



燕阳,张宇,吴琪,等.不同益生菌对猪流行性腹泻病毒-德尔塔冠状病毒二联灭活疫苗小鼠免疫及肠道微生物的影响[J].江西农业大学学报,2022,44(6):1498-1509.

YAN Y,ZHANG Y,WU Q,et al.Influence of different probiotics on the immunization and gut microbiota of mice vaccinated with porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus inactivated vaccine[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022,44(6):1498-1509.

# 不同益生菌对猪流行性腹泻病毒-德尔塔冠状病毒二联灭活疫苗小鼠免疫及肠道微生物的影响

燕 阳<sup>1</sup>,张 宇<sup>1</sup>,吴 琪<sup>1</sup>,韩如意<sup>1</sup>,刘林萍<sup>1</sup>,高淑黠<sup>1</sup>,叶以哲<sup>1</sup>,  
叶 昱<sup>1,2</sup>,黄冬艳<sup>1,2</sup>,丁 珍<sup>1,2</sup>,唐玉新<sup>1,2</sup>,宋德平<sup>1,2\*</sup>

(1.江西农业大学 动物科学技术学院,江西 南昌 330045;2.江西省动物疫病防控剂工程研究中心,江西 南昌 330045)

**摘要:**【目的】旨在探究日粮中添加益生菌对猪流行性腹泻病毒(PEDV)—德尔塔冠状病毒(PDCoV)二联灭活疫苗免疫效果及宿主肠道微生物的作用。【方法】以42 d SPF级雌性昆明鼠为试验材料,以基础日粮为对照组(NC组),分别在基础日粮中添加EM益生菌(EM组)、枯草芽孢杆菌(Bac组)、乳酸杆菌(Lac组),在试验1和14 d,分别对小鼠免疫PEDV—PDCoV二联灭活疫苗,检测分析7,14,21,28 d小鼠血液中PEDV和PDCoV的中和抗体与血清免疫因子水平,16S rRNA高通量测序分析肠道菌群差异,以及肠上皮细胞绒毛、隐窝变化。【结果】(1)与对照组(NC组)相比,饲喂不同益生菌小鼠血清中PEDV和PDCoV的中和抗体水平均有不同程度提高,其中EM组小鼠血清中PEDV和PDCoV的中和抗体水平要明显高于其他组( $P<0.01$ );(2)血清免疫因子表达量分析发现,EM组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6、IL-10、CXCL1表达量均极显著高于NC组( $P<0.01$ );(3)肠道形态结果显示,益生菌试验组回肠绒毛长度均显著大于NC组( $P<0.05$ ),EM组空肠绒毛长度显著长于其他3组( $P<0.05$ ),NC组空肠隐窝深度显著大于试验组( $P<0.05$ );(4)细菌16S rRNA高通量测序分析发现,添加益生菌小鼠肠道菌群可操作分类单元(OTU)数量比NC组呈增加的趋势,其中EM组的OTU数量平均最高;试验小鼠肠道80%以上的菌群属于厚壁杆菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。饲喂益生菌14 d小鼠肠道菌群组成和丰度均发生了改变,EM组28 d小鼠肠道内乳酸菌属(*Lactobacillus*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)细菌丰度显著高于其他3组,EM组和Lac组的*Akkermansia*菌属丰度显著高于其他2组( $P<0.05$ )。【结论】研究表明益生菌可提高PEDV、PDCoV灭活疫苗免疫小鼠的抗体水平,宿主免疫因子水平,保护肠上皮细胞形态,以及调节肠道微生物群落结构,增加肠道有益菌的丰度。研究结果为益生菌在PEDV、PDCoV灭活疫苗中的应用及提高靶动物的抗体水平提供试验基础。

**关键词:**益生菌;猪流行性腹泻病毒;猪德尔塔冠状病毒;免疫作用;肠道菌群

**中图分类号:**S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2022)06-1498-12

**收稿日期:**2022-04-25 **修回日期:**2022-05-27

**基金项目:**国家自然科学基金项目(31970611)和江西省自然科学基金项目(20202BABL215024)

Project supported by National Natural Science Foundation of China(31970611) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province(20202BABL215024)

**作者简介:**燕阳, orcid.org/0000-0001-8698-1062, yany638697@163.com; \*通信作者:宋德平,副研究员,博士,主要从事动物传染病研究, orcid.org/0000-0001-5949-287X, sdp8701@jxau.edu.cn。

## Influence of Different Probiotics on the Immunization and Gut Microbiota of Mice Vaccinated with Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Deltacoronavirus Inactivated Vaccine

YAN Yang<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, WU Qi<sup>1</sup>, HAN Ruyi<sup>1</sup>, LIU Linping<sup>1</sup>,  
GAO Shuxia<sup>1</sup>, YE Yizhe<sup>1</sup>, YE Yu<sup>1,2</sup>, HUANG Dongyan<sup>1,2</sup>,  
DING Zhen<sup>1,2</sup>, TANG Yuxin<sup>1,2</sup>, SONG Deping<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;  
2.Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Health, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] In the present study, we aimed to evaluate the effect of probiotics on the immune effect of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) duplex inactivated vaccine and the influence of host gut microbiota. [ **Method** ] The 42 day old female specific pathogen free (SPF) mice were used as experimental materials and randomly divided into 4 groups: negative control (NC), EM, Bac and Lac groups. Among them, NC group was fed with basic diet, EM group was fed with basic diet supplemented with effective microorganism, Bac group was fed with basic diet supplemented with *Bacillus subtilis*, and Lac group was fed with basic diet supplemented with *Lactobacillus*. All of the mice were immunized with PEDV and PDCoV combined inactivated vaccine on the 1st and 14th days of the experiment. On the 7th, 14th, 21th and 28th days, the blood and feces of mice in each group was collected. The serum was used for the detection of immune factors and neutralizing antibodies against PEDV and PDCoV, and the feces were used for comparing the composition and diversity of intestinal microflora by 16S rRNA high-throughput sequencing. On the 28th day, the mice were killed and the villi and crypts of intestinal epithelial cells were observed. [ **Result** ] The results showed that the titers of serum neutralization antibodies against PEDV and PDCoV in probiotic fed mice were increased in varying degrees on the 28th day when compared with that in the NC group, and the antibody titers against PEDV and PDCoV in EM-treated mice were higher than those in other groups. Analyses on the expression of serum cytokines showed that the expression level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-5, IL-6, IL-10 and C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) were significantly higher than those in NC group ( $P < 0.01$ ). For the intestinal morphology, the average lengths of ileal villi in the three probiotics-treated groups were significantly longer than those in the NC group ( $P < 0.05$ ), while the ileal villi length of EM-treated mice were significantly longer than that in mice from the other three groups ( $P < 0.05$ ). Furthermore, crypt depth of jejunum in NC mice was significantly deeper than those in mice from probiotics-treated groups ( $P < 0.05$ ). Analyses on the 16S rRNA high-throughput sequencing of gut microbiome indicated that the numbers of operational taxonomic unit (OTU) in mice treated with probiotics were increased when compared with that in the NC mice. The average number of OTU in EM group was the highest. More than 80% of the gut microflora of all mice were belonged to phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. The compositions and abundances of gut microflora of mice supplied with probiotics changed starting from the second week. At the end of the experiment, the genera of *Lactobacillus* and *Prevotella* in the gut of EM group were significantly higher than those in the other three groups, and the genera of *Akkermansia* in EM group and lac group were significantly higher than those in the other two groups ( $P < 0.05$ ). [ **Conclusion** ] The results indicated that supplementation of probiotics had positive effect on the antibodies resulted from PEDV and PDCoV duplex inactivated vaccine, promoted the levels of host immune cytokines and protected the morphology of intestinal epithelial cells, and supplementation of probiotics can adjust the structure of intestinal microbial community and increase the abundance of probiotics in intestinal bacteria. The results will provide basis for the clinical application of PEDV and

PDCoV duplex inactivated vaccine and promote the antibody level in its target animals.

