能导致炎症反应。实验结果显示, 患消化道疾病肉鸡的 5-HT 水平显著升高, 可以作为评判消化道炎症的重要指标, 其显著升高的机制可能与肉鸡消化道黏膜的炎症反应

4 结论

(1) 胃肠炎肉鸡消化道和血清抗氧化功能检测 胃肠炎肉鸡的血清和肠黏膜抗氧化功能较健康肉鸡明显下降, 说明胃肠炎导致肉鸡的抗氧化功能下降, 从而进一步降低肉鸡的消化道和机体的抵抗力, 增加了肉鸡的易感性。

(2) 胃肠炎肉鸡消化道和血清五羟色胺检测 胃肠炎肉鸡的血清和消化道黏膜 5-HT 含量明显高于健康对照组, 并达到差异显著水平 ($P < 0.05$), 说明 5-HT 在胃肠炎肉鸡的致病机制中扮演重要的角色, 具体功能有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张衍海, 刘俊辉, 姜 雯, 等. 论肉禽无禽流感生物安全隔离区的建立[J]. 动物医学进展, 2011, 32(6): 163-167
- [2] 魏建东. 天然植物提取物对肉鸡生产性能、代谢性能和肠道健康影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012
- [3] 庄燕飞. 鸡腺胃炎病原的分离及 Real-time PCR 检测 IBV 在各器官的表达[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013
- [4] 吴秋珏. 沸石对肉鸡肠道健康的保护及机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012
- [5] 陈 群, 乐国伟, 施用晖, 等. 氧自由基对动物消化道损伤及干预研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(11): 106-108
- [6] Poersch AB, Trombetta F, Braga AC, *et al.* Involvement of oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B1 in broiler chicks[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1-2): 180-185
- [7] 韩亚楠, 杨晨玉, 王子旭, 等. 5-HT 对断奶仔鼠应激腹泻时肠道抗氧化功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(12): 2067-2073
- [8] 侯 萍, 王国卿, 刘 丽. 硒缺乏对鸡血清组胺和 5-羟色胺含量的影响[J]. 中国家禽, 2008, 30(24): 11-13
- [9] 李淑兰, 冷 超, 赵文艳. 家鸡消化道的 5-羟色胺免疫反应细胞[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(3): 292-294
- [10] Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, *et al.* Evaluation of the efficacy of a probiotic containing lactobacillus, bifidobacterium, enterococcus, and pdiococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities[J]. *Poult. Sci.*, 2007, 86(2): 309-317
- [11] Songa J, Jiaoa LF, Xiaoa K, *et al.* Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 185(3-4): 175-181
- [12] 李昊阳, 钟荣珍, 房 义, 等. 动物氧化应激与免疫的研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(11): 3217-3221
- [13] 朱若岑, 蒋维维, 谭柱良, 等. 动物体内活性氧、氧化应激与细胞凋亡以及抗氧化剂研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2015(3): 21-25
- [14] 冯京海, 张敏红, 郑姗姗, 等. 高温及氧化应激对体外培养肉鸡骨骼肌线粒体功能的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3264-3269
- [15] 张志浩. 氧化应激对肉鸡肠道黏膜屏障功能的影响以及缓解肠道氧化损伤物质的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014
- [16] 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20): 2405-2408