

氟苯尼考对肉鸡空肠黏膜的完整性 及免疫相关基因表达的影响

吴海萍, 郭宇荣, 温爽, 申伟祺, 程佳, 孙耀贵, 王文魁, 段智变*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 研究空肠免疫相关指标及绒毛结构的变化在氟苯尼考致肉鸡腹泻中的作用。40羽1日龄肉鸡适应性饲养7d后, 随机分为对照组、氟苯尼考组(饮水添加 $100\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ 氟苯尼考至35日龄), 35日龄检测体重、脾脏与胸腺指数, 取空肠组织以HE染色, 观察组织切片并测量绒毛长度、隐窝深度且计算绒隐比, 荧光定量PCR检测空肠TLR4、MyD88、NF- κ B和TNF- α 基因表达量。结果表明, 与对照组相比, 氟苯尼考组肉鸡空肠绒毛长度、绒隐比极显著下降($P<0.01$), 隐窝深度极显著升高($P<0.01$); 体重、脾脏指数与胸腺指数极显著下降($P<0.01$); TLR4、MyD88、NF- κ B与TNF- α mRNA相对表达量极显著升高($P<0.01$)。空肠绒毛结构功能改变及免疫相关指标异常表达参与了氟苯尼考致肉鸡腹泻的发生发展。

关键词: 肉鸡; 氟苯尼考; 腹泻; TLR4; MyD88; NF- κ B; TNF- α

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2019)03-0410-05

Effects of flufenicol on integrity of jejunum mucosa and expression of immune-associated genes in broilers

WU Haiping, GUO Yurong, WEN Shuang, SHEN Weiqi, CHENG Jia, SUN Yaogui, WANG Wenkui, DUAN Zhibian

(College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: To study the effect of jejunal immune related indexes and villus structure changes in flufenicol-induced diarrhea in broilers. After 7 days of adaptive feeding, a total of 40 1-day-old broilers were randomly divided into control group, flufenicol group (drinking water supplemented with $100\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ flufenicol to 35 days of age). At 35 days of age, the weight, spleen and thymus index were detected, jejunal tissue was stained with HE and then were observed, the length of villus and the depth of crypt were measured and the ratio of villus to crypt was calculated. The relative expression of TLR4, MyD88, NF- κ B and TNF- α in the jejunum were detected by real-time PCR. The results showed that compared with the control group, the flufenicol group's villus length and crypt ratio of jejunum extremely significant decreased ($P<0.01$), the crypt depth of jejunum extremely significant increased ($P<0.01$); the weight, spleen index and thymus index extremely significant decreased ($P<0.01$); the relative expression of TLR4, MyD88, NF- κ B and TNF- α mRNA were extremely significant increased ($P<0.01$). The structural and functional changes of jejunal villi and the abnormal expression of immune-related indexes were involved in the occurrence and development of flufenicol-induced diarrhea in broilers.

Key words: broilers; flufenicol; diarrhea; TLR4; MyD88; NF- κ B; TNF- α

抗生素广泛用于兽医临床, 在控制与治疗畜禽细菌性传染病方面起了卓有成效的作用。在畜牧业和农业中非治疗用途的抗生素称为抗生素生长促进

剂^[1]。饲用抗生素的使用曾被认为是20世纪畜牧业生产中最伟大的生物技术。自1950年美国FDA首次批准抗生素用作饲料添加剂后, 在控制畜禽疾病

收稿日期: 2019-03-18

基金项目: 山西省重点研发计划重点项目(201703D211001-05-02), 山西省科技攻关项目(20140311022-1)和山西农业大学横向科技项目(2103HX28)共同资助。

作者简介: 吴海萍, 硕士研究生。E-mail: 592563580@qq.com

* 通信作者: 段智变, 教授, 博士生导师。E-mail: duanzhibian2008@aliyun.com

感染、促进动物生长、保障畜牧业健康发展中发挥了重要作用^[2]。据 FDA 相关报告, 2012 年用于防病和促生长的抗生素占到动物抗生素总用量 70%^[3]。

