



河北农业大学

HEBEI AGRICULTURAL UNIVERSITY

全日制硕士专业学位（毕业）论文

女贞子对断奶仔猪小肠黏膜 形态及免疫功能的影响

学位申请人：张迪

指导教师：倪耀娣 教授

学位名称：兽医硕士

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一八年十二月八日

分类号： S853.74
密 级： 公开

单位代码： 10086
学 号： 20169200802

女贞子对断奶仔猪小肠黏膜 结构及免疫功能的影响

Effect of Ligustrum lucidum on intestinal mucosal structure and immune function in weaned piglets

学位申请人：张 迪

指导教师：倪耀娣 教授

学位名称：兽医硕士

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一八年十二月八日

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其它人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 河北农业大学 或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已 在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：张迪 签字日期：2019年6月11日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 河北农业大学 有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 河北农业大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：张迪 导师签名：倪耀婷
签字日期：2019年6月11日 签字日期：2019年6月11日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

摘要

中国是全球最大的抗生素生产国和消费国，同时也是全球细菌耐药最为严重的国家之一。目前，我国每年约一半的抗生素作为饲料添加剂被普遍使用于畜禽养殖业，抗生素具有防治疾病，促进生长、节约营养等作用。由于监管体系的不够完善，受利益驱使等原因，厂商和养殖户在抗生素的使用过程中存在盲目添加、滥用抗生素等一系列问题，进而引发细菌耐药性增加、危害人体健康、破坏环境生态以及损害经济等影响。数据显示，国内抗生素每年总产量大约为 21 万吨，国内消费约 18 万吨，其中用于畜牧及饲料行业的抗生素就高达 9.7 万吨，约占 54%。近年来，抗生素使用量仍在不断上升，其中绝大部分是作为饲料添加剂而不是治疗药物使用。我国已经连续多次在各种食用肉制品、乳制品甚至动物源性生化药品中检出抗生素残留，人长期摄入各种抗生素残留超标的动物产品相当于长期低剂量服用抗生素，产生致畸、致癌、致突变作用，因此，重视食品安全问题，刻不容缓。自从人们发现抗生素等给动物带来副作用，也给人类健康带来危害以后，国内外有关专家和学者一直在寻找改进和替代西药，于是我国传统的天然中兽医药应运而生。女贞原产于中国，在我国有普遍种植，而女贞子为女贞成熟后的干燥果实，属于补益类中草药，是一味传统的扶正固本类药物，富含多种营养成分和生物活性物质。

选择健康杜×长×大断奶仔猪 50 只，随机分为 5 组，每组 10 只。5 组分别为对照组，女贞子高、中、低剂量组和抗生素组。女贞子高、中、低剂量组在日粮中分别添加 2%、1%和 0.5%的女贞子粉，抗生素组在日粮中添加硫酸庆大霉素(1mg/kg)，对照组不添加任何药物。(1) 研究女贞子对断奶仔猪生长性能、血常规和肝肾功能的影响；(2) 女贞子对仔猪十二指肠、空肠、回肠肠绒毛高度(VH)、隐窝深度(CD)及 VH/CD 值得影响；(3) 建立仔猪腹泻模型，研究女贞子对大肠杆菌感染仔猪小肠十二指肠、空肠、回肠肠绒毛高度(VH)、隐窝深度深度(CD)及 VH/CD 值得影响；(4) 女贞子对大肠杆菌感染下仔猪小肠基因的表达水平。

结果：(1) 2%女贞子和 1%女贞子能显著降低仔猪的料重比($P<0.05$)，2%女贞子有显著提高仔猪的末重($P<0.05$)；WBC 抗生素组与低剂量组比较有显著上升趋势($P<0.05$)；RBC 对照组与中剂量组比较有显著上升趋势($P<0.05$)；MCV 对照组、低剂量组、抗生素组较中剂量组有显著上升趋势($P<0.05$)；MCH 对照组、低剂量组、抗生素组较中剂量组有显著上升的趋势($P<0.05$)；RDW-SD 中剂量组与对照组显著降低的趋势($P<0.05$)；与对照组相比，高剂量组的谷草转氨酶(AST)有显著降低($P<0.05$)；与对照组的 AST/ALT 相比，高剂量组、低剂量组、抗生素组均有显著降低($P<0.05$)；抗生素组的血清肌酐显著高于高、中、低女贞子剂量组和对照组($P<0.05$)。

(2) 十二指肠：VH 对照组与高、中剂量组比较有显著差异($P<0.05$)，低剂量组与高剂量组组、中剂量组组比较有显著差异($P<0.05$)，抗生素组与中剂量组组比较有显著差异($P<0.05$)；VH/CD 值对照组、抗生素组与中剂量组组比较有显著差异($P<0.05$)。

空肠：VH 高、中、低剂量组和抗生素组较对照组均有提高的趋势，但无显著差异 ($P>0.05$)；CD 高剂量组其余四组有降低的趋势，但无显著差异 ($P>0.05$)；VH/CD 值女贞子高中低三组均高于对照组和抗生素组，但无显著差异 ($P>0.05$)。

回肠：VH 对照组低于高、中、低剂量组有显著差异 ($P<0.05$)。

(3) 攻毒后十二指肠：VH 对照组与高、中、低剂量组抗生素组比较有极显著差异 ($P<0.01$)；CD 对照组与高、中剂量组有显著差异，低剂量组与中剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)；VH/CD 值对照组与高、中剂量组比较有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与中剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)。

攻毒后空肠：VH 对照组与高剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)；VH/CD 值对照组与高剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)。

攻毒后回肠：VH 对照组与高中抗有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与高、抗有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)；VH/CD 值对照组与高、中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)，低剂量组与高、中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)。

(4) 通过荧光定量 PCR 测得女贞子对大肠杆菌感染仔猪小肠基因的表达水平能够显著降低 TNF- α 和 IL-1 β 。

结论：综上所述，女贞子可以提高仔猪生产性能和改善肝肾功能，提高仔猪肠绒毛高度、降低隐窝深度，并对肠道黏膜免疫起到积极作用。

关键词：女贞子；断奶仔猪；肠黏膜形态；TNF- α ；IL-1 β

Effect of *Ligustrum lucidum* on intestinal mucosal structure and immune function in weaned piglets

Graduate Candidate: Zhang Di

Major: Veterinary Medicine

Advisor: Prof. Ni Yaodi

Abstract

China is the world's largest producer and consumer of antibiotics, as well as one of the world's most severely resistant bacteria. At present, about half of the antibiotics in China as feed additives are widely used in livestock and poultry breeding, antibiotics have the role of preventing and controlling diseases, promoting growth, saving nutrition and so on. Because the supervision system is not perfect, driven by interests and other reasons, manufacturers and farmers in the use of antibiotics in the process of blind addition, abuse of antibiotics and other problems, and then lead to increased bacterial resistance, harm to human health, damage to environmental ecology and damage to the economy and other effects. Data show that the total annual production of antibiotics in China is about 210,000 tons, domestic consumption of about 180,000 tons, of which for the livestock and feed industry as high as 97,000 tons of antibiotics, accounting for about 54%. Antibiotic use has continued to rise in recent years, most of which is used as a feed additive rather than as a therapeutic drug. China has repeatedly detected antibiotic residues in a variety of edible meat products, dairy products and even animal-derived biochemical drugs, people long-term intake of a variety of antibiotic residues of excess animal products equivalent to long-term low doses of antibiotics, resulting in teratogenic, carcinogenic, mutagenic effects, therefore, pay attention to food safety issues, it is urgent. Since people found that antibiotics and other side effects on animals, but also to human health, the relevant experts and scholars at home and abroad have been looking for improvements and alternatives to Western medicine, so China's traditional natural veterinary medicine came into being. *Ligustrum* is native to China and is commonly cultivated in China. *Ligustrum lucidum* is the dry fruit of *Ligustrum lucidum* after ripening. It belongs to traditional Chinese herbal medicine of replenishing type, and it is a kind of traditional Chinese medicine for strengthening and strengthening foundation. It is rich in various nutrients and biological active substances.

Test method: Choose 50 healthy du long large weaning piglets, randomly divided into 5 groups, each group of 10. The 5 groups were control group, Chinese herbal Medicine high, medium and low dose group and antibiotic group. The high, medium and low dose groups of privet added 2%, 1% and 0.5% privet powder to the diet respectively,

and the antibiotic group added gentamicin sulfate (1mg/kg) to the diet, and no drugs were added to the control group. (1) To study the effect of privet on the growth performance and blood routine of weaned piglets; (2) Privet is worth affecting the duodenal, jejunum, ileum intestinal villi height (VH), recess depth (CD) and VH/CD of Piglets, and (3) establish a model of piglet diarrhea to study the small intestine duodenal, jejunum and Ileum intestinal villi height (VH), recess depth depth (CD) and VH/CD are worth affecting; (4) The expression level of small intestine gene in piglets infected with Escherichia coli infection.

Results: (1) 2% privet and 1% privet could significantly reduce the weight ratio of piglets ($P<0.05$), 2% of Privet had significantly increased the end weight of piglets ($P<0.05$), and there was a significant upward trend between WBC antibiotic group and low dose Group ($P<0.05$) ; There was a significant upward trend in the RBC control group compared with the middle dose Group ($P<0.05$); there was a significant upward trend in the MCV control group, low dose group and antibiotic group compared with the middle dose Group ($P<0.05$), and there was a significant upward trend in the MCH control group, low dose group and antibiotic group compared with the middle dose Group ($P<0.05$) ; The trend of significant decrease of dose group and control group in RDW-SD ($P<0.05$).

(2) Duodenal: There was a significant difference between the VH control group and the high and Medium dose Group ($P<0.05$), there were significant differences between the low dose group and the high-dose group and the middle Dose Group ($P<0.05$), and there was a significant difference between the antibiotic group and the middle Dose Group ($P<0.05$); VH/CD Value Control group, There was a significant difference between the antibiotic group and the middle Dose Group ($P<0.05$); Jejunum: VH High, medium and low dose group and antibiotic group had a tendency to improve compared with the control group, but there was no significant difference ($P>0.05$); the remaining four groups in the CD high-dose group had a decreasing trend, but there was no significant difference ($P>0.05$); VH/CD value Privet High School lower three groups were higher than the control group and antibiotic group, but there was no significant difference ($P>0.05$).

Ileum: There were significant differences in the VH control group than in the high, medium and low dose groups ($P<0.05$).

(3) duodenal: The VH control group was significantly different from the antibiotic group in the high, medium and low dose groups ($P<0.01$); there were significant differences between the CD control group and the high and medium dose groups, and there were significant differences between the low dose group and the middle Dose Group ($P<0.05$); The VH/CD value control group was associated with high and

There were significant differences in the middle dose Group ($P<0.01$), and there

was a significant difference between the low dose group and the middle Dose Group ($P<0.05$).

There was a significant difference between the VH control group and the High Dose Group ($P<0.05$), and the control group of VH/CD value was significantly different from that of the high dose Group ($P<0.05$). After the attack, there was a significant difference between the VH control group and the High School ($P<0.01$), the low dose group was significantly different from the high and anti-resistance ($P<0.01$), the low dose group was significantly different from the middle dose Group ($P<0.05$), and the VH/CD value control group was significantly different from the high and Medium dose Group ($P<0.05$),

There was a significant difference between the low dose group and the high and Medium dose Group ($P<0.05$).

(4) The expression level of small intestine gene in piglets infected with *Escherichia coli* by fluorescence quantitative PCR can significantly reduce TNF- α and IL-1 β .

Conclusion: To sum up, privet can improve the production performance of piglets and improve liver and kidney function, improve the height of intestinal villi in piglets, reduce the depth of recess, and play a positive role in intestinal mucosal immunity.

Keywords: *Ligustrum lucidum*; weaned piglets; Intestinal mucosal morphology; TNF- α ; IL-1 β .