**Keywords:** probiotics; porcine epidemic diarrhea virus; porcine deltacoronavirus; immunization; gut microbiota

【研究意义】猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是当前主要的猪病毒性腹泻病原<sup>[1]</sup>。然而,现有市售PEDV疫苗免疫后因抗体水平低且持续时间短而难以对猪群,特别是新生仔猪提供充足的保护。研究发现,益生菌可以改善宿主肠道菌群和免疫水平,从而达到促进疫苗抗体水平的效果<sup>[2-3]</sup>。发掘有效促进PEDV和PDCoV疫苗免疫效果的益生菌将有利于该疫苗的临床推广应用。【前人研究进展】PEDV和PDCoV均属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒科(Coronaviridae),其中PEDV为 $\alpha$ 冠状病毒属(*alpha coronavirus*)成员,PDCoV为 $\delta$ 冠状病毒属(*delta coronavirus*)成员。2010年,高毒力的PEDV变异株引发的腹泻疫情迅速在全国各省市猪群暴发,甚至经典毒株疫苗免疫过的猪群也不能幸免,PED疫情至今仍持续暴发<sup>[4]</sup>。2012年,中国香港学者首次从猪粪便样品中检测到PDCoV<sup>[5]</sup>。2014年,美国在爆发PED猪群样品中检测并分离出PDCoV,并通过动物试验证实该病毒可导致猪只腹泻和死亡<sup>[6]</sup>。随后,在中国大陆、加拿大、墨西哥、泰国、韩国及欧洲多国相继报道PEDV和PDCoV引起的腹泻疫情<sup>[7-9]</sup>。在临床上,PEDV和PDCoV均可造成各年龄阶段的猪只感染和腹泻,以新生仔猪的感染和发病最为严重,是新生仔猪发病和死亡的主要原因。流行病学调查显示,变异株PEDV在腹泻样品中的检出率超过60%,PDCoV的检出率也接近30%,远超过其他腹泻相关病毒的检出率<sup>[10-11]</sup>。尽管已有PEDV疫苗上市使用,但以PEDV为主要病原引起的腹泻疫情依然持续存在,主要原因可能与疫苗激发的抗体水平较低,持续时间短有关<sup>[12]</sup>。因此,如何提高疫苗抗体水平是猪群,特别是新生仔猪抵抗PEDV和PDCoV感染的关键。益生菌(Probiotics)是指对机体有一种或多种有益作用的一类微生物,可天然存在或经人工添加后定植于自然界、动物和人体肠道、呼吸道、生殖道或皮肤<sup>[13]</sup>。研究发现,益生菌的作用非常广泛,可促进或调节环境或机体的菌群平衡,促进营养物质吸收;抵抗外来微生物入侵,降低机体应激反应,提高免疫力等作用<sup>[14]</sup>。益生菌可通过自身产生分泌物、分解代谢营养物质(如短链脂肪酸、丁酸、丙酸等)及作为抗原等发挥保护及治疗机体,从而调节机体免疫功能,尤其是肠道免疫<sup>[15]</sup>。益生菌调节免疫主要是促进肠道淋巴细胞生成,增强淋巴细胞和效应B细胞的活力,从而释放相关细胞因子,如白细胞介素2(interleukin 2, IL-2)、IL-10、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ );益生菌可促进机体免疫球蛋白的生成,如免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)和免疫球蛋白A(immunoglobulin A, IgA)<sup>[16]</sup>。

【本研究切入点】研究表明,益生菌或其代谢产物对一些病毒疫苗具有免疫刺激和提高抗体水平及保护效果的作用<sup>[17-18]</sup>。Inatomi等<sup>[19]</sup>发现饲喂芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)组成的复合益生菌可显著提高免疫PEDV弱毒疫苗怀孕母猪的IgA和IgG水平,同时也可提高所产仔猪的出生重和成活率。Jin等<sup>[20]</sup>给断奶仔猪饲喂乳酸杆菌(*Lactobacillus*)后接种传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)疫苗,发现可显著提高血清中抗TGEV IgG水平。Isolaure等<sup>[21]</sup>发现在轮状病毒疫苗中加入干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)可显著提高特异性IgM的细胞比例及转变率。胡兴义等<sup>[22]</sup>使用复合益生菌饲喂断奶仔猪,发现可明显提高断奶仔猪血清中IL-6和TNF- $\alpha$ 水平。以上研究表明益生菌可提高疫苗的抗体水平及宿主的免疫功能。针对当前PEDV等腹泻病毒疫苗抗体水平低、保护力弱的问题,或许益生菌是一种值得尝试的增效手段。【拟解决的关键问题】本研究以SPF级雌性昆明鼠为试验材料,拟比较单一和复合益生菌对PEDV和PDCoV疫苗抗体、宿主免疫因子及肠道形态、肠道菌群丰度的影响或变化,以此评估益生菌对疫苗和动物健康的作用,为筛选对PEDV和PDCoV二联灭活疫苗提质增效的益生菌提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性昆明鼠32只,6~8周龄,体质量18~

22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(实验动物生产许可证编号:SCXK(湘)2021-0002)。

**1.1.2 试验益生菌与疫苗** 复合益生菌:有效微生物(effective microorganism, EM)( $2.0 \times 10^9$  cfu/mL)由江西农业大学预防兽医学实验室制备和提供,包括乳酸菌(*Lactobacillus*, 84.02%)、拟杆菌(*Bacteroides*, 1.89%)等5个科28个属的多种细菌<sup>[23]</sup>。枯草芽孢杆菌( $6.0 \times 10^9$  cfu/mL)和乳酸杆菌( $2.0 \times 10^9$  cfu/mL)由山东宝来利来生物工程股份有限公司提供。试验用猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪 $\delta$ 冠状病毒(PDCoV)二联灭活疫苗(JX01株+JGS01株)由江西农业大学预防兽医学实验室制备(灭活前PEDV、PDCoV含量均不低于 $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL)。

## 1.2 试验设计

随机将32只昆明鼠分成4组,每组8只。在试验第1天和第14天每只小鼠皮下接种PEDV-PDCoV二联灭活疫苗(JX01株+JGS01株)0.2 mL。3组小鼠分别在试验第1天开始灌胃EM益生菌0.3 mL/只(EM组)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)0.3 mL/只(Bac组)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)0.3 mL/只(Lac组),第四组为饲喂基础日粮的对照组(NC组)。

## 1.3 测定项目与方法

**1.3.1 组织样品采样和组织切片检查** 试验小鼠安乐死,剖检观察小鼠各个器官与肠道病变。每组3只小鼠采集空肠、回肠各2~3 cm,放入生理盐水中轻轻洗去肠内容物后,置于4%多聚甲醛固定48 h。参照夏莹莹等<sup>[24]</sup>的方法进行切片制备、HE染色,参考陈燕君等<sup>[25]</sup>的方法检测分析绒毛长度(villus height, VH)、隐窝深度(crypt depth, CD)、绒毛长度/隐窝深度值(VH/CD)。

**1.3.2 抗体水平检测** 在试验第1, 7, 14, 21, 28天采集所有小鼠的血液。参照彭棋等<sup>[26]</sup>方法测定小鼠血清中PEDV和PDCoV中和抗体,简要方法为:将长满单层的Vero81细胞用胰酶消化吹后用DMEM吹匀,按每孔 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个细胞接种于96孔细胞培养板,待细胞长满时用0.01 mol/L PBS(pH值7.2)洗涤2次。待检血清56℃水浴灭活30 min,备用;在96孔细胞培养板上,用含10 μg/mL胰酶的无血清的DMEM细胞培养液将待检血清做连续倍比稀释。从1:4至1:128,每个稀释度做4个重复,每孔50 μL;用含10 μg/mL胰酶的无血清DMEM培养液将病毒稀释为200 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL,然后加入到血清稀释孔中,每孔50 μL,置5% CO<sub>2</sub> 37℃孵育1 h后加入已洗涤的96孔细胞板内,每个稀释度接种4孔,每孔0.1 mL;37℃含5% CO<sub>2</sub>的培养箱吸附1 h,吸弃接种液,同时设有血清毒性对照、病毒对照和正常细胞对照;每日观察并记录细胞病变(CPE)情况,96~120 h后按Reed-Muench法计算被检血清中和抗体效价。PDCoV中和抗体效价测定方法同PEDV,但测定用细胞为LLC-PK1细胞。