氟苯尼考是一种新型广谱兽用抗生素, 具有广泛的抗菌性(能有效的杀灭革兰氏阳性和阴性菌)、耐药性小、无潜在的再生障碍性贫血、毒性低、对环境污染小及吸收性好等特点, 在我国水产养殖业、家畜养殖业广泛使用。氟苯尼考在鸡中正常使用剂量为 40~60 mg·(kg·d)⁻¹, 且在肉鸡养殖业中使用率较高, 呈逐年上升趋势, 目前肉鸡养殖场中氟苯尼考使用率高达 78%^[4]。长期或过量使用氟苯尼考, 会使动物发生免疫抑制^[5]; 促进迷走神经的变形来降低乙酰胆碱的释放, 影响胃排空与肠蠕动功能^[6-7]; 抑制有益菌群的活性或繁殖而导致菌群失调, 造成胃肠道功能紊乱^[8], 进而导致机体消化吸收、呼吸及排泄功能异常, 出现食欲减退以及腹泻等反应^[9]。

肠道是机体最重要的免疫器官, 肠道正常菌群可通过信号转导通路促进肠道中免疫相关因子的合成与分泌来维持肠道的免疫防御功能^[10], 同时, 肠道菌群对机体免疫器官的发育、成熟具有促进作用, 能增强机体的特异性与非特异性免疫功能^[11]。肠道菌群的失调主要临床表现为腹泻^[12], 菌群失调时, 有害菌体及其代谢产物中的内毒素(LPS)、肽聚糖

和胞壁酸等成分与相应的 TLRs 受体结合, 激活 NF-κB 等通路, 导致 IL-6、TNF-α 等促炎因子的大量释放, 对肠黏膜造成不同程度的损伤^[13]。肠黏膜屏障损伤是腹泻发生的直接诱因^[14], 研究表明, 应激小鼠腹泻时肠道绒毛长度与绒隐比显著下降^[15]; 仔猪腹泻时, 肠绒毛长度与绒隐比显著下降, 隐窝深度显著上升, 通过改善绒毛长度、隐窝深度等肠黏膜结构可明显减轻腹泻症状, TLR4、MyD88 和 NF-κB 依赖性途径的激活导致肠黏膜屏障的损伤, 参与断奶后仔猪腹泻的发生发展过程^[16]。

本实验室前期试验结果表明^[17], 小鼠饮水中连续 7 d 添加 100 mg·(kg·d)⁻¹ 氟苯尼考, 可使小鼠空肠拟杆菌门等有害菌数量增加, 乳酸杆菌等有益菌数量减少, 诱发菌群失调; 空肠黏膜受损。本试验在前期研究基础上, 通过检测肉鸡脾脏与胸腺指数, 空肠绒毛长度和隐窝深度, 空肠 TLR4、MyD88、NF-κB、TNF-α 基因表达, 观察机体免疫功能、肠黏膜屏障功能在氟苯尼考致肉鸡腹泻中的变化。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

一日龄 40 羽罗斯肉鸡及三段式饲料(购自山西文水大象禽业有限公司)。

表 1 引物序列
Table 1 Primers Sequence

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primers sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
TLR4	F:AGTCTGAAATTGCTGAGCTCAAAT R:GCGACGTTAAGCCATGGAAG	190	53.3
β-actin	F:ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA R:GGGGTGTGTTGAAGGTCTCAA	223	55.0
MyD88	F:CTGGCATCTTCTGAGTAGT R:TTCCTTATAGTTCTGGCTTCT	76	52.8
NF-κB	F:GTGTGAAGAAACGGGAACGTG R:GGCACGGTTGTCATAGATGG	203	55.5
TNF-α	F:TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT R:GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT	229	58.5

1.2 氟苯尼考水溶液的制备

20%氟苯尼考粉末加水溶解至浓度为 1 g·mL⁻¹ (购自天津市诺维动物药业有限公司)。

1.3 试验动物分组与取材

40 羽一日龄罗斯肉鸡在试验前适应性饲养一周(饲料为基础饲料), 剔除病弱鸡并随机分为对照组(normal group, N)、氟苯尼考组(flornfenicol group, F) (饮水添加 100 mg·(kg·d)⁻¹ 氟苯尼考至 35 日龄^[18-19]), 各组肉鸡数量为 16 只, 雌雄各半。