缩略词表

缩略词	英文名称	中文全称
ALB	Total serum protein	血清总蛋白
ALT	Serum alanine aminotransferase	血清谷丙转氨酶
ALP	Serum alkaline phosphatase	血清碱性磷酸酶
AST	Serum Aspartate Transaminase	血清谷草转氨酶
Cr	Serum creatinine	血清肌酐
Hb	Hemoglobin	血红蛋白
HCT	Hematocrit	红细胞压积
MCH	Mean corpuscular hemoglobin	平均红细胞血红蛋白含量
MCV	Mean red cell volume	平均红细胞体积
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均红细胞血红蛋白浓度
MPV	Average platelet volume	血小板平均体积
PCT	Platelet pressure	血小板压积
PDW	Platelet distribution width	血小板分布宽度
RBC	Red blood cell count	红细胞计数
RDW-CV	Erythrocyte distribution width - coefficient of variation	红细胞分布宽度-变异系数
RDW-SD	Red blood cell distribution width - standard deviation	红细胞分布宽度-标准差
Urea	Urea nitrogen	尿素氮
WBC	White blood cell count	白细胞计数

目 录

1 引言	1
1.1 女贞子综述	1
1.2 提取工艺	1
1.2.1 女贞子多糖的提取工艺	1
1.2.2 三萜类化合物的提取工艺	1
1.3 女贞子的药理作用	2
1.3.1 护肝作用	2
1.3.2 调节免疫作用	2
1.3.3 抗氧化、抗衰老作用	2
1.3.4 抗炎作用	3
1.3.5 其他作用	3
1.4 女贞子在畜禽生产中的应用	3
1.4.1 女贞子在养猪生产中的应用	3
1.4.2 女贞子在鸡生产中的应用	4
1.4.3 女贞子在羊生产中的应用	4
1.4.4 女贞子在牛生产中的应用	5
1.5 展望	5
2 材料与方法	6
2.1 材料	6
2.1.1 试验动物	6
2.1.2 试验饲料日粮组成	6
2.1.3 主要试剂及药品	6
2.1.4 主要仪器设备	7
2.2 试验动物的分组与处理	8
2.2.1 女贞子对健康断奶仔猪的影响	8
2.2.2 女贞子对大肠杆菌感染断奶仔猪的肠道保护作用	8
2.3 方法	9
2.3.1 生长发育指标的观察	9
2.3.2 断奶仔猪小肠形态学观察	9
2.3.3 断奶仔猪肠道形态学观察	10
2.3.4 断奶仔猪肠道 TNF- α 及 IL-1 β 基因表达的测定	10
2.4 数据统计分析	11
3 结果	12
3.1 女贞子对仔猪肝肾功能的影响	12
3.2 女贞子对仔猪生长性能和血常规的影响	12
3.3 女贞子对仔猪肠道发育的影响	14
3.4 女贞子对大肠杆菌感染仔猪的肠道保护作用	15
3.5 女贞子对大肠杆菌感染仔猪肠道后基因表达水平的影响	16
3.5.1 目的基因 TNF- α 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果	16
3.5.2 目的基因 IL-1 β 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果	17
3.5.3 管家基因 β -actin 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果	18

4 讨论.....	23
4.1 女贞子对仔猪肝肾功能的影响.....	23
4.2 女贞子对断奶仔猪生产性能和血常规的影响.....	23
4.2.1 女贞子对仔猪生长性能的影响.....	23
4.2.2 女贞子对仔猪生血常规的影响.....	24
4.3 女贞子对仔猪肠道发育的影响.....	24
4.4 女贞子对大肠杆菌感染下仔猪肠道发育的影响.....	25
4.5 女贞子对大肠杆菌感染仔猪肠道中 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平的影响.....	25
5 结论.....	27
参考文献.....	28
作者简介.....	32
致谢.....	33

1 引言

1.1 女贞子综述

查阅近些年来关于中药女贞子相关的文献,对女贞子科研的发展史、提取工艺、畜禽免疫上的应用进行了多方面的总结,并对女贞子今后的研究进行了展望,为对女贞子进一步的深入研究开发与开发提供理论依据。

女贞子为木犀科乔木女贞成熟干燥后的果实,果实味道甘、苦;主要药理作用是滋补肝脏和肾脏,明目,清虚热^[1]。女贞子在《神农本草经》、《中国药典》中均有记载,在 2000 多年前就被当作中草药应用到临床治疗之中,现代药理已对其进行了研究证实,中药女贞子作为纯天然植物饲料添加剂有极广阔的应用前景与推广价值^[2]。女贞子的主要成分是齐墩果酸、乙酰齐墩果酸、熊果酸及一些亚麻酸等。女贞子含 14.9%脂肪油,油中的棕榈酸与硬脂酸为 19.5%和 80.5%的油酸及亚麻酸等。女贞子还含有矿物质铁、铜、锌、锰等微量元素^[3]。女贞子在畜禽类中的应用主要是提高动物本身免疫力、抗衰老、抗氧化、抗菌、抗病毒和抗炎作用、升高白细胞和抗炎抑菌、保肝护肝、强心、利尿、降血糖和抗癌等作用^[4]。清除羟自由基、超氧阴离子自由基和活性氧,提高抗氧化酶活力^[5]。从而抑制机体免疫器官退化及提高免疫功能^[5]。在市场中,鸦胆子、水蜡果因为与其外形相似,而容易被不法商人利用。女贞子种子呈肾形或近肾形,油性,气芳香,味甘而微苦涩^[6]。近些年来国内外学者对女贞子进行了深入研究并取得了很大的进展,从女贞子中共分离和鉴定出 100 多种化合物,主要有黄酮类,萜类,苯醇类,脂肪酸,多糖等多种化合物^[6]。

1.2 提取工艺

1.2.1 女贞子多糖的提取工艺

根据邱蓉丽等人^[7]的实验,对女贞子进行了多糖的提取。取 200 g 女贞子置于 70℃烘箱中,3h 后将烘干后的女贞子倒入粉碎机粉碎,过 40 目筛。把女贞子粉放于 100℃蒸馏水中在加热回流 2 h,用真空泵抽滤。把分离出的水溶液,用旋转蒸发器脱除水分浓缩,浓缩到浓度约 3 g/ml 时停止,此时加入约一定量乙醇,使乙醇体积分数占比达到 70%,再用玻璃棒进行搅拌 15 min 后静置沉淀 6 h。最后真空泵抽滤析出沉淀物,抽滤得到的滤饼为女贞子多糖,最后放于烘箱中烘干,得醇浸膏率为 10.5%。

1.2.2 三萜类化合物的提取工艺

齐墩果酸和熊果酸是女贞子中的主要化合物^[8]。常见的提取方法是超声法,以齐墩果酸为标准品,按以下步骤进行提取:用超声分离女贞子,酸沉碱溶盐析,脱色脱脂,纯化结晶,经多次试验得出最佳的提取条件为:料液比为 1: 20,70%乙醇,温度 60 ℃,超声波功率 200 W,

50 min, 提取率 92%。以熊果酸为标准品, 最佳提取工艺为: 温度 80 °C, 时间 120 min, 料液比 1 : 9, 90%乙醇, 回流提取 2 次, 在此条件下可得熊果酸提取率为 5.12%^[8,9]。

醚萜类化合物的提取工艺

裂环烯醚萜类是女贞子中醚萜类主要的化合物, 常见的提取方法是水提醇沉法, 是利用乙醇进行提取, 75%乙醇, 液料比为 6 : 1, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 在此条件下可得到环烯醚萜总苷, 提取率为 66.67%^[10]。

黄酮类化合物的提取工艺

女贞子中黄酮类化合物最常用的提取方法是超声波提取法, 选取 50%的乙醇, 液料比为 70 : 1(g/mL) 超声波功率 600W, 时间 20min, 在此条件下可得到总黄酮, 提取率为 13.61%^[11,12]。

挥发油类化合物的提取工艺

三苯甲醇、乙酸龙脑酯、桉油精、苯甲醇等是女贞子中挥发油类主要的化合物成分, 最见的提取方法是常规水蒸汽蒸馏法。在旋转蒸发仪中, 蒸馏 5 h, 用乙醚萃取 3 次馏出液, 萃取液以无水硫酸钠干燥过夜, 静止蒸发乙醚, 在此条件下可得淡黄色, 带有微香气味的挥发油^[13]。

1.3 女贞子的药理作用

1.3.1 护肝作用

女贞子中保肝的主要活性成分是齐墩果酸、熊果酸和红景天苷^[14]。红景天苷具对于 CCl₄ 诱导的肝损伤有保护作用, 能显著降低血清中 AST 和 ALT 的含量^[15]; 王晓东等人研究中, 红景天苷可明显降低肝损伤所致血清 ALT、NO 的升高, 降低损伤肝组织 MDA、TG 的含量^[16]。单芝丹等人研究中, 日粮中添加女贞子粉给 56 日龄肥育猪能提高猪肝脏的抗氧化指标, 降低 MDA 水平^[17]。

1.3.2 调节免疫作用

女贞子可以增强动物机体体液免疫功能。女贞子中的多糖和齐墩果酸是调节机体免疫功能的两种活性成分。有研究^[18], 饲料中添加女贞子提取物有提高猪血清 C S F V 和 F M D V 抗体的效果, 尤其是对猪瘟疫苗免疫佐剂效果最明显, 说明女贞子提取物可以提高猪的体液免疫能力。

1.3.3 抗氧化、抗衰老作用

齐墩果酸、熊果酸是女贞子中抗氧化功能的主要有效成分。齐墩果酸和熊果酸中均含有酚羟基等具有抗氧化、消除自由基的官能团, 因而对动物机体具有抗氧化、抗衰老的作用^[14]。并且女贞子提取液有显著改善衰老的小鼠的记忆和学习能力, 其机理与清除自由基、提高抗氧化酶活性和减少过氧化脂质的生成密切相关^[19]。

1.3.4 抗炎作用

女贞子中的齐墩果酸、熊果酸、红景天苷、酪醇以及羟基酪醇是抗炎成分的主要成分^[20]。女贞子对巴豆油或二甲苯造成小鼠的耳廓肿胀,组胺或乙酸造成小鼠腹腔毛细血管通透性的升高,角叉菜胶、蛋清、甲醛性大鼠足趾肿胀,急性和慢性炎症都有抑制作用,并能提高大鼠肾上腺质量,降低大鼠炎性组织中 PGE 含量^[21]。

抗肿瘤

齐墩果酸对肿瘤细胞具有诱导凋亡的作用,并且还具有改善动物机体的免疫功能^[22]。齐墩果酸通过抑制小鼠体内肿瘤细胞中的 survivin 及 Bcl-2 蛋白的表达,从而提高凋亡率,诱导了肿瘤细胞的凋亡^[22]。向敏等人^[23]研究,女贞子有抑制瘤质量增长的作用,由于肿瘤细胞的黏附能力被女贞子多糖所抑制,导致肿瘤细胞对外界的反应能力下降。女贞子中主要发挥抗肿瘤作用活性分为熊果酸、齐墩果酸和红景天苷、酪醇,也是抗器官肿瘤、白血病和皮肤癌的活性成分^[24-27]。

1.3.5 其他作用

女贞子不仅具有保肝、调节免疫(免疫双向调解作用)、抗氧化衰老、抗炎和抗肿瘤等多方面的药理作用,还具有降糖、降脂作用,抗高血压、抗血小板聚集,抗胃溃疡药理特效等特点^[20, 21, 28]。

1.4 女贞子在畜禽生产中的应用

1.4.1 女贞子在养猪生产中的应用

对于母猪,日粮中添加复方女贞子散饲喂母猪时,可以提高母猪的活仔数、仔猪成活率和仔猪的初生重与断奶重,仔猪 40 日龄断奶体重和日增重有极显著提高($P<0.01$),并且腹泻率有明显的降低^[29]。日粮中添加女贞子可以改善的母猪生产性能和提高新生仔猪的免疫功能,减少仔猪腹泻的发生和提高仔猪的生长性能^[29]。

对于仔猪,饲料中添加女贞子应用于断奶仔猪上,能提高仔猪的免疫能力。可有预防早期断奶仔猪的腹泻,日粮中添加女贞子及抗生素均可显著提高断奶仔猪的平均日增重及平均日采食量($P<0.05$),同时,还可显著提高仔猪的抗氧化能力,女贞子可以升高血清或组织抗氧化酶的活性,减少血清或组织中 MDA 含量,增强了抗氧化的作用,并且抗氧化效果优于抗生素^[28]。从改善生产性能、提高断奶仔猪抗氧化能力方面来看,女贞子具有替代抗生素的可行性^[29]。

对于育肥猪,单芝丹等^[17]研究表明,女贞子提取物可以改善仔猪和生长肥育猪的生长性能,并能提高体内抗氧化的能力,提高了育肥猪肉的品质。女贞子粉及其提取物均可升高血清活性与组织抗氧化酶活性,提高育肥猪抗氧化能力,提升部分肉品的品质,并且优于金霉素^[17]。