**1.3.3 血清免疫因子水平测定** 采用液相悬浮芯片技术Luminex LabEx多因子检测系统LX-MultiDTM-10(Bio-Rad公司)检测EM和NC组小鼠血清中TNF-α、γ干扰素(interferon γ, IFN-γ)、白介素1β(interleukin 1β, IL-1β)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、趋化因子配体1(C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1)水平,由上海乐备实优宁维生物技术有限公司完成<sup>[27]</sup>。

**1.3.4 肠道菌群组成高通量测序** (1)样品采集。分别在试验第1, 14, 28天采集各组小鼠粪便样品,每只小鼠采集3~4粒粪便,置于1.5 mL EP管中, -20℃保存<sup>[23]</sup>。

(2)高通量测序。采集小鼠试验28 d粪便样品,利用QIAamp Stool DNA Extraction Kit(Cat#51504, QIAGEN)提取DNA,由杭州谷禾信息技术有限公司采用Illumina MiSeq系统进行微生物16S rRNA V4区测序。

(3)生物信息学分析。由Illumina Miseq测序得到原始数据先经过质量过滤再用于下游分析:Cutadapt软件用于去除reads中的adapter序列并修剪reads末端质量小于Q20的碱基。使用FLASH连接Miseq Pair-end两端Reads,并根据barcode信息进行分样,同时切除两端引物和barcode,舍弃不含barcode和两端引物的序列<sup>[28]</sup>。得到的有效序列采用QIIME 2.0分析流程进行分析,具体流程参照宋德平等<sup>[29]</sup>方法。

## 1.4 统计学分析

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计学分析,小鼠血清IgG抗体、肠绒毛长度和隐窝深度数据采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。采用Mann-Whitney U检验对肠道菌群α多样性指数及肠道菌群丰度差异显著性进行分析。采用Graphpad 5.0软件进行抗体水平数

2 结果与分析

2.1 不同益生菌对猪病毒性腹泻疫苗抗体水平的影响

在试验 28 d 内,无论是对照组(NC 组)还是饲喂益生菌组(Lac、EM 和 Bac)小鼠血清中 PEDV 和 PDCoV 中和抗体水平均呈上升趋势,第二次免疫(14 d)后出现了抗体水平上升的拐点(图 1 和图 2)。与对照组(NC)相比,试验结束时饲喂益生菌小鼠血清中 PEDV 和 PDCoV 中和抗体水平有不同程度提高,其中 EM 组小鼠血清中 PEDV 和 PDCoV 中和抗体水平要明显高于其他组。

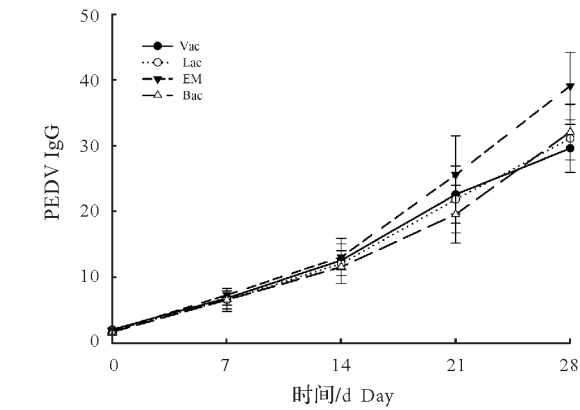


图 1 不同益生菌对小鼠 PEDV 抗体水平的影响  
Fig.1 Effect of different probiotics on antibody titers against PEDV in mice

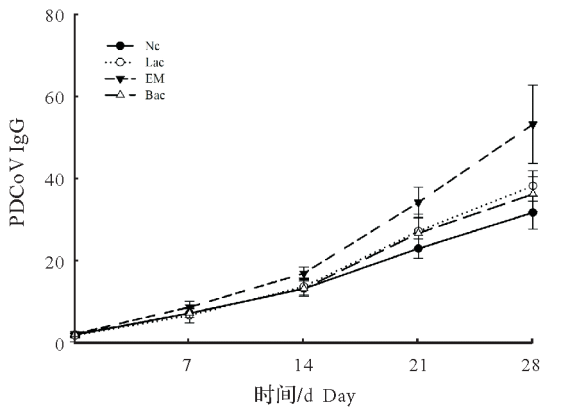


图 2 不同益生菌对小鼠 PDCoV 抗体水平的影响  
Fig.2 Effect of different probiotics on antibody titers against PDCoV in mice

2.2 益生菌对血清细胞因子浓度的影响

对 PEDV 和 PDCoV 抗体水平促进效果最明显的 EM 添加组与对照组小鼠试验第 28 天时血清中免疫相关细胞因子水平分析发现,EM 组的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6、IL-10、CXCL1 平均浓度分别为 (19.58 $\pm$ 0.99), (3.21 $\pm$ 0.12), (1.93 $\pm$ 0.11), (5.60 $\pm$ 0.46), (0.12 $\pm$ 0.03), (2.55 $\pm$ 0.29), (37.87 $\pm$ 1.93) pg/mL, 均极显著高于对照组相应因子的浓度;而 IL-4、IL-12p70 的浓度分别为 (0.15 $\pm$ 0.03), (2.19 $\pm$ 0.24) pg/mL, 均极显著低于对照组相应因子的浓度;IL-2 则在 EM 组和对照组均无差异(表 1)。

表 1 EM 益生菌对小鼠血液中免疫分子的影响

Tab.1 Effect of EM probiotics on serum immune cytokines in mice

| 因子名称<br>Cytokines             | 因子浓度/(pg·mL <sup>-1</sup> ) Concentration |                  | 统计学差异<br>Statistical analysis |
|-------------------------------|-------------------------------------------|------------------|-------------------------------|
|                               | EM                                        | NC               |                               |
| $\alpha$ 肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ | 19.58 $\pm$ 0.99                          | 0.56 $\pm$ 0.13  | 0.000***                      |
| $\gamma$ 干扰素 IFN- $\gamma$    | 3.21 $\pm$ 0.12                           | 2.77 $\pm$ 0.25  | 0.004**                       |
| 白介素 1 $\beta$ IL-1 $\beta$    | 1.93 $\pm$ 0.11                           | 1.31 $\pm$ 0.21  | 0.000***                      |
| 白介素 2 IL-2                    | 0.93 $\pm$ 0.08                           | 0.93 $\pm$ 0.20  | 0.994                         |
| 白介素 4 IL-4                    | 0.15 $\pm$ 0.03                           | 0.57 $\pm$ 0.28  | 0.005**                       |
| 白介素 5 IL-5                    | 5.60 $\pm$ 0.46                           | 2.67 $\pm$ 0.56  | 0.000***                      |
| 白介素 6 IL-6                    | 0.12 $\pm$ 0.03                           | 0.03 $\pm$ 0.05  | 0.006**                       |
| 白介素 6 IL-10                   | 2.55 $\pm$ 0.29                           | 1.11 $\pm$ 0.27  | 0.000***                      |
| 活性白介素 12 IL-12p70             | 2.19 $\pm$ 0.24                           | 22.25 $\pm$ 4.31 | 0.000***                      |
| 趋化因子配体 1 CXCL1                | 37.87 $\pm$ 1.93                          | 21.13 $\pm$ 3.70 | 0.000***                      |

TNF- $\alpha$ : $\alpha$  肿瘤坏死因子,IFN- $\gamma$ : $\gamma$  干扰素,IL-1 $\beta$ :白介素 1 $\beta$ ,IL-2:白介素 2,IL-4:白介素 4,IL-5:白介素 5,IL-6:白介素 6,IL-10:白介素 10,IL-12p70:活性白介素 12,CXCL1:趋化因子配体 1,\*表示差异 5% 水平显著性,\*\*表示差异 1% 水平显著性;\*\*\*表示差异 0.1% 水平显著性。  
TNF- $\alpha$ :tumor necrosis factor  $\alpha$ ,IFN- $\gamma$ :interferon- $\gamma$ ,IL-1 $\beta$ :interleukin-1 $\beta$ ,IL-2:interleukin-2,IL-4:interleukin-4,IL-5:interleukin-5,IL-6:interleukin-6,IL-10:interleukin-10,IL-12p70:interleukin-12p70,CXCL1:Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1,SD:standard deviation,\* significance at 0.05 level,\*\* significance at 0.01 level,\*\*\* significance at 0.001 level.