肉鸡 35 日龄时, 称重, 颈动脉放血处死, 迅速剖取脾脏、胸腺并称重, 测定脏器指数。空肠中段

取两份约 1 cm 大小组织, 一份固定于 bouins 中, 24 h 后换 70%酒精保存。经过脱水、透明、包埋、切片、烘片和常规 HE 染色程序, 在光学显微镜下观察空肠绒毛及隐窝状态, 并选取 5 个绒毛完整, 走向平直视野, 用 Image Pro Plus 6.0 软件从绒毛顶端至隐窝开口处的垂直距离测量绒毛长度(villus length, V), 从隐窝开口至隐窝基部的垂直距离测量隐窝深度(crypt depth, C), 取 5 组数据的平均值, 并计算绒毛长度与隐窝深度的比值(绒隐比, V/C); 另一份迅速放入液氮罐中, 再转入-80℃冰箱中长久保存, 检测各目的基因 mRNA 相对表达量。

1.4 肉鸡空肠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关基因表达量检测

用 NAiso Plus Total RNA 试剂, 经 Trizol 法提取空肠组织总 RNA, 核酸蛋白测定仪 ND-100 测定总 RNA 的浓度, 1%琼脂糖凝胶法检测总 RNA 的完整性。根据 NCBI 中 GeneBank 公布的 Gallus 的 TLR4、MyD88、NF- κ B、TNF- α 及内参 β -actin 的核苷酸序列, 由 TaKaRa 公司设计并合成, 详情见表 1。参照引物说明书, 将其浓度调整为 10 μ M。Real-time PCR 采用 SYBR[®]PremixTM II, 反应体系为 SYBR 12.5 μ L, Primer Forward (10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L, Primer Reverse (10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, cDNA 2 μ L, 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 退火 (温度见表 1), 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s。基因相对表达量结果分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 法。

1.5 数据统计与分析

试验数据以 Mean \pm SD 表达, 应用 SPSS 20.0 (IBM) 和 Origin 2018 软件以及独立样本 T 检验法处理数据。

2 结果与分析

2.1 临床症状及剖检结果

与对照组相比, 氟苯尼考组肉鸡精神不振, 羽毛蓬乱, 两翅下垂, 喜蹲, 采食量减少, 饮水量增加, 肛门周围有黄白色或淡绿色粪便残留, 给药第 7 天出现明显排水稀便症状 (粪便颜色多为黄白色或者淡绿色); 剖检可观察到肠道大部分出现肿大、充血甚至出血, 肠壁变薄, 呈半透明状, 肠内容物稀释, 有的腹腔还可见酸臭样积液。

表 2 氟苯尼考对肉鸡体重、胸腺指数和脾脏指数的影响
Table 2 Effects of florfenicol on weight and thymus index and spleen index of broilers

项目 Item	对照组 N	氟苯尼考组 F
体重 Body weight	1 812.4 \pm 120.6	1 443.0 \pm 157.0 ^A
胸腺指数 Thymus index	4.37 \pm 0.15	3.68 \pm 0.43 ^A
脾脏指数 Spleen index	1.43 \pm 0.12	0.87 \pm 0.17 ^A

注: 与对照组对比, a. $P < 0.05$, 表示差异显著; A. $P < 0.01$, 表示差异极显著。下同。

Note: Compared with group None, a. $P < 0.05$, Indicates significant difference; A. $P < 0.01$, Indicates extremely significant difference. The same as below.