养鸡生产中的应用

1.4.2 女贞子在鸡生产中的应用

对于雏鸡, 复方女贞子(由女贞子、黄芩、党参组成) 多糖能提高畜禽机体免疫力, 饲料中添加复方女贞子多糖可显著提升血液中淋巴细胞的数量、淋巴细胞转化率、巨噬细胞吞噬率, 达到提高畜禽的非特异性免疫。复方女贞多糖可是机体过早的产生抗体, 加快抗体上升速度, 增加抗体的高峰期持续时间, 进而达到了提高畜禽的特异性免疫。还可以促进机体免疫器官的生长发育, 增加脾脏和法氏囊的重量^[30]。此外, 饲料中添加复方女贞子多糖可以有效清除雏鸡体内的自由基并提高雏鸡的抗氧化能力^[30]。

对于蛋鸡, 日粮中添加女贞子可提高蛋鸡的产蛋率和饲料转化率, 实践表明长期食用女贞子具有以上的功效, 并可明显提高蛋鸡的产蛋数^[31]。但对蛋鸡的蛋重、平均日采食量、死亡率等无明显影响^[32]。饲喂女贞子, 能够提升蛋鸡外周淋巴细胞的转化率, 对育成期的蛋鸡生长发育和免疫能力有改善作用, 能促进育成期蛋鸡的生长发育和提高蛋鸡的生产性能^[33]。还可以提高蛋鸡机体内 C3、C4 补体含量, 增强蛋鸡的抗应激能力和免疫功能, 在攻毒模型组新城疫抗体中添加女贞子, 可大大的提高了血清中 TNF 的含量, 对新城疫的抗体的形成提供促进作用^[34]。

对于肉鸡, 郭晓秋等^[35]研究表明, 饲料中添加酒蒸女贞子原粉可提高肉鸡生长后期的日增重及料肉比, 还可以提高肝脏和血清中的 SOD、CAT 等生物的比率, 降低 MDA 的比率, 促进了氧自由基的清除, 能防止过氧化物对动物机体的损害, 对抗氧化功能有积极作用。增加 TP 含量, 降低 TC、ALT、AST 含量及提高 ALP 的趋势, 酒蒸女贞子能有效降低肉鸡血清中 TC 含量, 提升动物机体对胆固醇的运输能力^[36]。还能显著提高肉鸡生长前期的胸腺指数、血清 C3 含量对肉鸡生长性能和免疫功能有积极作用^[37]。在促进肉鸡生长、增强免疫功能方面对血清免疫球蛋白、IL-2 含量有提高作用^[38]。

1.4.3 女贞子在羊生产中的应用

在山羊中的应用主要是富硒女贞子可促进山羊外周血淋巴细胞 IL-2 的分泌和提高其抗氧化能力^[39]。富硒女贞子可增加山羊外周血淋巴细胞培养上清 IL-2 的分泌, 使其血清中的含量显著提高, 具有较强的细胞免疫调节作用, 且脾脏指数显著提高, 而饮水中添加富硒女贞子水煎液对鸡新城疫抗体效价的影响差异不明显, 通过提高免疫细胞因子、细胞免疫或非特异性免疫而增强机体免疫功能的作用^[39]。在提高抗氧化能力方面, 实验发现富硒女贞子可更大力度的提高山羊外周血淋巴细胞 SOD 活性, 清除更多的氧化自由基, 具有更强的抗氧化能力^[40]。劳雪芬等研究表明日粮中添加富硒女贞子在提高山羊产奶量的同时, 亦提高了血液 RBC、HGB 和血清 TP、ALB 的含量, 降低了血清 AST 活性^[41]

在绵羊中的应用主要是女贞子可促进绵羊瘤胃发酵、抗氧化功能和营养物质消化率^[42]。研究表明, 饲料中添加女贞子提高了绵羊屠体重, 改善了绵羊血液抗氧化功能, 提高了绵羊瘤胃液总挥发性脂肪酸浓度和丙酸的浓度, 降低了瘤胃液氨态氮的浓度和血浆尿素氮的浓度, 显著提高了日粮有机物质和干物质表观消化率^[42]。女贞子提取物对绵羊瘤胃细菌总数无显著影响, 在较低浓度范围内, 女贞子提取物对饲料干物质消化率的有明显的提高, 对饲料粗蛋白瘤胃 48h 降解率的提高有促进作用, 并且没有毒副作用, 不影响绵羊肝、肾功能及骨骼, 对绵羊是安全

的^[42]。

1.4.4 女贞子在牛生产中的应用

丑有财研究表明,单独在犊牛日粮中添加复方女贞子能有效降低 1.21%的犊牛腹泻率,并且复方女贞子能促进犊牛的生长发育和提高犊牛自身的免疫水平^[43]。赵小伟等研究补饲女贞子对泌乳奶牛生产性能及血液生化指标的影响,结果表明,补饲女贞子对奶牛产奶量有一定程度的增强^[44]。

1.5 展望

近些年养殖业在高速的发展,饲料添加剂越来越受重视并且已经被广泛的用于畜牧业中。使用添加剂饲料对提高动物机体的免疫能力和生产性能有着极大的改善,饲料添加剂的主要成分一般是化学合成药物、抗生素和激素类药物,畜禽长期使用会造成体内药物残留和耐药性,畜禽产品也会有药物和毒素残留,有导致癌症、基因突变、畸形的可能性,进而危害人类健康,其粪便等排泄物也会造成周边环境的污染。而中草药饲料添加剂由于天然性、多功能性、安全性和价格低廉等优点,在国内往外已经被越来越多的人所认可。中草药饲料添加剂的开发使用顺应当今世界“绿色农业”的发展趋势,具有非常广阔的发展前景。女贞子是中草药产品,无有害物质,毒副作用小,生长的范围广,在我国有广泛的种植。并且其药效作用丰富有提高动物机体的免疫作用、抗菌作用、抗病毒与抗炎作用等作用。但目前女贞子在养猪业中应用较少,本论文旨在研究仔猪饲料中添加女贞子对饲料利用率、对感染大肠杆菌仔猪肠绒毛高度、隐窝深度,并对肠道黏膜免疫功能着重研究,为将来预防畜禽疾病的发生,克服畜产品药物残留的问题,提高畜产品的质量,都起到积极推动作用。综上所述的原因,女贞子产品的研发必将对我国畜牧业产生重要的影响。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 试验动物

21 日龄杜×长×大仔猪 20 头由天津农垦康嘉第一育肥猪场提供。实验仔猪在实验动物房饲养，各试验组的管理条件均相同，自由饮水和采食，仔猪饲料由天津通和饲料有限公司提供。猪舍每天打扫一次，保持猪舍内通风良好，空气新鲜，并定期进行消毒，饲养管理与消毒等程序均按实验动物手册进行，注意观察仔猪的异常行为及时发现疾病的发生。常规饲养一周后，进入试验。

2.1.2 试验饲料日粮组成

基础日粮组成及营养水平，其中各种原料的含量参照 NRC（1998）标准，日粮组成及营养水平见表 3。

表 1 基础日粮组成和营养水平
Table 1 Daily ration and nutrition level

原料组成	含量	营养水平	含量
玉米/%	63.00	消化能/(MJ/kg)	14.42
豆粕/%	21.00	粗蛋白质/%	20.01
膨化大豆/%	8.00	粗脂肪/%	4.61
鱼粉/%	5.00	赖氨酸/%	1.35
石粉/%	0.80	蛋氨酸/%	0.35
磷酸氢钙/%	1.00	苏氨酸/%	0.79
赖氨酸/%	0.20	钙/%	0.81
食盐/%	0.30	磷/%	0.64
预混料/%	0.50	有效磷/%	0.42
沸石/%	0.20		

注：预混料为每千克日粮提供铁 100 mg，铜 10 mg，锰 40 mg，锌 100 mg，硒 0.3 mg 碘 0.5 mg，维生素 A 15000 IU，维生素 D3 3000 mg，维生素 E 40 mg，维生素 K 2 mg，维生素 B12 0.2 mg，烟酸 40 mg，泛酸 20 mg，叶酸，胆碱 1000 mg。

2.1.3 主要试剂及药品

表 2 试剂和药品列表
Table 2 Reagent and medicine list

主要试剂	生产厂家
女贞子	天津市同仁堂药材公司
硫酸庆大霉素	广东粤农兽药集团有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	TIANGEN BIOTECH (BEIJING)
Trizol	宝生物工程（大连）有限公司
氯仿	天津市进丰化工有限公司
异丙醇	天津市进丰化工有限公司
PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit	宝生物工程（大连）有限公司
dNTP Mixture	宝生物工程（大连）有限公司
10×PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	宝生物工程（大连）有限公司
TaKaRa Taq™	宝生物工程（大连）有限公司
DL2000 DNA Marker	宝生物工程（大连）有限公司
6×Loading Buffer	宝生物工程（大连）有限公司
Soluton I	宝生物工程（大连）有限公司
BamH I、HindIII、Sal I	宝生物工程（大连）有限公司
T4 DNA 连接酶	宝生物工程（大连）有限公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
pGenesil-1 质粒	长沙赢润生物技术有限公司
QuickShuttle-Basic 转染试剂基础型	北京博奥龙免疫技术有限公司
Rabbit Anti-mouse IgG/HRP	北京博奥森生物技术有限公司
G418	北京索莱宝生物科技有限公司
质粒小提试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
DAB 显色液	北京索莱宝生物科技有限公司

2.1.4 主要仪器设备

表 3 仪器设备
Table 3 Instrument list

烘箱	(山东)青州市迈德森制药机械
粉碎机	(山东)青州市迈德森制药机械
显微镜	北京科泓仪器有限公司
KD-2508 切片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司
电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器厂
离心机 (Neofuge 13R 型)	美国 Heal Force 公司
超净工作台 (SW-CJ-1FD)	苏州净化设备有限公司
电泳仪 (DYY-8C)	北京六一生物有限科技公司
-20℃冰箱 (BCD-205-TA)	青岛海尔股份有限公司
照胶仪 (Gel Doc TM EZ)	Bio-RAD 公司

2.2 试验动物的分组与处理

2.2.1 女贞子对健康断奶仔猪的影响

选择健康杜×长×大断奶仔猪 50 头, 随机分为 5 组, 每组 10 头, 各组间初始体重无显著差异 ($P>0.05$)。根据添加女贞子剂量的不同, 将试验设为对照组, 中药高、中、低组以及抗生素组, 对照组只饲喂基础日粮, 中药高、中、低组在基础日粮中分别添加 0.5%、1%和 2%的女贞子, 抗生素组在日粮中添加硫酸庆大霉素 (1.7mg/kg)。基础日粮中不含有抗生素及其他药物。试验期间, 记录每天每组仔猪的采食量, 于试验开始和结束时对猪进行称重。在试验结束前一天, 于上午 9 点记录完数据后, 全部停水停料 24 h。于第二天上午 9 点开始空腹无菌操作采集颈静脉血, 分别置于抗凝管与促凝管中, 促凝管静置 1 小时, 将血清倒入 1.5mL 离心管, 3500r / min 离心 30min, 分离出的血清在全自动生化分析仪上测定肝肾功能的血清生化指标, 而抗凝管用于血常规分析。而后立即解剖, 分别剪取十二指肠, 空肠和回肠, 用生理盐水冲洗掉肠内容物后, 放入 4%多聚甲醛溶液中固定, 用作组织形态学分析。

2.2.2 女贞子对大肠杆菌感染断奶仔猪的肠道保护作用

利用实验室已有的大肠杆菌 K88 感染仔猪建立腹泻模型, 进一步探索女贞子对大肠杆菌感染断奶仔猪的肠道保护作用。在上述正式试验第 11 天时, 每组随机选出 5 头仔猪灌服大肠杆菌 K88 (1×10^{10} CFU/Kg), 在灌服仔猪 5 天后, 屠宰仔猪。采集仔猪空肠、回肠、十二指肠组织样品, 一部分组织样品立即置液氮中速冻, 转入-80℃冰箱保存, 用于分析蛋白表达; 另一部分组织样品固定在 4%甲醛溶液中, 用于分析女贞子对大肠杆菌感染仔猪肠道绒毛高度和隐窝深度等的影响。

2.3 方法

2.3.1 生长发育指标的观察

根据每天饲喂情况与仔猪体重的变化, 计算断奶仔猪的平均日增重、平均日采食量以及料重比。具体计算方法如下:

日均增重 = (试验猪试验末重-试验猪初重)/试验天数;

日均采食量=猪试验期间采食量/试验天数*试验猪头数;

料肉比=日均采食量/日均增重;

2.3.2 断奶仔猪小肠形态学观察

2.3.2.1 常规石蜡切片制作

- (1) 脱水: 从 Bouin 液中取出固定好的肝脏组织, 修剪成 $5 \times 5 \times 2$ mm 大小的组织块浸泡在 75% 乙醇过夜, 再依次进行 80% 乙醇 2 h \rightarrow 85% 乙醇 2 h \rightarrow 90% 乙醇 1 h \rightarrow 95% 乙醇 1 h \rightarrow 100% 乙醇 I 30min \rightarrow 100% 乙醇 II 30 min;
- (2) 透明: 100% 乙醇: 二甲苯 (1: 1) 30min \rightarrow 二甲苯 5min;
- (3) 透蜡: 1.5h 石蜡 I, 1h 石蜡 II;
- (4) 包埋: 将组织块平整的切面朝下放于蜡盒底部中心处, 加入融化的石蜡进行包埋, 放置冷却成形;
- (5) 切片: 整齐去除组织周围多余的石蜡, 固定于切片台上, 平稳摇动手轮, 切成质地均匀无刀痕厚度为 $4 \sim 5 \mu\text{m}$ 的切片;
- (6) 贴片: 在 45°C 恒温的蒸馏水中, 将组织切片均匀展平, 贴附于载玻片上, 在 50°C 烤箱内放置 30min, 37°C 恒温箱内烘干备用;

2.3.2.2 苏木精-伊红 (H.E) 染色

- (1) 脱蜡: 把已经干燥的切片放入二甲苯中约 10-15min。可以脱蜡 2 次, 各 5-10min;
- (2) 放入 1/2 二甲苯与 1/2 纯酒精的混合液中 3-5min;
- (3) 依次入不同浓度的乙醇复水。无水乙醇 2 min、95% 乙醇 1-2 min、80% 乙醇 1-2 min、70% 乙醇 4 min;
- (4) 入蒸馏水 1-3 min;
- (5) 入苏木精染色 10-15 min;
- (6) 入自来水中使颜色发蓝或流水冲洗 5 min 或更长, 流水不能过大;
- (7) 蒸馏水洗 1 min;
- (8) 入酸性水分化 0.5% 的盐酸酒精 (70% 酒精) 10s;
- (9) 蒸馏水洗 1 min;
- (10) 入碱性水复蓝 3-5 min。核呈蓝色, 其他结构无色;
- (11) 蒸馏水洗 1 min;
- (12) 脱水: 70%、80%、90% 乙醇各 1-2 min;

- (13) 95%的伊红酒精溶液 5-10 min;
- (14) 95%酒精去除多余的颜色, 1 min; 100%乙醇两次, 各 3-5 min;
- (15) 二甲苯乙醇混合液, 纯二甲苯两次各 5-10 min;
- (16) 中性树胶封片;
- (17) 40×10 倍显微镜观察, 采集图像。

2.3.3 断奶仔猪肠道形态学观察

用电子显微镜进行小肠绒毛高度和隐窝深度的测定。用图像分析软件 Image-Pro Plus6.0, 每张切片上选取三个绒毛高度接近的绒毛, 并测量绒毛高度和对应的隐窝深度。绒毛高度是肠壁的凸起, 从肠腺开口至绒毛顶端的垂直高度; 隐窝是肠壁的凹陷, 从粘膜肌层至肠腺开口处的垂直高度。

2.3.4 断奶仔猪肠道 TNF- α 及 IL-1 β 基因表达的测定

2.3.4.1 引物设计

所需检测的 TNF- α 及 IL-1 β 基因引物序列和其扩增后的片段长度见表 4。

表 4 目的基因引物序列和扩增片段长度

Table 4 Primer sequence of target gene and length of amplification product

基因名称	引物类型	引物序列	扩增片段
TNF- α	Forward primer	ACCACGCTCTTCGCCTACTG	169BP
	Reverse primer	GCTGTCCCTCGGCTTTGA	
IL-1 β	Forward primer	CCTTGAAACGTGCAATGCAATGATC	144BP
	Reverse primer	TTCAAGTCCCCTGTGAGGAG	

2.3.4.2 小肠中总 RNA 的提取

根据 TRIZOL 试剂说明书提取组织总 RNA, 具体操作过程如下:

- (1) 从-80℃中取出仔猪小肠, 称取 40mg 放入无核酸酶的 1.5mL 离心管中, 加入 500 μ L RNA 裂解液, 用组织匀浆器在冰面上破碎细胞。
- (2) 组织匀浆后放于 4℃离心机中, 6000rpm 离心 2min, 缓慢吸取上清液 250 μ L。
- (3) 将分离的上层清液移至新的无核酸酶的 1.5mL 离心管中, 加入 Trizol 750 μ L, 混匀震荡 2~3min, 室温静置 5min。
- (4) 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡 1min, 室温静置 5min, 12000rpm 离心 10min。
- (5) 取上清, 加入等体积异丙醇, -20℃的环境下静置 1~2h。
- (6) 取出离心管, 12000rpm 离心 10min, 弃去上清液, 尽量吸干管内残留, 然后加入 600 μ L 75%DEPC 水进行洗涤, 7500rpm 离心 5min, 弃去上清尽量吸干管内残留。
- (7) 加入 RT-PCR 洗脱液 20 μ L, 溶解核酸, 进行反转录。

2.3.4.3 反转录反应

反转录合成 cDNA 参照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行如下操作:

- (1) 取新的 PCR 反应管, 以上述提取的总 RNA 为模板, 配置 10 μ L 反转录体系依次加入以下组分: RNA 8.0 μ L + dNTP Mixture 1.0 μ L + Oligod T Primer 1.0 μ L
- (2) RT 反应程序: 65 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 冰浴 3min。
- (3) 在 PCR 反应管中依次加入如下组分: RNase Free dH₂O 4.5 μ L+5 \times Prime Script Buffer 4.0 μ L + Prime Script RTase 1.0 μ L+RNase Inhibitor 0.5 μ L
- (4) 42 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 15min, 获得 cDNA。

2.3.4.4 qPCR 反应体系

回收细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 及管家基因 β -actin 的目的片段, 对纯化回收片段进行浓度测定, OD260/OD280 值在 1.8-2.0 之间的纯化回收片段可以用于标准曲线的构建。用一下公式计算其拷贝数。计算公式: 质粒拷贝数 (copies/ μ L) = [质粒浓度 (g/ μ L) \times 6.02 \times 10²³(copies/mol)] / [总片段长度 (bp) \times 660g/mol \cdot bp] 将换算出的拷贝数用高压灭菌的三蒸水将纯化回收的目的片段作含有 10⁻²-10⁻⁹copies/ μ L 或 10⁻³-10⁻⁹ copies/ μ L 的 6-8 倍比稀释度, 用该稀释梯度的纯化回收的目的片段作为模板, 每个稀释梯度重复 2 个孔, 进行荧光定量 PCR, 制作荧光定量 PCR 标准曲线。具体操作方法如下:

15 μ L PCR 反应体系:

SYBP®Green Realtime PCR Master Mix	7.5 μ L
25pmol/ μ L 上游引物	0.3 μ L
25pmol/ μ L 下游引物	0.3 μ L
纯化回收目的片段	1.5 μ L
ddH ₂ O	5.4 μ L

反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C ~62 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min 延伸。62 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 过程中全程序读板收集荧光。

2.3.4.5 结果与分析

以仔猪小肠 cDNA 作为模板分别扩增以上 2 种细胞因子, 每个样品重复 2 个孔, 进行 Real-time FQ-PCR。根据标准曲线得出标准方程, 依据标准方程计算出各个差异基因的拷贝数, 通过各个差异基因拷贝数与管家基因拷贝数的比值, 推算出各个基因表达率, 分析对照组与女贞子三组、抗生组间差异基因表达率的差异倍数 (药物组基因表达率/对照组基因表达率)。

2.4 数据统计分析

本试验所有数据用 Excel 数据库记录及初步处理, 然后用 SPSS19.0 分析软件 (IBM Corporation, Armonk, NK, USA) 进行方差分析, 数据结果均以“平均值 \pm 标准差”表示。通过方差分析的方法(ANOVA)分析参数的差异性。差异性显著水平为 $P>0.05$ 或 $P<0.01$ 。

3 结果

3.1 女贞子对仔猪肝肾功能的影响

由表 5 可知, 血清总蛋白、谷丙转氨酶 (ALT)、血清碱性磷酸酶和尿素氮各组处理间差异不显著 ($P>0.05$)。与对照组和抗生素组相比, 不同水平女贞子均可降低血清中尿素氮的含量, 但未达到显著水平 ($P>0.05$)。与对照组相比, 高剂量组的谷草转氨酶 (AST) 有显著降低 ($P<0.05$)。与对照组的 AST/ALT 相比, 高剂量组、低剂量组、抗生素组均有显著降低 ($P<0.05$)。抗生素组的血清肌酐显著高于高、中、低女贞子剂量组和对照组 ($P<0.05$), 并且女贞子高中低剂量组都低于对照组但未达到显著差异水平 ($P>0.05$)。

表 5 女贞子对仔猪血液生化指标的影响

Table 5 Effect of Ligustrum lucidum on blood biochemical parameters in mice

项目	对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	抗生素组
血清总蛋白 g/L	60.08±4.11	61.33±1.23	62.03±5.82	60.43±5.80	61.00±2.49
血清谷丙转氨酶 (ALT) U/L	29.70±9.64	32.67±8.50	27.00±7.50	34.00±4.55	26.50±4.04
血清谷草转氨酶 (AST) U/L	42.00±64.65 ^a	38.67±27.54 ^b	26.00±33.72 ^{ab}	39.00±17.94 ^{ab}	36.00±42.83 ^{ab}
AST/ALT	1.41±6.71	1.18±3.24 ^a	0.96±4.50 ^a	1.15±3.94 ^a	1.36±10.60
血清碱性磷酸酶 U/L	250.33±35.30	237.50±17.68	244.00±21.93	237.75±13.45	254.00±4.24
尿素氮 mmol/L	5.87±3.02	5.84±1.11	5.13±1.45	5.44±1.57	5.46±1.61
血清肌酐 u mol/L	68.50±3.11 ^a	67.67±4.04 ^a	66.33±4.51 ^a	72.00±4.16 ^{ac}	74.50±2.89 ^{bc}

注: 同行中相同字母或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: Values with the same letter superscripts or no letter superscripts in each row mean no significant difference ($P>0.05$), values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

3.2 女贞子对仔猪生长性能和血常规的影响

由表 6 可知, 对照组与各处理组断奶仔猪的初重、平均日增重以及平均日采食量均无显著差异 ($P>0.05$)。与对照组相比, 高剂量组和中剂量组的平均日增重均有升高的趋势 ($P>0.05$), 高、中、低剂量组均有提高平均日采食量的趋势 ($P>0.05$); 高剂量组可以显著提高仔猪的末

体重 ($P<0.05$)，高剂量组、中剂量组与抗生素组相比均有升高的趋势 ($P>0.05$)；与对照组相比，高剂量组和中剂量组均可以显著降低仔猪的料重比 ($P<0.05$)，高剂量组、中剂量组与对照组、抗生素组相比均有降低的趋势 ($P>0.05$)。

表 6 女贞子对仔猪生长性能的影响

Table 6 Effect of Ligustrum lucidum on growth performance of piglets

组别	初重 (kg)	末重 (kg)	平均日增重 (kg)	平均日日采食量 (kg)	料重比
对照组	6.01±0.47	10.76±0.52 ^a	0.39±0.01	0.63±0.01	1.64±0.01 ^a
高剂量组	6.52±1.37	12.21±0.53 ^b	0.44±0.01	0.66±0.01	1.49±0.28 ^b
中剂量组	6.04±0.42	12.24±0.28 ^b	0.45±0.01	0.67±0.01	1.49±0.14 ^b
低剂量组	6.17±0.5	11.84±0.06 ^{ab}	0.41±0.01	0.65±0.04	1.61±0.08 ^{ab}
抗生素组	6.68±0.79	11.81±0.7 ^{ab}	0.42±0.03	0.66±0.01	1.56±0.07 ^{ab}