2.3 不同益生菌对小鼠肠道形态的影响

对空肠和回肠组织切片观察发现各组肠上皮细胞形态、绒毛长度和隐窝深度存在差异(图3)。EM组空肠绒毛长度显著大于其他3组,试验组回肠绒毛长度均显著大于NC组( $P<0.05$ )(表2)。隐窝深度方面,NC组空肠隐窝深度显著大于试验组,而NC组回肠隐窝深度显著小于Lac和Bac组( $P<0.05$ )。

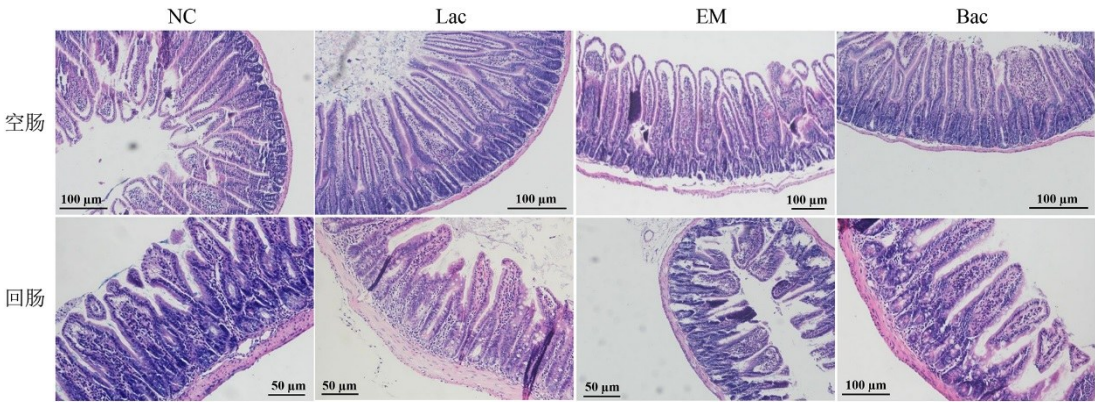


图3 不同处理组小鼠空肠和回肠形态

Fig.3 Morphology of jejunum and ileum in mice under different treatments

表2 不同处理对小鼠肠绒毛、隐窝深度的影响

Tab.2 Effect of different treatments on intestinal villus height(VH)and crypt depth(CD)in mice

| 肠段<br>Intestine | 测定参数<br>Parameter   | 组别 Group                        |                                 |                                 |                                 |
|-----------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                 |                     | NC                              | Lac                             | EM                              | Bac                             |
| 空肠<br>Jejunum   | 绒毛长度/ $\mu\text{m}$ | 190.49 $\pm$ 24.24 <sup>c</sup> | 130.23 $\pm$ 21.15 <sup>b</sup> | 235.63 $\pm$ 34.73 <sup>a</sup> | 140.13 $\pm$ 49.57 <sup>b</sup> |
|                 | 隐窝深度/ $\mu\text{m}$ | 73.00 $\pm$ 12.63 <sup>a</sup>  | 59.87 $\pm$ 9.07 <sup>c</sup>   | 42.67 $\pm$ 10.61 <sup>b</sup>  | 39.52 $\pm$ 7.48 <sup>b</sup>   |
|                 | VH/CD 值             | 2.60                            | 2.17                            | 5.52                            | 3.54                            |
| 回肠<br>Ileum     | 绒毛长度/ $\mu\text{m}$ | 103.07 $\pm$ 21.70 <sup>c</sup> | 132.53 $\pm$ 30.97 <sup>b</sup> | 137.26 $\pm$ 37.37 <sup>b</sup> | 164.03 $\pm$ 32.35 <sup>a</sup> |
|                 | 隐窝深度/ $\mu\text{m}$ | 50.16 $\pm$ 11.49 <sup>b</sup>  | 67.24 $\pm$ 11.73 <sup>a</sup>  | 50.72 $\pm$ 12.98 <sup>b</sup>  | 73.92 $\pm$ 8.125 <sup>a</sup>  |
|                 | VH/CD 值             | 2.59                            | 1.97                            | 2.70                            | 2.22                            |

相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The same letters indicate no significance( $P>0.05$ ),different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

2.4 不同益生菌对小鼠肠道菌群群落结构的影响

2.4.1 16S rRNA 高通量测序数据 本试验的36个临床样本共产生了3 576 606条pair-end的原始读长(raw read)序列,用QIIME 2.0软件包对数据进行质控、过滤及嵌合体去除后获得了3 326 988条有效读长(clean read),平均每个样本92 416条。将所有有效读长与Greengenes数据库进行比对,根据序列97%相似性进行OTU划分,共被划分为3 743个代表性OTUs(表3)。随着试验时间增加,添加益生菌小鼠肠道菌群OTU数量增加趋势比NC组小鼠肠道菌群OTU数增加趋势更为明显,EM组的OTU数量平均最高。试验开始时(0 d)各组小鼠肠道菌群OTU数量及alpha指数无显著差异;14 d时,EM菌组Observed species指数与NC组相比存在显著差异( $P<0.05$ ),表明给小鼠人工灌喂EM菌能够改变其肠道内菌群种类数量。与EM组相比Lac组、Bac组Observed species指数存在显著差异,表明给小鼠人工灌喂不同菌种其肠道内菌群种类数量也不同。28 d时,EM组Observed species指数与NC组相比存在显著差异( $P<0.05$ ),表明给小鼠人工灌喂EM菌能够改变其肠道内菌组成和丰度。

2.4.2 门水平菌群分布与优势菌群分析 试验开始时(0 d)各组小鼠菌群组成无显著差异,饲喂益生菌与对照组以及各益生菌组之间在试验第14天时菌群分布和丰度存在差异。各组小鼠从试验开始至第28天结束时肠道菌群也呈现动态变化过程,其中所有试验组小鼠肠道菌群中拟杆菌门细菌丰

度逐渐增加而厚壁菌门细菌丰度逐渐下降的趋势;添加益生菌组小鼠肠道放线菌门的丰度逐渐上升趋势(图4)。

表3 16S rRNA高通量测序小鼠肠道菌群OTU及Alpha多样性指数  
Tab.3 OTU numbers and alpha diversity indexes of mice intestinal microbiota  
sequenced by 16S rRNA highthroughput sequencing

| 天数/d | 组别    | OTU 数量     | ACE 指数    | 香浓指数                   | 辛普森指数     | Chao1 指数                     | 物种数量             |
|------|-------|------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------------|------------------|
| Day  | Group | OTU number | ACE       | Shannon                | Simpson   | Chaol                        | Observed species |
| 0    | EM    | 1 145±139  | 1.00±0.00 | 5.29±0.93 <sup>b</sup> | 0.88±0.05 | 1 348.28±159.08              | 1 343.07±176.31  |
|      | Bac   | 988±123    | 1.00±0.00 | 4.75±0.62 <sup>b</sup> | 0.86±0.03 | 1 243.83±173.23              | 1 224.11±202.42  |
|      | Lac   | 1 091±59   | 1.00±0.00 | 4.15±0.43 <sup>a</sup> | 0.88±0.05 | 1 348.28±159.08              | 1 343.07±176.31  |
|      | NC    | 935±336    | 1.00±0.00 | 4.50±0.48 <sup>b</sup> | 0.84±0.00 | 1 214.34±426.55              | 1 223.07±446.25  |
| 14   | EM    | 1 555±460  | 1.00±0.00 | 6.65±0.73              | 0.97±0.01 | 1 846.35±467.14 <sup>a</sup> | 1 834.09±424.15  |
|      | Bac   | 1 212±139  | 1.00±0.00 | 6.75±0.58              | 0.97±0.02 | 1 465.80±150.06 <sup>b</sup> | 1 487.67±139.65  |
|      | Lac   | 1 203±111  | 1.00±0.00 | 6.16±0.30              | 0.96±0.01 | 1 394.52±120.50 <sup>b</sup> | 1 391.56±94.98   |
|      | NC    | 1 110±350  | 1.00±0.00 | 6.06±0.83              | 0.95±0.02 | 1 507.99±343.29 <sup>b</sup> | 1 483.33±335.46  |
| 28   | EM    | 1 603±217  | 1.00±0.00 | 6.16±0.38              | 0.94±0.01 | 1 693.30±217.56 <sup>b</sup> | 1 693.80±200.60  |
|      | Bac   | 1 429±360  | 1.00±0.00 | 5.82±0.55              | 0.93±0.02 | 1 493.04±277.56 <sup>a</sup> | 1 496.54±274.65  |
|      | Lac   | 1 560±152  | 1.00±0.00 | 6.20±0.57              | 0.95±0.02 | 1 877.00±139.37 <sup>a</sup> | 1 890.40±120.59  |
|      | NC    | 1 260±160  | 1.00±0.00 | 5.63±0.52              | 0.91±0.04 | 1 525.14±169.13 <sup>a</sup> | 1 508.72±142.33  |