2.2 肉鸡体重、脾脏与胸腺指数及肠道形态学指标

表 2 结果表明, 与对照组比较, 氟苯尼考组肉鸡体重、胸腺指数和脾脏指数均极显著下降 ($P < 0.01$)。

表 3 氟苯尼考对肉鸡空肠绒毛长度、隐窝深度及绒隐比值的影响

Table 3 Effects of florfenicol on the villus length and crypt depth and ratio of villus to crypt in jejunum of broilers

项目 Item	对照组 N	氟苯尼考组 F
绒毛长度/ μ m Villus length	1 427.72 \pm 114.14	1 217.10 \pm 84.58 ^A
隐窝深度/ μ m Crypt depth	185.85 \pm 7.87	211.74 \pm 19.90 ^A
绒隐比 Ratio of villus to crypt	7.69 \pm 0.65	5.79 \pm 0.70 ^A

表 3 结果表明, 与对照组相比, 氟苯尼考组肉鸡空肠绒毛长度和绒隐比均极显著下降 ($P < 0.01$), 隐窝深度极显著上升 ($P < 0.01$)。

2.3 肉鸡空肠病理切片

图 1 表明, 对照组肉鸡空肠黏膜结构完整, 层次分明, 肠绒毛形态规则, 分布均匀, 固有层结构清晰, 其内细胞整齐排列; 与对照组相比较, 氟苯尼考组肉鸡空肠绒毛断裂、肿胀, 形状不规则, 黏膜层结构混乱、增厚, 固有层裸露且有较多炎症细胞浸润, 血管扩张、出血, 肠壁浆膜层局部脱落。

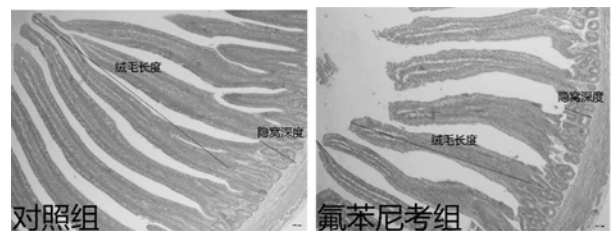
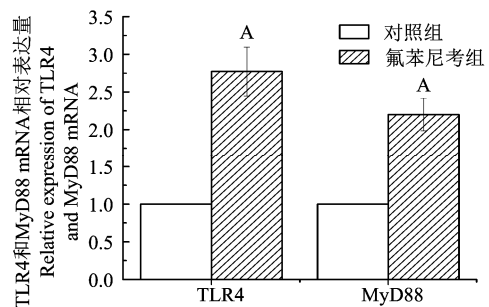


图 1 肉鸡空肠切片 (HE 染色, 100 \times)

Figure 1 Jejunum slices of broilers (HE-trichrome, 100 \times)



Compared with group None, a. $P < 0.05$, indicates significant difference; A. $P < 0.01$, indicates extremely significant difference. The same as below

图 2 氟苯尼考对肉鸡空肠 TLR4 和 MyD88 mRNA 相对表达量的影响

Figure 2 Effect of florfenicol on the relative expression of TLR4 and MyD88 mRNA in jejunum for broilers

2.4 空肠目标基因 mRNA 相对表达量

与对照组对比, a. $P < 0.05$, 表示差异显著; A. $P < 0.01$, 表示差异极显著。下同。

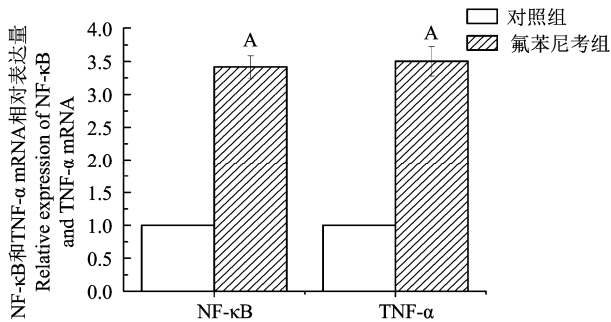


图 3 氟苯尼考对肉鸡空肠 NF-κB 和 TNF-α mRNA 相对表达量的影响

Figure 3 Effect of florfenicol on the relative expression of NF-κB and TNF-α mRNA in jejunum for broilers

图 2 和图 3 结果表明, 与对照组相比较, 氟苯尼考组肉鸡空肠 TLR4、MyD88、NF-κB 与 TNF-α mRNA 相对表达量均极显著升高 ($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