由表 7 可知，抗生素组的 WBC 含量较低剂量组显著升高 ($P<0.05$)，女贞子高、中、低剂量组较对照组有上升的趋势 ($P>0.05$)；与对照组相比，中剂量组的 RBC 显著升高 ($P<0.05$)，高剂量组、低剂量组与抗生素组均有上升的趋势 ($P>0.05$)；对照组、低剂量组、抗生素组的 MCV 含量较中剂量组有显著上升 ($P<0.05$)，而高剂量组、低剂量组有低于对照组和抗生素的趋势 ($P>0.05$)；对照组、低剂量组、抗生素组的 MCH 含量较中剂量组显著升高 ($P<0.05$)，高剂量组有低于对照组、抗生素组的趋势 ($P>0.05$)；与对照组仔猪全血中 RDW-SD 的含量相比，中剂量组显著降低 ($P<0.05$)，而高剂量组、低剂量组以及抗生素组均有所降低 ($P>0.05$)。与对照组相比，高中低剂量组 HD、HCT、MCHC 的含量均有所升高，但无显著差异 ($P>0.05$)；而高中低剂量组 PDW、MPV、PCT 的含量均有所下降，但无显著差异 ($P>0.05$)。

表 7 女贞子对仔猪血常规的影响

Table 7 Effect of Ligustrum lucidum on blood circulation of piglets

项目	对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	抗生素组
白细胞计数 (WBC)	23.95±5.44 ^{ab}	30.05±7.57 ^{ab}	25.67±2.14 ^{ab}	34.30±0.85 ^a	26.40±3.84 ^b
红细胞计数 (RBC)	5.35±0.49 ^a	6.80±1.41 ^{ab}	6.93±0.49 ^b	6.35±0.21 ^{ab}	6.47±0.47 ^{ab}
血红蛋白(Hb)	104.00±5.67	123.00±21.21	116.67±3.79	122.00±1.41	123.33±17.16
红细胞压积(HCT)	37.00±2.82	43.00±7.07	40.00±2.00	40.50±0.71	42.33±4.04
平均红细胞体积 (MCV)	69.50±2.12 ^a	63.50±3.53 ^{ab}	57.67±2.89 ^b	64.50±3.54 ^a	65.33±3.06 ^a
平均红细胞血红蛋白含量(MCH)	19.50±0.71 ^a	18.50±0.71 ^{ab}	16.67±0.58 ^{ab}	19.50±0.71 ^a	19.00±1.73 ^a
平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)	282.50±3.54	287.50±4.95	292.00±9.64	299.00±1.41	291.33±11.59
血小板分布宽度 (PDW)	15.30±1.41	13.50±0.71	13.65±0.49	13.75±1.91	14.97±1.55
血小板平均体积 (MPV)	11.60±0.57	10.25±0.78	10.45±0.78	11.10±0.85	11.33±0.91
红细胞分布宽度-变异系数(RDW-CV)	24.50±0.85	24.85±1.77	24.27±2.00	25.30±2.55	25.73±2.51
红细胞分布宽度-标准差(RDW-SD)	57.40±0.14 ^a	51.50±1.41 ^{ab}	44.43±4.16 ^b	53.85±9.40 ^{ab}	55.10±6.92 ^{ab}
血小板压积(PCT)	0.71±0.30	0.55±0.71	0.61±0.63	0.50±0.07	0.72±0.27

注：同列肩注不同字母代表差异显著 ($P<0.05$)，相同字母或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

3.3 女贞子对仔猪肠道发育的影响

由表 8 可知,对于十二指肠,与对照组的 VH 相比,高剂量组、中剂量组均显著升高($P<0.05$),而低剂量组无显著差异 ($P>0.05$); 抗生素组与中剂量组相比显著升高 ($P<0.05$), 而与高剂量组无显著差异 ($P>0.05$)。对照组 CD 与各处理组均无显著差异 ($P>0.05$)。中剂量组 VH/CD 值显著高于对照组与抗生素组 ($P<0.05$), 而与高剂量组和低剂量组无显著差异 ($P>0.05$)。

对于空肠,与对照组 VH 相比,高、中、低剂量组和抗生素组均有所升高,但无显著差异 ($P>0.05$); 与对照组 CD 相比,各处理组均无显著差异 ($P>0.05$); 女贞子高、中、低剂量组的 VH/CD 值均高于对照组和抗生素组,但无显著差异 ($P>0.05$)。

对于回肠,与对照组的 VH 相比,高、中、低剂量组显著升高 ($P<0.05$), 且三组均高于抗生素组 ($P>0.05$); 高剂量组和低剂量组的 CD 均低于对照组、低剂量组和抗生素,但无显著差异 ($P>0.05$); 女贞子高、中、低剂量组的 VH/CD 均有高于对照组和抗生素的趋势 ($P>0.05$)。

表 8 女贞子对仔猪小肠肠绒毛高度、隐窝深度及其比值的影响

Table 8 Effect of Ligustrum lucidum on intestinal villus height, crypt depth and ratio of piglets

项目	肠道	对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	抗生素组
	VH(μm)	567.58 \pm 5.06 ^a	597.47 \pm 11.9 ^{bc}	611.07 \pm 16.04 ^b	568.71 \pm 5.47 ^a	581.25 \pm 6.36 ^c
十二指肠	CD(μm)	251.22 \pm 4.24	259.34 \pm 9.2	262.01 \pm 5.4	248.52 \pm 1.87	255.34 \pm 1.87
	VH/CD	2.26 \pm 0.01 ^a	2.31 \pm 0.04 ^{ab}	2.33 \pm 0.01 ^b	2.29 \pm 0.01 ^{ab}	2.28 \pm 0.01 ^a
	VH(μm)	448.03 \pm 5.32	461.77 \pm 24.75	462.1 \pm 10.36	456.48 \pm 14.68	458.12 \pm 4.8
空肠	CD(μm)	197.7 \pm 4.68	186 \pm 5.42	197 \pm 6.75	194.83 \pm 7.66	202.69 \pm 22.7
	VH/CD	2.27 \pm 0.03	2.49 \pm 0.21	2.35 \pm 0.13	2.34 \pm 0.02	2.28 \pm 0.28
	VH(μm)	511.93 \pm 13.81 ^a	544.87 \pm 1.53 ^b	531.22 \pm 12.75 ^b	536.17 \pm 4.82 ^b	524.85 \pm 4.11 ^{ab}
回肠	CD(μm)	219.54 \pm 16.22	216.75 \pm 5.94	211.87 \pm 2.33	220.84 \pm 12.82	220.57 \pm 3.91
	VH/CD	2.34 \pm 0.11	2.52 \pm 0.06	2.51 \pm 0.08	2.44 \pm 0.16	2.38 \pm 0.57

3.4 女贞子对大肠杆菌感染仔猪的肠道保护作用

未攻毒正常组：精神状态良好，运动活跃，呼吸良好，可视粘膜为正常粉红色，粪便呈锥形或圆筒形，采食、饮水积极，没有仔猪死亡。

攻毒腹泻组：精神状态萎靡，运动不活跃，全身打颤，呼吸时有急促，可视粘膜苍白，眼睑有大量分泌物黏连，粪便不成形，拉黑色稀粪，采食不积极，有仔猪死亡。

由表 9 可知，对于十二指肠，与对照组的 VH 相比，高、中、低剂量组、抗生素组均有极显著差异 ($P<0.01$)，且高、中剂量组有高于抗生素的趋势 ($P>0.05$)；与对照组 CD 相比，高、中剂量组均显著降低 ($P<0.05$)；与对照组 VH/CD 值相比，高、中剂量组有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与中剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)，高、中剂量组均高于其它三组的趋势 ($P>0.05$)。

对于空肠，对照组的 VH 与高剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)，且高、中剂量组均有高于低剂量组和抗生素组的趋势 ($P>0.05$)；与对照组的 CD 相比，各处理组无显著差异 ($P>0.05$)；对照组的 VH/CD 值与高剂量组比较有显著差异 ($P<0.05$)，且高、中剂量组有高于低剂量组和抗生素组的趋势 ($P>0.05$)。

对于回肠，对照组的 VH 与高中抗有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与高、抗有极显著差异 ($P<0.01$)，低剂量组与中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)；高、中剂量组的 CD 有低于其

余三组的趋势 ($P>0.05$)；对照组的 VH/CD 值与高、中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)，低剂量组与高、中剂量组有显著差异 ($P<0.05$)。

表 9 女贞子对大肠杆菌感染小肠肠绒毛高度、隐窝深度及其比值的影响

Table 9 Effect of Ligustrum lucidum on the intestinal villus height, crypt depth and its ratio in E. coli infection

项目	肠道	对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组	抗生素组
	VH(μm)	392.34 \pm 7.42 ^A	442.77 \pm 2.39 ^B	439.01 \pm 0.2 ^B	435.81 \pm 1.51 ^B	436.16 \pm 0.89 ^B
十二指肠	CD(μm)	244.55 \pm 4.53 ^a	210.99 \pm 10.33 ^b	207.24 \pm 20.85 ^b	239.06 \pm 10.33 ^{ab}	236.1 \pm 1.61 ^{ab}
	VH/CD	1.61 \pm 0.64 ^A	2.11 \pm 0.09 ^B	2.13 \pm 0.21 ^{Ba}	1.83 \pm 0.09 ^{ABb}	1.85 \pm 0.01 ^{AB}
	VH(μm)	352.42 \pm 5.3 ^a	398.31 \pm 13.37 ^b	384.58 \pm 4.89 ^{ab}	364.07 \pm 11.78 ^{ab}	390.31 \pm 7.48 ^{ab}
空肠	CD(μm)	198.86 \pm 26.9 ^a	193.85 \pm 12.3 ^b	183.45 \pm 13.38 ^{ab}	208.44 \pm 16.63 ^{ab}	198.53 \pm 9.16 ^{ab}
	VH/CD	1.79 \pm 0.24	2.06 \pm 0.07	2.1 \pm 0.15	1.75 \pm 0.09	1.97 \pm 0.09
	VH(μm)	352.42 \pm 5.3 ^A	398.31 \pm 13.37 ^B	384.58 \pm 4.89 ^{BCa}	364.07 \pm 11.78 ^{ACa}	390.31 \pm 7.48 ^B
回肠	CD(μm)	198.86 \pm 26.9	193.85 \pm 12.3	183.45 \pm 13.38	208.44 \pm 16.63	198.53 \pm 9.16
	VH/CD	1.79 \pm 0.24 ^a	2.06 \pm 0.07 ^b	2.1 \pm 0.15 ^b	1.75 \pm 0.09 ^a	1.97 \pm 0.09 ^{ab}

注：同行中相同字母或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

Note: Values with the same letter superscripts or no letter superscripts in each row mean no significant difference ($P>0.05$), values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), values with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.01$). The same as below.