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
The same letters indicate no significance ( $P>0.05$ ),different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

从试验不同阶段组间肠道菌群分析发现,第14天小鼠肠道菌群丰度>1%的菌群主要有厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线杆菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria),其中80%以上菌群分布于厚壁杆菌门和拟杆菌门(表4)。Bac组与EM组、对照组,EM组与Lac组之间厚壁菌门丰度具有显著差异( $P<0.05$ );Bac组与其他3组,Lac与对照组在拟杆菌门丰度具有显著差异( $P<0.05$ )。试验结束时,各组主要菌群为厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门。EM组放线杆菌门相对丰度显著上升,拟杆菌门相对丰度显著下降(表5)。对照组与Bac组和EM组,EM组与Lac组在放线菌门丰度具有显著差异,EM组与对照组在拟杆菌门丰度具有显著差异,Bac组与EM组在变形菌门丰度具有显著差异;对照组与3个试验组在疣微菌门(Verrucomicrobia)丰度具有显著差异( $P<0.05$ )。

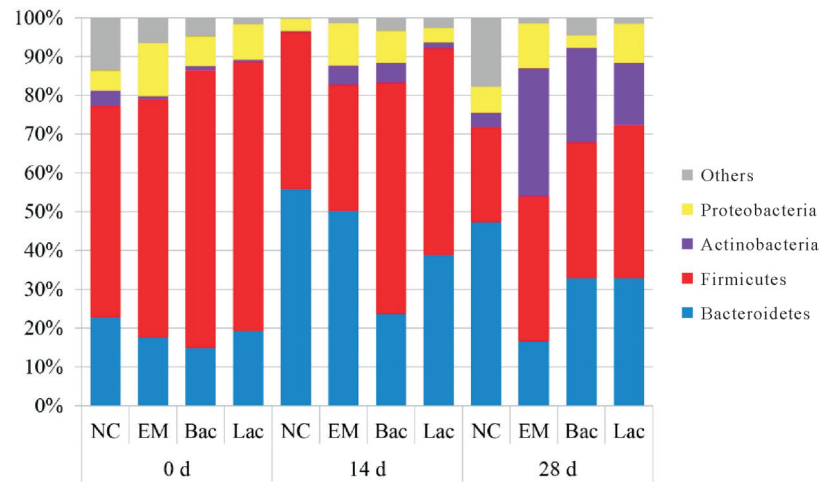


图4 不同益生菌对小鼠肠道门水平菌群丰度的影响  
Fig.4 Comparison of microbiota abundances at phylum level during the experiment

表 4 不同益生菌对小鼠肠道门水平下的优势菌群丰度的影响  
Tab.4 Distribution of dominant microflora at phylum level at 14 d

| 细菌名称<br>Bacteria      | 对照组<br>NC                | 试验组 Test group           |                         |                           |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                       |                          | EM                       | Bac                     | Lac                       |
| 厚壁菌门 Firmicutes       | 40.37±4.56 <sup>ac</sup> | 32.34±7.09 <sup>a</sup>  | 59.55±1.87 <sup>b</sup> | 53.33±10.86 <sup>bc</sup> |
| 拟杆菌门 Bacteroidetes    | 55.69±5.53 <sup>c</sup>  | 50.16±6.78 <sup>bc</sup> | 23.60±2.67 <sup>a</sup> | 38.76±8.91 <sup>b</sup>   |
| 放线菌门 Actinobacteria   | 0.32±0.12                | 5.07±5.10                | 5.15±0.48               | 1.54±0.86                 |
| 放线菌门 Actinobacteria   | 0.04±0.03                | 0.12±0.14                | 0.13±0.04               | 0.10±0.04                 |
| 蓝藻门 Cyanobacteria     | 0.26±0.17                | 0.55±0.30                | 0.38±0.07               | 0.53±0.25                 |
| 脱铁杆菌门 Deferribacteres | 3.17±0.87                | 10.80±7.50               | 8.17±3.13               | 3.69±0.93                 |
| 变形菌门 Proteobacteria   | 0.00±0.00                | 0.74±0.40                | 2.63±1.90               | 1.77±1.94                 |
| TM7                   | 0.01±0.00 <sup>a</sup>   | 0.08±0.05 <sup>ab</sup>  | 0.26±0.19 <sup>b</sup>  | 0.16±0.06 <sup>ab</sup>   |
| 软壁菌门 Tenericutes      | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.09±0.08               | 0.11±0.10                 |
| 疣微菌门 Verrucomicrobia  | 40.37±4.56 <sup>ac</sup> | 32.34±7.09 <sup>a</sup>  | 59.55±1.87 <sup>b</sup> | 53.33±10.86 <sup>bc</sup> |
| 放线菌门 Actinobacteria   | 55.69±5.53 <sup>c</sup>  | 50.16±6.78 <sup>bc</sup> | 23.60±2.67 <sup>a</sup> | 38.76±8.91 <sup>b</sup>   |

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
The same letters indicate no significance( $P>0.05$ ), different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

表 5 不同益生菌对 28 d 小鼠肠道菌群门水平下的优势菌群丰度的影响  
Tab.5 Distribution of dominant microflora at phylum level at 28 d

| 细菌名称<br>Bacteria      | 对照组<br>NC               | 试验组 Test group          |                                      |                          |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                       |                         | EM                      | Bac                                  | Lac                      |
| 厚壁菌门 Firmicutes       | 24.52±3.29              | 37.30±5.39              | 34.97±6.16                           | 39.37±9.89               |
| 拟杆菌门 Bacteroidetes    | 47.28±6.62 <sup>a</sup> | 16.61±8.91 <sup>b</sup> | 32.82±7.14 <sup>a</sup>              | 32.86±5.87 <sup>a</sup>  |
| 放线菌门 Actinobacteria   | 3.72±0.73 <sup>a</sup>  | 33.04±9.82 <sup>b</sup> | 24.35±5.10 <sup>b</sup> <sup>c</sup> | 16.08±6.07 <sup>ac</sup> |
| 蓝藻门 Cyanobacteria     | 0.39±0.31               | 0.02±0.01               | 3.26±4.11                            | 0.19±0.25                |
| 脱铁杆菌门 Deferribacteres | 0.37±0.10 <sup>a</sup>  | 1.14±1.53 <sup>b</sup>  | 0.07±0.07 <sup>a</sup>               | 0.64±0.87 <sup>a</sup>   |
| 变形菌门 Proteobacteria   | 6.57±1.27 <sup>ab</sup> | 11.41±5.00 <sup>a</sup> | 3.18±0.78 <sup>b</sup>               | 10.06±3.53 <sup>ab</sup> |
| TM7                   | 0.04±0.02               | 0.33±0.29               | 0.22±0.09                            | 0.65±0.61                |
| 软壁菌门 Tenericutes      | 0.12±0.05               | 0.10±0.11               | 0.03±0.01                            | 0.14±0.03                |
| 疣微菌门 Verrucomicrobia  | 16.95±8.64 <sup>a</sup> | 0.00±0.00 <sup>b</sup>  | 1.04±1.27 <sup>b</sup>               | 0.01±0.01 <sup>b</sup>   |
| 拟杆菌门 Bacteroidetes    | 24.52±3.29              | 37.30±5.39              | 34.97±6.16                           | 39.37±9.89               |
| 放线菌门 Actinobacteria   | 47.28±6.62 <sup>a</sup> | 16.61±8.91 <sup>b</sup> | 32.82±7.14 <sup>a</sup>              | 32.86±5.87 <sup>a</sup>  |
| 蓝藻门 Cyanobacteria     | 3.72±0.73 <sup>a</sup>  | 33.04±9.82 <sup>b</sup> | 24.35±5.10 <sup>b</sup> <sup>c</sup> | 16.08±6.07 <sup>ac</sup> |
| 脱铁杆菌门 Deferribacteres | 0.39±0.31               | 0.02±0.01               | 3.26±4.11                            | 0.19±0.25                |