抗生素相关性腹泻 (antibiotic-associated diarrhea, AAD) 是指应用抗生素后导致肠道菌群失调而引起的最常见的病症^[20]。ADD 的发生主要与肠道菌群失调及机体免疫功能障碍相关, 而两者相互影响。研究表明, 肠菌群失调不仅可以降低体液免疫功能, 还可以降低细胞免疫及非特异性免疫功能^[21]; 盐酸林可霉素诱导腹泻的试验发现, 腹泻小鼠肠道菌群失调, 脾脏指数与胸腺指数显著下调, 肠黏膜 sIgA 蛋白含量显著降低, 可导致机体整体免疫功能及肠道局部免疫功能降低, 婴泻颗粒可改善菌群失调, 上调脾脏指数与胸腺指数及 sIgA 蛋白表达量, 提高肠道的免疫功能, 降低腹泻发生率^[22]。脾脏是最大的外周免疫器官, 胸腺是细胞免疫的中枢器官, 脾脏指数和胸腺指数是重要的生物学指标, 反映禽类免疫功能强弱^[23]。研究表明, 高剂量氟苯尼考对肉鸡胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官造成不可逆伤害, 引起肉鸡机体免疫功能下降^[24]。本试验结果表明, 氟苯尼考组肉鸡脾脏与胸腺指数极显著下降, 说明氟苯尼考不合理应用导致腹泻的发生与机体免疫功能失调密切相关。

小肠是生命机体进行消化吸收的重要场所, 完整的小肠黏膜是机体正常摄取营养物质的保障, 绒毛长度、隐窝深度及两者之间的比值 (V/C) 是评估肠黏膜完整性的指标^[25]。肠绒毛长度反映肠黏膜结构的完整性和机体摄取营养物质的能力; 肠隐窝是肠上皮细胞分化发育的核心部位, 合理的隐窝深度是肠黏膜健康的标志; 绒毛比是反映肠黏膜形态结构及功能最直接的指标^[26]。研究表明, 肠黏膜结

构的完整性对于肠道腹泻病症的发生具有重要意义, 绒毛比下降表示肠黏膜受损, 小肠消化吸收功能障碍, 诱发腹泻发生^[27]; 头孢拉定和庆大霉素联合诱导腹泻的小鼠肠绒毛长度、绒毛比显著下降, 隐窝深度显著上升, 当促进肠上皮细胞生成和增加绒毛长度、减少隐窝深度时, 可达到治疗抗生素相关性腹泻的目的^[28]。本试验结果表明, 氟苯尼考组肉鸡空肠黏膜结构紊乱, 肠绒毛局部损伤、脱落, 肠上皮细胞坏死, 绒毛长度、绒毛比显著下降, 隐窝深度显著上升, 说明肉鸡肠黏膜结构的损伤参与了氟苯尼考致肉鸡腹泻发生的过程。