3.5 女贞子对大肠杆菌感染仔猪肠道后基因表达水平的影响

3.5.1 目的基因 TNF- α 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果

根据制备的标准品，进行荧光定量 PCR 扩增，最终获得目的基因 TNF- α 的荧光定量 PCR 标准曲线图和熔解曲线，如图 1 和图 2 所示。标准曲线横坐标显示为拷贝数的对数，纵坐标显示为反应阈值循环数 (cycle quantity, cq)，两者呈线性反应关系 ($R^2=1$)。根据建立的标准曲线方程，表明不同浓度质粒的扩增与 cq 值存在良好的线性关系，可以用于定量分析。

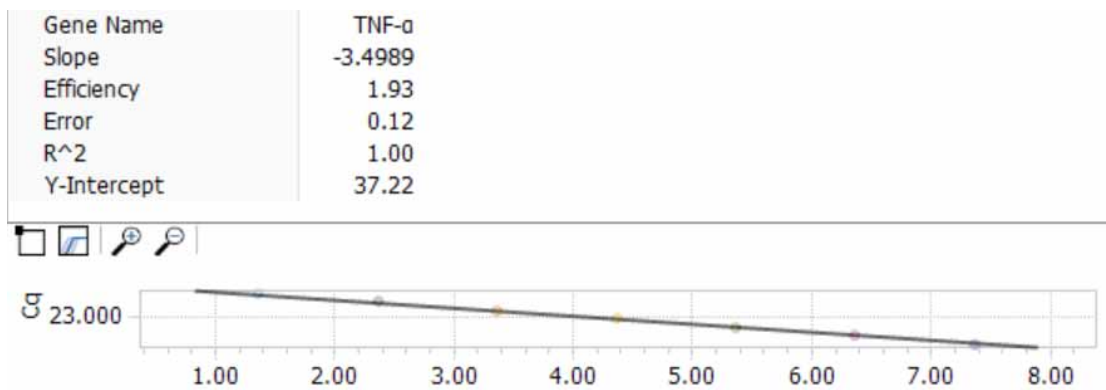


图 1 TNF- α 的荧光定量 PCR 标准曲线图

Fig.1 Standard graph of quantitative real-time PCR for TNF- α

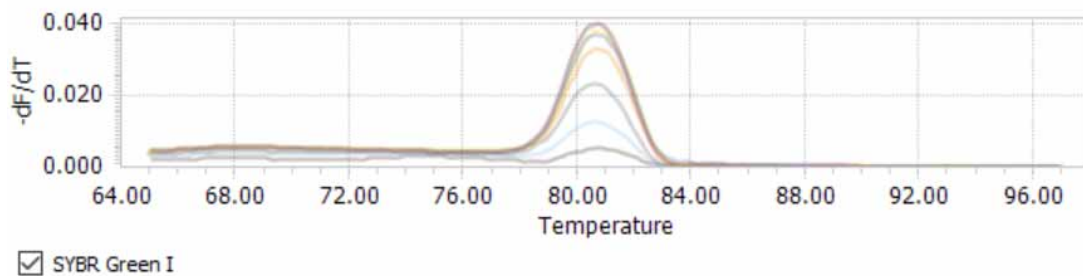


图 2 TNF- α 的荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig.2 Melting curve of quantitative real-time PCR for TNF- α

3.5.2 目的基因 IL-1 β 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果

根据制备的标准品，进行荧光定量 PCR 扩增，最终获得目的基因 IL-1 β 的荧光定量 PCR 标准曲线图和熔解曲线，如图 3 和图 4 所示。标准曲线横坐标显示为拷贝数的对数，纵坐标显示为反应阈值循环数（cycle quantity, cq），两者呈线性反应关系（ $R^2=1$ ）。根据建立的标准曲线方程，表明不同浓度质粒的扩增与 cq 值存在良好的线性关系，可以用于定量分析。

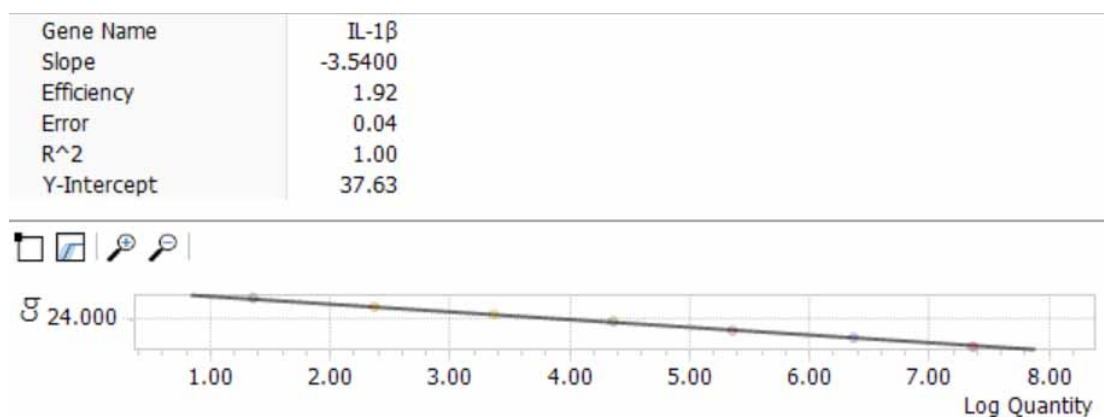


图 3 IL-1 β 的荧光定量 PCR 标准曲线图

Fig.3 Standard graph of quantitative real-time PCR for IL-1 β

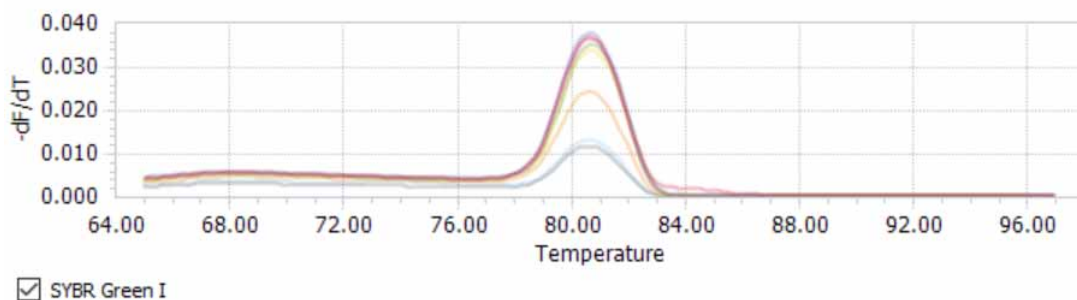


图 4 IL-1 β 的荧光定量 PCR 熔解曲线图
Fig.4 Melting curve of quantitative real-time PCR for IL-1 β

3.5.3 管家基因 β -actin 荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果

根据制备的标准品，进行荧光定量 PCR 扩增，最终获得管家基因 β -actin 的荧光定量 PCR 标准曲线图和熔解曲线，如图 5 和图 6 所示。标准曲线横坐标显示为拷贝数的对数，纵坐标显示为反应阈值循环数 (cycle quantity, cq)，两者呈线性反应关系 ($R^2=1$)。根据建立的标准曲线方程，表明不同浓度质粒的扩增与 cq 值存在良好的线性关系，可以用于定量分析。

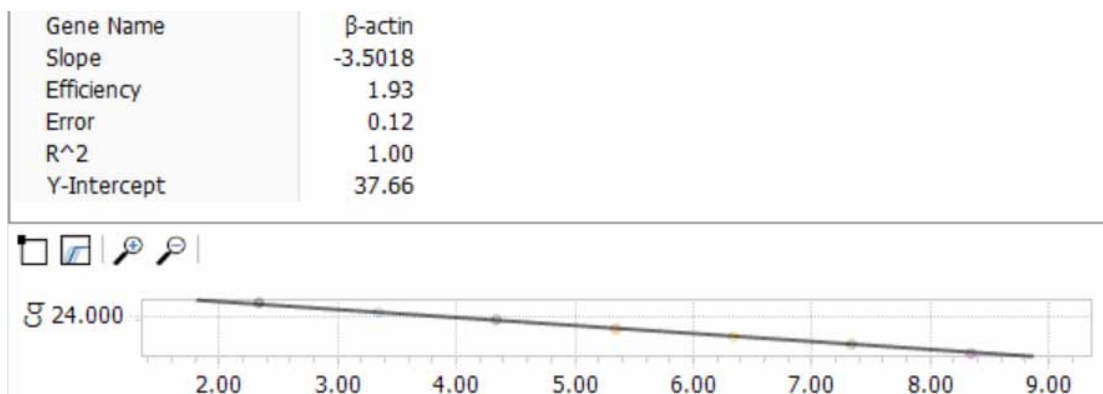


图 5 β -actin 的荧光定量 PCR 标准曲线图
Fig.5 Standard graph of quantitative real-time PCR for β -actin

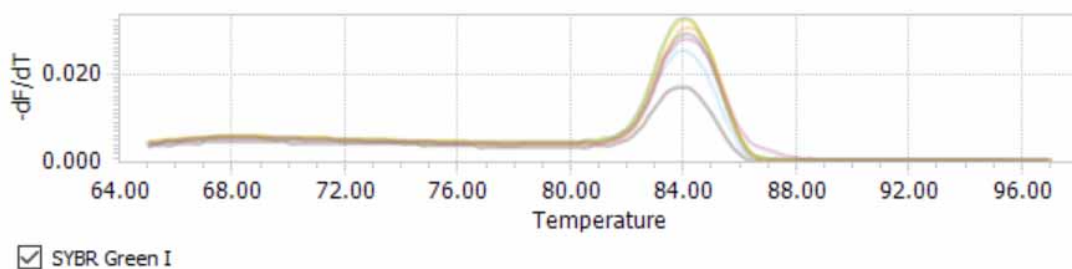


图 6 β -actin 的荧光定量 PCR 熔解曲线图
Fig.6 Melting curve of quantitative real-time PCR for β -actin

表 10 大肠杆菌感染仔猪下小肠中不同细胞因子 Cq 值和拷贝数

Table 10 Cq value and copy number of different cytokines in the lower intestine of piglets infected with E. coli

细胞因子 Cytokines	Cq 值			拷贝系数 (拷贝系数 10^{-5}) Copies(Unit of copies 10^{-5})		
	β -actin	TNF- α	IL-1 β	β -actin	TNF- α	IL-1 β
对照组	13.41	23.71	23.31	2790	27.97	9.07
	15.42	23.88	25.55	3870	17.32	2.77
	12.65	25.43	27.79	172	8.33	0.847
高剂量组	13.17	25.68	28.89	455	8.66	0.551
	15.14	24.26	29.73	879	13.59	0.228
	17.02	25.12	32.24	2272	5.33	0.048
中剂量组	13.25	24.78	29.66	2280	9.21	0.046
	14.82	25.11	30.12	793	13.98	0.288
	15.66	24.90	30.89	407	5.22	0.75
低剂量组	12.71	23.11	27.22	2660	29.77	1.14
	14.12	23.89	28.19	3225	18.05	1.09
	13.22	24.14	27.98	333	7.44	0.55
抗生素组	14.78	23.88	29.29	391	8.44	0.044
	14.92	24.28	29.62	907	20.73	0.289
	15.21	25.73	31.22	2437	27.99	0.419

表 11 仔猪小肠差异基因表达率及表达率差异倍数（表达率单位 10^{-5} ）

Table 11 Differences in differential expression rates and expression rates of piglets in the small intestine (expression rate 10^{-5})

细胞因子 Cytokines		TNF- α	IL-1 β
		1003	325
	对照组	448	71.58
		4843	492
	平均值	2098	296
		1903	121
	高剂量组	1546	11.25
		235	31.86
组别 Groups	平均值	1228	17.19
		404	20.1
	中剂量组	1763	36.32
		1283	184
	平均值	1150	74.2
		2159	42.86
	低剂量组	2286	33.8
		1149	165
	平均值	1864	80.61
		1119	25.94
	抗生素组	560	2.11
		2234	49.72
	平均值	1304	2.02

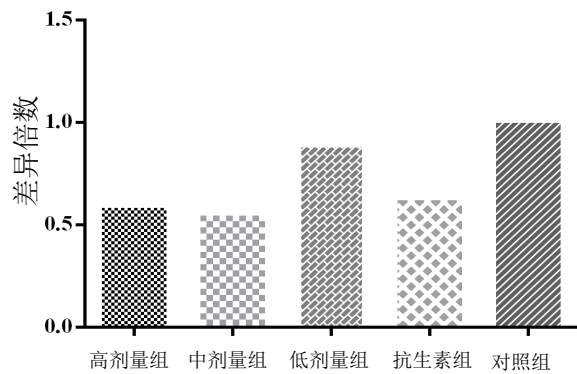


图 7.仔猪小肠中 TNF- α 基因表达的影响

Fig.7 Effect of TNF- α gene expression in small intestine of piglets

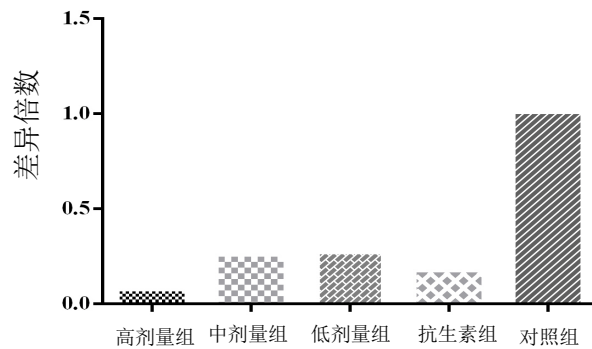


图 8.仔猪小肠中 IL-1 β 基因表达的影响

Fig.8 Effect of TNF- α gene expression in small intestine of piglets

由图 7 和图 8 可知,通过检测 TNF- α 得出高、中剂量组低于抗生素组和对照组。检测 IL-1 β 得出高剂量组低于抗生素组和对照组。说明女贞子在抑制炎症因子方面强于抗生素。