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
The same letters indicate no significance( $P>0.05$ ), different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

2.4.3 属水平菌群分布与优势菌群分析 在属水平上,添加了益生菌组小鼠肠道的拟杆菌属(*Bacteroides*)和疣微菌(*Verrucomicrobia*)丰度显著低于NC组。EM组小鼠肠道的放线菌属(*Actinobacteria*)和变形菌属(*Proteobacteria*)丰度高于其他组,饲喂益生菌组的厚壁菌属(*Firmicuteria*)丰度均高于对照组(表6)。

试验 28 d 时,EM 组小鼠肠道内乳酸菌属(*Lactobacillus*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)细菌的丰度显著高于其他 3 组,EM 组和 Lac 组的 *Akkermansia* 属菌丰度显著高于其他两组( $P<0.05$ )(表 7)。NC 组的 *Bacteroides* 属均丰度显著高于 EM 组和 Lac 组,NC 组的 *Corynebacterium* 属菌丰度显著低于 Bac 组和 EM 组,Bac 组和 Lac 组的 *Staphylococcus* 属菌显著高于 EM 组和 NC 组。

表 6 不同益生菌对 14 d 小鼠肠道菌群属水平下的优势菌群丰度的影响  
Tab.6 Distribution of dominant microflora at genus level at 14 d

| 细菌名称<br>Bacteria            | 对照组<br>NC               | 试验组 Test group          |                                     |                          |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
|                             |                         | EM                      | Bac                                 | Lac                      |
| 厚壁菌属 <i>Firmicuteria</i>    | 24.52±3.29              | 37.30±5.39              | 34.97±6.16                          | 39.37±9.89               |
| 放线菌属 <i>Actinobacteria</i>  | 3.72±0.73 <sup>a</sup>  | 33.04±9.82 <sup>b</sup> | 24.35±5.10 <sup>b<sup>c</sup></sup> | 16.08±6.07 <sup>ac</sup> |
| 拟杆菌属 <i>Bacteroidetes</i>   | 47.28±6.62 <sup>a</sup> | 16.61±8.91 <sup>b</sup> | 32.82±7.14 <sup>a</sup>             | 32.86±5.87 <sup>a</sup>  |
| 蓝藻菌 <i>Cyanobacteria</i>    | 0.39±0.31               | 0.02±0.01               | 3.26±4.11                           | 0.19±0.25                |
| 脱铁杆菌 <i>Deferribacteres</i> | 0.37±0.10 <sup>a</sup>  | 1.14±1.53 <sup>b</sup>  | 0.07±0.07 <sup>a</sup>              | 0.64±0.87 <sup>a</sup>   |
| 变形菌属 <i>Proteobacteria</i>  | 6.57±1.27 <sup>ab</sup> | 11.41±5.00 <sup>a</sup> | 3.18±0.78 <sup>b</sup>              | 10.06±3.53 <sup>ab</sup> |
| TM7                         | 0.04±0.02               | 0.33±0.29               | 0.22±0.09                           | 0.65±0.61                |
| 软壁菌 <i>Tenericutes</i>      | 0.12±0.05               | 0.10±0.11               | 0.03±0.01                           | 0.14±0.03                |
| 疣微菌 <i>Verrucomicrobia</i>  | 16.95±8.64 <sup>a</sup> | 0.00±0.00 <sup>b</sup>  | 1.04±1.27 <sup>b</sup>              | 0.01±0.01 <sup>b</sup>   |

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
The same letters indicate no significance( $P>0.05$ ),different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

表 7 不同益生菌对 28 d 小鼠肠道属水平下的优势菌群丰度的影响  
Tab.7 Distribution of dominant microflora at genus level at 28 d

| 细菌名称<br>Bacteria             | 对照组<br>NC                 | 试验组 Test group            |                          |                           |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                              |                           | EM 组                      | Bac 组                    | Lac 组                     |
| 乳酸菌 <i>Lactobacillus</i>     | 11.65±6.453               | 19.18±16.36               | 8.073±5.623              | 14.95±12.77               |
| 拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>      | 12.17±5.187 <sup>ab</sup> | 12.76±5.573 <sup>a</sup>  | 4.132±1.640 <sup>b</sup> | 9.131±3.352 <sup>ab</sup> |
| 棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i> | 0.004±0.002 <sup>b</sup>  | 0.002±0.002 <sup>b</sup>  | 2.700±5.021 <sup>a</sup> | 0.005±0.001 <sup>b</sup>  |
| 普雷沃氏菌属 <i>Prevotella</i>     | 2.688±1.217 <sup>b</sup>  | 7.606±1.790 <sup>a</sup>  | 2.573±3.493 <sup>b</sup> | 2.696±2.498 <sup>b</sup>  |
| 葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>  | 0.068±0.078 <sup>b</sup>  | 0.067±0.011 <sup>b</sup>  | 4.691±2.915 <sup>a</sup> | 0.319±0.275 <sup>b</sup>  |
| 颤螺旋菌属 <i>Oscillospira</i>    | 1.157±1.726               | 2.882±2.055               | 5.493±4.597              | 5.619±3.398               |
| 瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>    | 15.69±5.931 <sup>a</sup>  | 1.725±2.127 <sup>b</sup>  | 2.469±1.794 <sup>b</sup> | 4.479±2.068 <sup>b</sup>  |
| 副杆菌属 <i>Parabacteroides</i>  | 8.511±6.731 <sup>a</sup>  | 3.464±0.656 <sup>ab</sup> | 1.050±0.330 <sup>b</sup> | 1.703±0.511 <sup>b</sup>  |
| 幽门螺杆菌属 <i>Helicobacter</i>   | 0.489±0.260               | 7.097±9.548               | 2.552±1.925              | 1.691±1.730               |
| <i>Akkermansia</i>           | 0.000±0.000               | 0.112±0.124               | 0.090±0.102              | 0.112±0.124               |
| <i>Flexispira</i>            | 0.003±0.002 <sup>b</sup>  | 0.009±0.007 <sup>b</sup>  | 0.420±0.228 <sup>a</sup> | 0.033±0.028 <sup>b</sup>  |

相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
The same letters indicate no significance( $P>0.05$ ),different small letters indicate significance at 5% level( $P<0.05$ ).