4 讨论

4.1 女贞子对仔猪肝肾功能的影响

表 5 中七项血清生化指标是检测肝肾功能的重要指标。血清总蛋白是血清中各种蛋白质的总和,在一定程度上可以反应肝脏合成和储备功能^[45],其含量过低时会造成肝脏不同程度的损伤。当肝脏受损伤时血清中 ALT、AST、血清碱性磷酸酶会有明显的升高,出现 1%肝细胞损伤时,ALT 的含量会升高 1 倍,所以 ALT 被定为肝损伤最敏感的指标^[46]。血清碱性磷酸酶的活性测定,在国内主要用于肝胆疾病的诊断^[47]。高少毅等人研究中^[48],当肝脏发生炎症、坏死或中毒时可以引起 ALT、AST、血清碱性磷酸酶在血液中的含量不同程度升高。肾脏是动物机体重要的排泄器官,当肾脏出现损伤时,血清中尿素氮和血清肌酐会出现明显的变化,因此在临床把尿素氮和肌酐作为检测肾功能的指标^[48]。韩佳瑞等研究表明,肾脏受损时,血清肌酐和尿素氮在血液中的含量会升高^[49]。

在徐岩的研究中,绵羊饲料中添加 100mg/kg、300mg/kg、500mg/kg 剂量的女贞子提取物后检测其血清生化指标,得出结果不影响绵羊的肝肾功能^[42]。在李建平等入实验中,添加 1%和 1.5%女贞子可显著降低血清中 ALT 的含量,从而提高饲料中蛋白质的利用率^[50]。在杨正标研究中,女贞子的不同提取部位可以改善阴虚大鼠的肾阴虚症状^[51]。王琛等人研究中,女贞子提取物可减少糖尿病肾病大鼠尿蛋白排泄量和改善其肾脏功能^[52]。本研究得出,仔猪日常饮水中添加 2%女贞子,有显著降低 AST 的含量 ($P<0.05$),并且日常饮水中添加不同水平女贞子均能显著降低 AST/ALT 的比值 ($P<0.05$),对肝脏的保护起着积极作用。日常饮水中添加 1%、2%女贞子有提高血清总胆固醇含量的趋势 ($P>0.05$),并且效果优于抗生素。1%、2%女贞子能降低血清肌酐的含量 ($P>0.05$),并且效果优于抗生素 ($P<0.05$)。添加不同水平女贞子后均有降低仔猪血清中尿素氮含量的趋势 ($P>0.05$),能提高仔猪氮的利用率。本实验表明,日常饮水中添加女贞子对仔猪血清生化有显著影响,在保护仔猪肝脏和肾脏正常机能上起着积极作用。

4.2 女贞子对断奶仔猪生产性能和血常规的影响

4.2.1 女贞子对仔猪生长性能的影响

仔猪的免疫系统不健全,母源抗体在仔猪早期免疫力中发挥重要作用,是抵抗外来病原的主要途径,仔猪的自身免疫系统发育较晚,4-5 周龄才发挥作用。断奶后,仔猪丧失母源性保护,免疫力急剧下降,女贞子作为免疫调节剂将发挥重要作用。

将混有女贞子的多种中草药提取物,作为饲料添加剂添加到断奶仔猪日粮中,结果得出中草药可极显著地提高断奶仔猪淋巴细胞的转化率,脾细胞的增加显著地升高了断奶仔猪血清中溶血素和脾定量溶血分光光度值,在一定程度上改善了断奶仔猪的细胞免疫和体液免疫功能^[53]。日粮中添加 0.2%中草药复方添加剂可有效缓解断奶仔猪断奶的抗应激能力,有显著提高断

奶仔猪的平均日增重和降低料肉比^[54]。母猪日粮添加复方女贞子散,从预产期前 30d 开始连喂 30d,最终结果表明:“复方女贞子散”可以提高母猪的活仔数、仔猪成活率和仔猪的初生重与断奶重,仔猪初生重较对照组有极显著提高 24.04% ($P < 0.01$),40 日龄重较对照组极显著提高 18.07% ($P < 0.01$),平均日增重较对照组极显著提高 17.32% ($P < 0.01$)^[54]。仔猪腹泻数试验组较对照组有显著的降低^[29]。试验结果得出,“复方女贞子散”可提高母猪和新生仔猪的自我免疫能力,且有显著改善母猪的繁殖与哺乳仔猪的生产性能。研究中药“复方女贞子散”对断奶仔猪生长性能的影响,结果表明中药“复方女贞子散”可提高仔猪的抗应激能力、降低发病率和增加日采食量,进而提高猪只的生产性能^[55]。日粮中添加女贞子粉和其提取物可以提高断奶仔猪的生产性能及免疫功能,女贞子粉及其提取物均可改善仔猪的生产性能和提高仔猪的免疫能力,且提取物效果略好于女贞子粉^[58]。日粮中添加 1%和 1.5%女贞子可显著的提高仔猪平均日增重 ($P < 0.05$),且日粮中添加不同水平的女贞子都能降低仔猪的腹泻率 ($P < 0.05$),表明日粮中添加女贞子可提高其部分的生产性能^[56]。

本实验得出女贞子能显著提高仔猪的末体重和降低料肉比,并且效果优于抗生素。说明女贞子能提高仔猪的生产性能且效果优于抗生素,有代替抗生素的可行性。

4.2.2 女贞子对仔猪血常规的影响

血液学指标指的是测定血细胞和血浆的数量。白细胞在机体中起着很重要的作用,它能吞噬异物和产生抗体、对机体损伤有治愈的能力、有抵抗病原体入侵的能力和对疾病有很强的免疫抵抗力等^[57-61]。红细胞在机体中有着运输氧气的功能,RDW-SD 在临床上指的是对贫血进行形态学分类^[59]。本实验得出:女贞子有显著提高血液中白细胞的数目,说明女贞子有提高机体免疫力的功能。并且女贞子有显著提高红细胞的数目,提高了机体运输氧的能力,增强了机体的安神效果。机体缺铁性贫血时,RDW 增大,女贞有显著降低 RDW。

4.3 女贞子对仔猪肠道发育的影响

肠道黏膜免疫

肠道是仔猪摄取、消化和吸收营养物质的重要场所,也是机体内最大的黏膜免疫器官^[56]。黏膜层由黏膜上皮、固有层、黏膜肌肉层组成,是肠道发挥免疫作用的关键部位^[56]。肠黏膜的固有层淋巴细胞是黏膜免疫应答的主要场所,包括淋巴细胞、T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、浆细胞、粒细胞、肥大细胞等,在清除外来抗原,保护机体的过程中发挥重要作用^[62]。肠道黏膜分泌的免疫球蛋白一分泌型免疫球蛋白 (SIgA) 是防御病原体在肠道黏膜中粘附和定植的第一道防线^[63, 64],仔猪肠道黏膜免疫中有部分成熟的淋巴细胞进入外周免疫器官的不同部位以后,还能够从淋巴器官离开,进入淋巴液—血液,进行再循环,最终可以携带抗原再次进入到淋巴器官,即淋巴细胞再循环^[64]。从而使不同抗原和携带抗原受体的淋巴细胞接触,而且淋巴细胞各亚群可以与抗原递呈细胞之间可以及时相互作用,这样使得免疫应答顺利地,免疫效应更好地发挥^[65]。肠道局部黏膜免疫在猪抗 PEDV 感染中发挥主导作用。PEDV 感染后,肠道相关淋巴组织的不同位置存在特异性抗体 IgG 和 IgA。

绒毛长度和隐窝深度

猪肠道中,长绒毛高度、隐窝深度是影响猪肠道健康和生长性能的重要指标。肠绒毛能分泌多种消化类的酶,肠绒毛越长动物的消化和吸收能力就越强。隐窝深度决定着肠绒毛上皮细胞有丝分裂的速度和反应细胞生长率,而隐窝变深,表明细胞成熟率下降,分泌功能减缩。因此,小肠消化吸收功能的状况可以用肠绒毛高度与隐窝深度的比值综合分析。比值降低,肠道粘膜有可能受到损伤,且消化能力也会下降,常造成动物机体的腹泻、生长缓慢等现象;比值提高,说明肠道上皮细胞数增多,吸收营养物质的肠道面积增大,从而提高了动物体内营养物质的吸收利用率。有研究表明,饲料中添加不同水平 LLE 有极显著提高断奶仔猪回肠绒毛高度(VH)和显著提高肠绒毛高度与隐窝深度的比值(VH/CD)($P<0.05$, $P<0.01$),0.2%LLE 可显著降低回肠的隐窝深度(CD)($P<0.05$);0.05%和 0.2%LLE 有显著降低十二指肠 CD($P<0.05$),0.05%LLE 显著提高十二指肠 VH/CD($P<0.05$)。LLE 可以降低盲肠内的 pH,维护小肠粘膜的完整性,改善肠道内微生物的平衡,进而提高断奶仔猪的肠道黏膜的免疫功能。且 LLE 可促进断奶仔猪骨髓的造血功能,并能提高断奶仔猪抗应激的能力^[66]。由上述研究可知,在研究肠道健康和生长性能时,对绒毛长度、隐窝深度及二者比例的研究至关重要。在之前的报道中,少有关于不同遗传背景下仔猪绒毛长度/隐窝深度的对比分析,因此,本试验选择通过此指标的差异分析来确定仔猪肠道发育、屏障功能和肠道保护机制。

本实验得出 2%和 1%女贞子能显著提高仔猪十二指肠和回肠的肠绒毛高度及 VH/CD 值。表明饲料中添加女贞子能改善断奶仔猪小肠形态结构,起到对仔猪断奶后小肠损伤修复的效果。

4.4 女贞子对大肠杆菌感染下仔猪肠道发育的影响

女贞子是补益类中草药,其主要有效成分齐墩果酸具有广谱抗菌作用,对大肠杆菌、弗氏痢疾杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌都有抑制作用^[67]。本研实验结果表明,经大肠杆菌感染后可显著降低断奶仔猪的小肠绒毛高度、加深隐窝深度和降低肠绒毛长度与隐窝深度的比值。说明灌服大肠杆菌可引起断奶仔猪严重的腹泻,进一步说明本实验腹泻模型制作成功。女贞子对大肠杆菌感染下仔猪的十二指肠、空肠、回肠较对照组有明显的保护作用,且效果优于抗生素。

4.5 女贞子对大肠杆菌感染仔猪肠道中 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平的影响

IL-1 是一系列炎症反应中最早产生的一种细胞因子,包括 IL-1 α 、IL-1 β ,在免疫应答中起重要作用。炎症性肠病(IBD)病人血清中的 IL-1 β 浓度与炎症的严重程度呈正相关^[68],且会引起肠上皮细胞通透性增加,这种改变可能通过相关蛋白基因的转录和蛋白质的合成而发挥作用^[66]。研究表明,IBD 病人血清 TNF- α 水平异常增高,且伴随肠粘膜通透性的增加,应用 TNF- α 抗体能使这些病人的肠粘膜的通透性降低^[69]。TNF- α 还是 IBD 病人肠黏膜屏障损伤的重要启动因子,能通过激活 NF- κ B,启动基因转录,诱导多种炎症因子如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等的产生,形成级联放大效应,进一步对肠黏膜屏障产生破坏作用^[70]。进一步研究表明,TNF- α 的升高不仅能使 ZO-1 表达量降低,而且还减少紧密连接蛋白 Claudin-1 的磷酸化,并使其从紧密连接上

解聚，促进紧密连接断裂^[71]。由此可见，IL-1 β 和 TNF- α 在调节肠道黏膜免疫功能和改变肠道屏障通透性中均发挥重要作用。

TNF- α 、IL-1 β 在调节肠道黏膜免疫功能中发挥着重要作用。本次试验大肠杆菌感染仔猪 5 天后，通过检测 TNF- α 得出高、中剂量组低于抗生素组和对照组。检测 IL-1 β 得出高、中、低剂量组均低于对照组。说明女贞子在调节肠道黏膜免疫功能和改变肠道屏障通透性。

5 结论

5.1 1%和2%女贞子可以提高仔猪生产性能和改善仔猪肝肾功能，提高仔猪肠绒毛高度、降低隐窝深度，并对肠道黏膜免疫起到积极作用。

5.2 通过对各组断奶仔猪小肠炎症因子的测定，表明饲料中添加1%和2%女贞子可有效降低断奶腹泻仔猪 TNF- α 、IL-1 β ，减少肠道损伤，可通过提高断奶仔猪肠道黏膜的免疫力来达到防治功效。

参考文献

- [1] 金婷, 戈煜, 瞿发林. 女贞子提取工艺的研究[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(03): 249-253.
- [2] 贾博爽, 张瑾. 论纯天然植物饲料添加剂中药中女贞子的应用[J]. 农村实用技术, 2019(05): 58.
- [3] 侯超逸, 段凌瑶, 李芸玲, 等. 女贞子品质的综合评价方法研究[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2018, 46(05): 63-68.
- [4] 刘先芳, 梁敬钰, 孙建博, 等. 女贞子化学成分和药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(01): 1-8.
- [5] 楼招欢. 甘凉归肝肾经女贞子不同提取部位对肾阴虚大鼠模型的影响[A]. 中国中西医结合学会中药专业委员会. 2014年全国中药学术研讨会暨中国中西医结合学会第六届中药专业委员会换届改选会论文集[C]. 中国中西医结合学会中药专业委员会: 中国中西医结合学会, 2014: 4.
- [6] 杨梦丽, 何万领, 李晓丽. 女贞子及其提取物在畜牧生产中的应用研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2017(21): 56-59.
- [7] 邱蓉丽, 李璘. 女贞子多糖的提取工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(4): 612-614.
- [8] 冯静, 冯志毅, 王君明, 等. 女贞子中三萜类化合物研究[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1540-1544.
- [9] 谭文广, 刘伟, 鲁菲菲, 等. 女贞子中三萜化合物的提取与含量测定[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 260-262.
- [10] 王丹, 刘春生, 蓝苑元, 等. 中药女贞子中环烯醚萜总苷提取纯化的工艺研究[J]. 药学服务与研究, 2011, 11(6): 431-433.
- [11] 张雪娇. 女贞子中黄酮类化合物的提取方法比较[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(22): 11187-11188.
- [12] 徐小花, 杨念云, 钱士辉, 等. 女贞子黄酮类化合物的研究[J]. 中药材, 2007, 30(5): 538-540.
- [13] 吕金顺. 甘肃产女贞子挥发油化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 39(3): 178-180.
- [14] 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其有效成分的保肝作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 280-284.
- [15] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884-886.
- [16] 王晓东, 刘永刚, 苏薇薇. 红景天苷对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2004, 27(3): 198-199.
- [17] 单芝丹, 单安山, 李建平, 等. 女贞子粉及其萃取物对肥育猪肉品质和抗氧化性能的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(12): 14-19.
- [18] 王佳丽, 单安山, 刘天阳, 等. 日粮中添加女贞子CO₂超临界萃取物对于猪免疫性能的影响[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(4): 653-657.
- [19] 丁玉琴, 徐持华. 女贞子对D-半乳糖致衰老小鼠学习和记忆的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2006, 24(4): 247-249.
- [20] 张明发, 沈雅琴. 女贞子抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 536-542.

- [21] 戴岳, 杭秉茜, 孟庆玉, 等. 女贞子的抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(7): 47.
- [22] 董静, 吴勃岩, 刘艳秋, 等. 齐墩果酸对H22荷瘤小鼠肿瘤组织中细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015(14):129-131.
- [23] 向敏, 顾振纶, 梁中琴, 等. 女贞子提取物的体内抗肿瘤作用[J]. 药学与临床研究, 2002, 10(1): 13-15.
- [24] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗皮肤癌与白血病药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2012, 9(3): 177-181.
- [25] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗性器官和呼吸系肿瘤作用[J]. 中国性科学, 2011, 20(12): 15-18.
- [26] 张淑芹, 孙非, 刘志屹, 等. 高山红景天甙抑制白血病细胞生长的实验研究[J]. 吉林中医药, 1999(4): 56.
- [27] Hu X L, Zhang X Q, Qiu S F, et al. Salidroside induces cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells.[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,398(1):62-67.
- [28] 刘先芳, 梁敬钰, 孙建博, 黄雪峰. 女贞子化学成分和药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(01):1-8.
- [29] 曹国文, 张邑凡, 陈春林, 等. "复方女贞子散"对繁殖母猪生产性能与哺乳仔猪生长性能的影响[J]. 饲料工业, 2008, 29(10): 4-5.
- [30] 葛铭. 复方女贞子多糖对雏鸡免疫功能影响的研究[A]. 中国畜牧兽医学会中兽医学分会、华东区中兽医研究会. 纪念《元亨疗马集》付梓400周年中国畜牧兽医学会中兽医学分会2008年学术年会华东区第十八次中兽医科研协作与学术研讨会暨兽药发展论坛论文集[C]. 中国畜牧兽医学会中兽医学分会、华东区中兽医研究会:中国畜牧兽医学会, 2008:5.
- [31] 石莉莎, 单安山, 张玮, 等. 女贞子对蛋鸡育成期生长发育和免疫功能的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(10): 79-84.
- [32] 雷红, 祁成年, 郭世宁. 几种中药方剂对鸡血清免疫球蛋白和补体的影响[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(1):33-34.
- [33] 郭晓秋, 曲哲会, 黄立, 等. 女贞子对固始鸡生产性能及免疫指标的影响[J]. 中国家禽, 2015, 37(1):61-63.
- [34] 柏华, 牛竹叶, 高玉鹏, 等. 日粮中添加复方中草药添加剂对产蛋后期蛋用种母鸡繁殖性能和新城疫抗体效价的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(9): 50-52.
- [35] 郭晓秋, 单安山, 赵云, 等. 女贞子水提物对AA肉仔鸡抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(1): 81-85.
- [36] 刘玉芹, 杨彩然, 董淑珍. 女贞子五味子对肉鸡抗氧化功能的影响[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 51-52.
- [37] 陈鹏, 单安山. 女贞子对肉仔鸡生长性能和胴体品质的影响[J]. 中国饲料, 2009(4): 15-17.
- [38] 李杰. 不同类型女贞子对肉鸡生长性能、抗氧化功能与免疫功能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [39] 张晓斌. 富硒女贞子生物学功效初探[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.

- [40] 劳雪芬, 邹慧, 曹铮, 等. 富硒女贞子对山羊外周血淋巴细胞因子及抗氧化活性的影响[J]. 中国兽医学报, 2015, 47(3): 81-84.
- [41] 劳雪芬, 曹铮, 汤里平, 等. 富硒女贞子对山羊生产性能、血液学和血清生化指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(03): 256-259.
- [42] 徐岩. 女贞子提取物对绵羊瘤胃发酵及日粮养分消化影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [43] 丑有财. 复方女贞子和益生菌对犊牛生长性能和免疫功能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [44] 赵小伟, 杨永新, 黄冬维, 赵辉玲, 程广龙. 补饲女贞子对泌乳奶牛生产性能及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(07): 1732-1737.
- [45] 农世泽. 血清胆碱酯酶和白蛋白的检测对肝硬化患者的临床意义[J]. 中国医药指南, 2005, 3(8): 919-920.
- [46] 文静. 原花青素对瘦肉精致小鼠肝肾损伤的影响[D]. 衡南: 南华大学, 2014.
- [47] 郑铁生, 叶立新, 薛锦, 等. 实验大鼠胆汁淤积型肝病血清碱性磷酸酶的测定[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(7): 800-802.
- [48] 高少毅, 唐国强. 医学化验临床意义及数据[M]. 山东大学出版社, 1992.
- [49] 韩佳瑞, 左振魁, 孙新宇. 慢性肾衰竭中医辨证分型与血肌酐、尿素氮的关系[J]. 光明中医, 2010, 25(2): 202-203.
- [50] 李建平, 单安山, 陈志辉, 等. 女贞子对断奶仔猪生长性能和血液生化指标的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(9): 26-30.
- [51] 杨正标, 苏洁, 陈素红, 等. 女贞子不同提取部位对肾阴虚大鼠内分泌系统的影响[J]. 中药药理与临床, 2015(1): 168-170.
- [52] 王琛, 常景芝, 崔月, 等. 女贞子提取物对糖尿病肾病大鼠肾皮质VEGFmRNA过度表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017(4): 1030-1033.
- [53] 蒋宗勇, 朱翠, 王丽, 等. 仔猪肠道黏膜免疫及其营养调控[A]. 中国畜牧兽医学会动物营养分会中国猪营养学术研讨会[C], 2015.
- [54] 马玉芳, 张中桥, 姚金水, 等. 中药饲料添加剂对断奶仔猪免疫功能的影响[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(3): 399-404.
- [55] 张邑帆, 曹国文, 戴荣国, 等. 中药饲料添加剂“复方女贞子散”对断奶猪生长性能的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 2008, 38(1): 12-14.
- [56] 侯磊, 单安山, 李建平, 等. 女贞子粉及其萃取物对断奶仔猪生产性能和免疫功能的影响[J]. 中国饲料, 2011(9): 25-27.
- [57] 夏乐敏. 揭秘白细胞减少症[J]. 家庭医学: 下, 2016(4): 55.
- [58] 金春明. 贫血的形态学分类中传统分类方法与MCV/RDW分类方法的比较[J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 25(3): 18-19.
- [59] 张邑帆, 曹国文, 戴荣国, 等. 中药饲料添加剂“复方女贞子散”对断奶猪生长性能的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 2008, 38(1): 12-14.

- [60] 马玉芳, 张中桥, 姚金水, 等. 中药饲料添加剂对断奶仔猪免疫功能的影响[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(3): 399-404.
- [61] 崔保安, 杨明凡, 张素梅, 等. 有机硒和某些中草药对鸡免疫功能的影响[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(10): 37-38.
- [62] Macpherson A J, Hunziker L, McCoy K, *et al.* IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms.[J]. *Microbes & Infection*, 2001, 3(12): 1021-1035.
- [63] Saini M S, Liberati D M, Diebel L N. Sequential changes in mucosal immunity after hemorrhagic shock[J]. *American Surgeon*, 2001, 67(8): 797-801.
- [64] De Arriba M L, Carvajal A, Pozo J, *et al.* Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2002, 84(1): 1-16.
- [65] 王佳丽, 单安山, 刘天阳, 等. 女贞子CO₂超临界萃取物对断奶仔猪小肠绒毛、盲肠菌群及血常规的影响[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(12): 10-15.
- [66] 周贻谋. 补肝肾明目目的女贞子[J]. 家庭医学, 2005(7): 59.
- [67] Reinecker H C, Steffen M, Doehn C, *et al.* Proinflammatory cytokines in intestinal mucosa[J]. *Immunologic Research*, 1991, 10(3-4): 247-248.
- [68] Alsadi R M, Ma T Y. IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(7): 4641-4649.
- [69] Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, *et al.* Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2002, 97(8): 2000-2004.
- [70] Clark I A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2007, 18(3): 335-343.
- [71] 崔巍, 刘冬妍, 马力, 等. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(16): 1788-1793.

作者简介

个人基本情况:

姓名: 张迪

性别: 男

出生年月: 1991 年 1 月

籍贯: 河北省石家庄市赵县

最后学历: 农学硕士

政治面貌: 共青团员

毕业院校: 河北农业大学

求学经历:

2011. 9-2014. 6 河北农业大学 动物医学院 畜牧兽医专业

2016. 9-2019. 6 河北农业大学 动物医学院 兽医硕士

致谢

该试验的开题准备和论文的撰写都是在我的导师倪耀娣教授和天津市畜牧兽医研究所朱琪老师授悉心指导下完成的。在河北农业大学攻读兽医硕士学位两年期间，倪耀娣教授和天津市畜牧兽医研究所的朱琪老师在学业上对我要求严格，在生活上对我十分关心，使我的试验得以顺利完成。在此谨向倪耀娣教授和朱琪老师表示最崇高的敬意和最真挚的感谢！

试验期间得到了天津市畜牧兽医研究所乔家运老师、李海花老师、朱琪老师、王建国老师和同实验室王柳懿（天津师范大学）、梁东梅（天津师范大学）、邢帅（天津农学院）的帮助下顺利完成我的实验。在此衷心地感谢他们在两年的学习和工作中给予我的悉心指导和大力支持，他们无私的帮助，我将永远铭记在心！

感谢我的舍友郑志强、李阳、唐欣浩，我的师弟王仕宇，同窗好友刘宝京、李艺、陶金良、赵张晗、侯林杉、师乾凯、陈少杰等在我学习和生活上给予的各种支持与帮助，使我感受到了集体的温暖。

在此我还要感谢我的父母，这些年他们付出了心血和汗水使我顺利完成学业，这是无法用言语表达的，我必须铭记于心，将来回报他们。我还要感谢关心我的亲人和朋友们，他们给了我无私的帮助和关心，使我得到了温暖！