3 结论与讨论

PEDV 和 PDCoV 是当前导致新生仔猪腹泻和死亡的主要病原,目前用于预防 PEDV 的主要手段为疫苗,但临床上发现疫苗常常因抗体水平不高而导致保护力不足。益生菌是一种新型绿色环保添加剂,可通过定植于肠道而调节肠道微生物平衡,乃至调节动物免疫、循环和其他组织系统的作用,是重要的动物饲料添加剂,也可以作为动物疾病防治产品而被广泛使用<sup>[22]</sup>。为探索益生菌对 PEDV 和 PDCoV 疫苗的作用,本试验对比了复合益生菌(EM)和单种益生菌(枯草芽孢杆菌和乳酸杆菌)对 PEDV 和 PDCoV 二联灭活疫苗的抗体水平的影响。结果发现,添加益生菌可提升血清中两种病毒的抗体水平,复合益生菌对抗体水平的提升效果优于单种益生菌。有研究表明,益生菌主要影响先天免疫反应,通过这种方式调节感染早期抗病毒炎症反应以及随后的细胞和体液免疫反应<sup>[30]</sup>。由此推测,本试验中添加益生菌可能促进了宿主的先天性免疫和细胞、体液免疫,从而使得宿主产生更强的抗 PEDV 和 PDCoV 反应,从而促进了疫苗抗体的生成。

已发现多种特异性益生菌菌株可增强先天性免疫反应,特别是吞噬活性和 NK 细胞杀伤活性,其中,双歧杆菌能够增强 IgA 的分泌,促使小肠粘膜上的淋巴细胞的分化及增殖<sup>[30]</sup>,并激活自然杀伤细胞和巨噬细胞,生成 IL-1、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  及 IFN 等细胞因子,激活肠粘膜免疫系统,调节机体的免疫应答,进而增强机体免疫力<sup>[31-32]</sup>。本试验中,添加了 EM 益生菌的小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-

6、IL-10、KC 浓度均极显著高于未添加组。感染性腹泻病原体主要侵袭肠上皮细胞,可引起肠液分泌增多和吸收障碍或者炎症<sup>[33]</sup>。益生菌可直接黏附于上皮细胞,从而在肠道黏膜表面定植,形成一道屏障,阻挡肠内有害病原的侵入<sup>[31]</sup>。IL-6、TNF- $\alpha$ 、内毒素等属于炎症反应类指标,其上升提示机体处于免疫应答状态,研究表明,人体中大部分免疫细胞和分泌的炎症介质都集中在肠道中,益生菌定植于肠道内,因此益生菌与人体免疫系统之间有最直接的关系<sup>[34]</sup>。基于本试验结果推测益生菌的使用可刺激机体免疫系统,上调了免疫相关分子,从而促进抗体水平的提升,但其具体分子机制还需要进一步研究。大量研究表明,益生菌增强机体免疫的途径主要是促进肠道淋巴细胞生成,增强淋巴细胞和效应B细胞的活力,从而促进机体免疫球蛋白的生成,如IgM和IgA<sup>[20,31]</sup>。部分益生菌活菌制剂已被证明具有强大的抗体应答作用。Kaila等<sup>[35]</sup>比较乳酸杆菌的活菌制剂和灭活制剂对患轮状病毒腹泻的作用,结果表明活菌制剂能够提升轮状病毒的特异性IgA抗体应答,而灭活菌制剂不能。本研究发现添加益生菌14 d后单一或复合益生菌均可不同程度地提升PEDV和PDCoV二联疫苗的抗体水平,与Inatomi<sup>[19]</sup>和Jin等<sup>[20]</sup>在PEDV、TGEV疫苗上的研究结果相似。因此,添加益生菌不仅可促进肠道内益生菌的定植,同时也可增强机体的免疫反应,从而促进疫苗抗体水平。

试验通过观察测量各组小鼠的空肠和回肠的肠绒毛长度、隐窝深度、绒毛长度/隐窝深度值发现,EM组空肠绒毛长度显著长于其他3组;NC组空肠绒毛长度和隐窝深度与其他3组均有显著差异;Bac组回肠绒毛长度显著长于其他3组;NC组回肠绒毛长度与其他3组均有显著差异;NC组和EM组隐窝深度与Lac组与Bac组均有显著差异。结果表明,饲用益生菌可以促进肠道上皮细胞的健康,这可能与益生菌可以促进营养物质消化吸收,缓解肠道细胞凋亡,维持肠道形态结构完整的特性有关<sup>[15]</sup>。

病毒性腹泻常常会导致肠道菌群失调,肠道内环境紊乱,进而降低肠道黏膜屏障功能,容易造成继发感染和免疫力降低。本团队曾比较分析感染PEDV母猪和仔猪肠道菌群的变化,发现感染PEDV后,肠道内菌群种类减少,益生菌类(如乳酸杆菌、双歧杆菌等)丰度大大降低,而致病性菌群丰度显著上升,如产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)等<sup>[36]</sup>。本试验中,复合益生菌制剂组与自然恢复相比复合益生菌制剂组香浓指数明显上升,辛普森指数明显下降;与正常组相比益生菌组Chao1指数及辛普森指数无明显差异,表明益生菌复合物制剂可明显促进肠道菌群失衡模型小鼠肠道菌群多样性恢复。黄蕊蕊等<sup>[37]</sup>分析了复合益生菌粉对抗生素清除菌群小鼠肠道菌群恢复动力学,发现益生菌组与正常组相比Chao1指数、ACE指数及辛普森指数无明显差异,添加益生菌组肠道菌群的辛普森指数与自然恢复组相比明显上升,表明益生菌制剂可在一定程度上促进肠道菌群失衡模型小鼠肠道菌群多样性恢复。试验添加益生菌小鼠肠道菌群OTU数量比NC组呈增加的趋势,EM组的OTU数量平均最高。试验前所有小鼠肠道80%以上的菌群分布于厚壁杆菌门和拟杆菌门,从第14天开始饲喂益生菌组小鼠肠道菌群组成和丰度均存在改变。试验结束时,EM组小鼠肠道内乳酸菌和普雷沃氏菌属丰度显著高于其他3组,EM组和Lac组的*Akkermansia*菌属显著高于其他两组。乳酸菌是一类利用碳水化合物产生乳酸的革兰氏阳性菌,大多数为厌氧菌。作为人类和动物肠道的正常菌群,乳酸菌可以增强肠道上皮细胞的屏障功能,诱导粘液蛋白和IgA的分泌,从而达到增强宿主天然免疫和获得性免疫应答的调节<sup>[38]</sup>。普雷沃氏菌是一类非运动的革兰氏阴性杆菌,包括50多个不同的物种,大多数定植于口腔和肠道;该类菌主要发酵产物为乙酸和琥珀酸及少量异丁酸、异戊酸和乳酸<sup>[39]</sup>。此外,普雷沃氏菌也是肠道内重要的维生素B1(Vitamin B1, VB1)合成菌,而VB1是三羧酸循环过程中酶的辅助因子,可为初始B细胞提供能量而促进其激活,从而有利于B细胞分化产生浆细胞,促进抗体产生<sup>[40]</sup>。*Akkermansia*菌属是一类厌氧、无运动的属于疣微菌门的革兰氏阴性菌,肠道中低丰度的*Akkermansia*可能表明黏液层较薄,从而导致肠道屏障功能减弱。该菌目前被认为是肠道最为关键的益生菌种之一,在改善代谢紊乱(如肥胖、糖尿病、脂肪肝)、肠道炎症、免疫和神经退行性疾病等方面具有巨大的应用前景<sup>[41]</sup>。基于本试验结果中饲喂益生菌后以上3种类型菌群丰度的显著增加,推测这些菌群可能参与了宿主肠道屏障、免疫细胞激活及降低肠道炎症等方面具有重要作用,增加的有益菌可通过调节免疫因子的产生间接上调了免疫系统从而增强了疫苗抗体水平的上升。

日粮添加EM益生菌可促进PEDV、PDCoV二联灭活疫苗抗体产生及上调相关免疫因子,保护肠道上皮细胞形态,调节宿主肠道菌群的组成与丰度,增加乳酸菌(*Lactobacillus*)和普雷沃氏菌(*Prevotella*)等有益菌的丰度。研究结果将为提高PEDV、PDCoV疫苗免疫效果和调节宿主肠道微生物提供试验依据。

致谢:国家级大学生创新创业训练计划项目(202110410008)对本研究给予了资助,谨致谢意!

## 参考文献 Reference:

- [1] LAW S K, CHAN J F. Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals [J]. *Virology journal*, 2015, 12(1): 1-3.
- [2] WANG Q, VALASOVA A N, KENNEY S P, et al. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs [J]. *Current opinion in virology*, 2019, 34: 39-49.
- [3] 刘芳宁. 益生菌对轮状病毒感染和腹泻的保护机制 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.  
LIU F N. Mechanisms for the protective effect of probiotics on rotavirus infection and diarrhea [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010.
- [4] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(8): 1350-1353.
- [5] WOO P C, LAU S K, LAM C S, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* [J]. *Virology journal*, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [6] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230.
- [7] SONG D P, ZHOU X, PENG Q, et al. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2015, 62(6): 575-580.
- [8] DONG N, FANG L, ZENG S, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China [J]. *Emerging infectious diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255.
- [9] 贺东生, 陈小芬, 王飞, 等. 我国集约化猪场新发猪丁型冠状病毒病的诊断 [J]. *猪业科学*, 2015, 32(10): 76-77.  
HE D S, CHEN X F, WANG F, et al. Diagnosis of new emerged porcine deltacoronavirus in industrial farming pigs in China [J]. *Swine industry science*, 2015, 32(10): 76-77.
- [10] 颜忠, 杨汉春. 2018—2020年中国部分省市猪流行性腹泻病毒 S1 基因的监测及遗传变异分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(2): 424-434.  
YAN Z, YANG H C. Surveillance and genetic variation analysis of S1 gene of porcine epidemic diarrhea virus in part provinces and municipalities of China from 2018 to 2020 [J]. *China animal husbandry & veterinary medicine*, 2022, 49(2): 424-434.
- [11] HE W T, JI X, HE W, et al. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus [J]. *Molecular biology and evolution*, 2020, 37(9): 2641-2654.
- [12] 宋德平. 猪病毒性腹泻的流行特点、疫苗及临床防控效果 [J]. *猪业科学*, 2018, 35(3): 52-54.  
SONG D P. Characterization of epidemiology, vaccine and clinic preventive effect of porcine viral diarrhea [J]. *Swine industry science*, 2018, 35(3): 52-54.
- [13] PAPP L V, LU J, HOLMGREN A, et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2007, 9(7): 775-806.
- [14] HASLER C M. Pre- and probiotics: where are we today? Introduction [J]. *British journal of nutrition*, 1998, 80(4): S195.
- [15] MARKOWIAK P, SLIZEWSKA K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition [J]. *Gut pathogens*, 2018, 10: 21.
- [16] MANNING T S, GIBSON G R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics [J]. *Best practice & research clinical gastroenterology*, 2004, 18(2): 287-298.
- [17] PRADHAN D, BISWASROY P, KAR B, et al. Clinical interventions and budding applications of probiotics in the treatment and prevention of viral infections [J]. *Archives of medical research*, 2022, 53(2): 122-130.
- [18] AFCHANGI A, LATIFI T, JALIVAND S, et al. Combined use of lactic-acid-producing bacteria as probiotics and rotavirus vaccine candidates expressing virus-specific proteins [J]. *Archives of virology*, 2021, 166(4): 995-1006.
- [19] INATOMI T, AMATATSU M, ROMERO-PEREZ G, et al. Dietary probiotic compound improves reproductive performance of porcine epidemic diarrhea virus-infected sows reared in a Japanese commercial swine farm under vaccine control condition [J]. *Frontiers in immunology*, 2017, 8: 1877.
- [20] JIN Y B, YANG W T, SHI CW, et al. Immune responses induced by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing the spike protein derived from transmissible gastroenteritis virus in piglets [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102(19): 8403-8417.

- [21] ISOLAURI E, JOENSUU J, et al. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. [J]. Vaccine, 1995, 13(3): 310.
- [22] 胡兴义. 益生菌对猪病毒性腹泻疫苗免疫效果的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.  
HU X Y. Effect of probiotics on immune of porcine viral diarrhea vaccine [D]. Guiyang: Guizhou University, 2018.
- [23] YE Y, LI Z, WANG P, et al. Effects of probiotic supplements on growth performance and intestinal microbiota of partridge shank broiler chicks [J]. Peer J, 2021, 9: e12538.
- [24] 陈燕君. 猪流行性腹泻病毒江西分离株 CH/JX/01 的致病性及母源抗体交叉保护的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.  
CHEN Y J. Study on pathogenicity and colostral antibodies cross protection of porcine epidemic diarrhea virus CH/JX/01 strain isolated in Jiangxi [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2016.
- [25] 夏莹莹, 董潮, 高增兵, 等. 复合有机酸对大肠杆菌攻毒小鼠免疫功能及肠道菌群的影响[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(5): 1207-1220.  
XIA Y Y, DONG C, GAO Z B, et al. Effects of compound organic acid on the immune function and intestinal flora of mice challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(5): 1207-1220.
- [26] 彭棋. 猪流行性腹泻病毒江西株 CH/JX/01 的分离, 特性分析及其抗原性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.  
PENG Q. Isolation, characterization, and antigenicity of a porcine epidemic diarrhea virus strain CH/JX/01 from Jiangxi, China in 2014 [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2016.
- [27] LOMBARDELLI L, LOGIODICE F, et al. Evaluation of secreted cytokines by multiplex bead-based assay (X MAP technology, luminex) [J]. Methods in molecular biology, 2021, 2285: 121-130.
- [28] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [29] 宋德平. 新现和再现猪主要肠道腹泻病毒及腹泻猪肠道微生物群落宏基因组学研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.  
SONG D P. Studies on important emerging and re-emerging porcine diarrheal viruses and metagenomics of gut microflora of diarrheal pigs [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2016.
- [30] XU J, REN Z, CAO K, LI X, YANG J, et al. Boosting vaccine-elicited respiratory mucosal and systemic COVID-19 immunity in mice with the oral lactobacillus plantarum [J]. Frontiers in nutrition, 2021, 8: 789242.
- [31] 王长文, 张岚, 马洪波. 双歧杆菌对肠黏膜粘附及免疫调节功能的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(1): 42-45.  
WANG C W, ZHANG L, MA H B. Research progress of probiotics for disease treatment research progress of bifidobacterium on intestinal mucosal adhesion and immune regulation [J]. Journal of Jilin medical college, 2010, 31(1): 42-45.
- [32] INFUSINO F, MARAZZATO M, et al. Diet supplementation, probiotics, and nutraceuticals in SARS-CoV-2 Infection: a scoping review [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1718.
- [33] 梁玉彩, 周瑞清, 孙文琴. 小儿感染性腹泻的临床特征及流行病学调查研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(14): 3303-3305.  
LIANG Y C, ZHOU R Q, SUN W Q. Clinical characteristics and epidemiological investigation of pediatric infective diarrhea [J]. Maternal and child health care of China, 2017, 32(14): 3303-3305.
- [34] 边佳昕, 闵涛玲, 陈昌发, 胡海峰. 益生菌用于疾病治疗的研究进展[J]. 世界临床药物, 2017, 38(2): 134-137.  
BIAN J X, Ming T L, Chen C F, et al. Research progress of probiotics for disease treatment [J]. World clinical drugs, 2017, 38(2): 134-137.
- [35] KAILA M, ISOLAURI E, et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain [J]. Pediatric research, 1992, 32(2): 141-144.
- [36] SONG D P, PENG Q, CHEN Y, et al. Altered gut microbiota profiles in sows and neonatal piglets associated with porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 17439.
- [37] 黄蕊蕊, 刘文正, 李亚楠. 复合益生菌粉对小鼠免疫机能的影响研究[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(7): 61-66.  
HUANG R R, LIU W Z, Li Y N. The immunomodulatory effects of compound probiotics on mice [J]. Food and nutrition in China, 2021, 27(7): 61-66.
- [38] LIU H Y, GIRAUD A, SEIGNEZ C, et al. Distinct B cell subsets in peyer's patches convey probiotic effects by *Limosilactobacillus reuteri* [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 198.
- [39] YEOH Y K, SUN Y, IP L, et al. Prevotella species in the human gut is primarily comprised of *Prevotella stercorea* and related lineages [J]. Scientific reports, 2022, 12(1): 9055.
- [40] YOSHII K, HOSOMI K, SAWANE K, et al. Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity [J]. Frontiers in nutrition, 2019, 6: 48.
- [41] WU Z, XU Q, GU S, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates *Clostridioides difficile* infection in mice by modulating the intestinal microbiome and metabolites [J]. Frontiers in microbiology, 2022, 18: 841920.