研究表明, 肠道菌群失调与肠黏膜屏障的破坏密切相关^[29], 肠黏膜屏障的损伤是腹泻发生的直接诱因^[14]。正常生理状态下, 肠道中双歧杆菌等革兰氏阳性菌可竞争性地与肠黏膜结合成屏障以阻止病原菌的危害; 当发生菌群失调时, 肠道中致病性肠杆菌等革兰氏阴性菌数量明显增多, 其释放的 LPS 会侵袭肠黏膜, 破坏肠黏膜屏障, 使肠道通透性增加, 引发腹泻^[23,30]。LPS 为革兰氏阴性菌的主要产物, 是 TLR4 的主要配体^[31]。TLR4/MyD88/NF-κB 通路为 TLR4 识别 LPS 的主要途径, 且 MyD88 依赖途径是肠黏膜上皮细胞所固有^[32-33]。肠上皮 TLRs/NF-κB 信号转导通路能防御肠道病原体入侵, 还能维持肠上皮免疫系统稳态及其与肠腔共生菌的平衡^[33]。TNF-α 是一种主要由激活的 NF-κB 诱导产生的促炎因子^[34]。盐酸林可霉素引起大鼠腹泻时, TNF-α 强阳性表达于大鼠小肠, 肠黏膜屏障损伤, 药物治疗后 TNF-α 呈弱阳性表达, 腹泻症状明显减轻^[35]。用头孢类抗生素诱导小鼠菌群失调腹泻的试验发现, 随着抗生素剂量的增大, 小鼠肠道菌群失衡越严重, 肠黏膜受损, 肠黏膜上皮 TLR4 mRNA 相对表达量显著上升, NF-κB 免疫组化结果显示强表达于菌群失调腹泻组^[36]; 用抗生素导致白痢沙门菌感染的研究表明, MyD88 在肉鸡脾脏及盲肠的 mRNA 相对表达量显著上升^[37]; TNF-α、ILs 等细胞因子构成的网络是调控肠道屏障功能的重要元件^[21]。本试验结果表明, 氟苯尼考致腹泻时肉鸡空肠 TLR4、MyD88、NF-κB 和促炎因子 TNF-α mRNA 相对表达量显著上升, 说明肠道免疫功能障碍会造成肠黏膜屏障的损伤, 促进了氟苯尼考致肉鸡腹泻的发生发展过程。

本实验室前期试验结果表明^[17], $100 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 氟苯尼考可引起试验小鼠空肠乳酸杆菌、双歧杆菌等有益菌显著减少; 拟杆菌、Alistipes 等有害菌显著升高; 空肠免疫功能低下, 免疫相关因子黏蛋白

2、3 及防御素 mRNA 相对表达量显著下降；肠黏膜结构 zo-1、claudin-1 及 occludin 基因与蛋白水平均显著下降。结合本试验结果说明 100 mg·(kg·d)⁻¹ 氟苯尼考导致肉鸡腹泻，与机体免疫功能失调、肠黏膜结构损伤、肠屏障损伤密切相关。

参考文献：

- [1] MOHR K I. History of Antibiotics Research[M]//MOHR K I. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2016: 237-272.
- [2] VAN DEN BOGAARD A E, STOBBERINGH E E. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health[J]. *Drugs*, 1999, 58(4): 589-607.
- [3] SPELLBERG B, BARTLETT J G, GILBERT D N. The future of antibiotics and resistance[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(4): 299-302.
- [4] 舒安丽, 于潇萌. 畜禽市场行情及中国肉鸡养殖中抗生素使用情况分析[J]. *中国动物保健*, 2013, 15(6): 20-22.
- [5] GUAN S, LU J, SHEN X, et al. Florfenicol impairs the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice[J]. *Immunopharm Immunot*, 2011, 33(4): 609-613.
- [6] 杨红梅. 药理毒理学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013.
- [7] 梅岩艾, 王建军, 王世强. 生理学原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [8] 张旭. 氟苯尼考抗菌后效应及在鸡体内药物动力学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [9] LI R, WANG H X, SHI Q F, et al. Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181690.
- [10] 徐凯进, 李兰娟. 肠道正常菌群与肠道免疫[J]. *国外医学. 流行病学传染病学分册*, 2005 (3): 17.
- [11] 徐凯进, 李兰娟. 肠道正常菌群与肠道免疫[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2005, 32(3):181-183.
- [12] SILVERMAN M A, KONNIKOVA L, GERBER J S. Impact of antibiotics on necrotizing enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea[J]. *Gastroenterol Clin N*, 2017, 46(1): 61-76.
- [13] PIÉ S, LALLÈS J P, BLAZY F, et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets[J]. *J Nutr*, 2004, 134(3): 641-647.
- [14] 金淑芳. 抗生素相关性腹泻的发病机制及诊治原则[J]. *医学理论与实践*, 2013, 26(23): 3112-3115.
- [15] DONG Y, YANG C, WANG Z, et al. The injury of serotonin on intestinal epithelium cell renewal of weaned diarrhoea mice[J]. *Eur J Histochem*, 2016, 60(4):2689.
- [16] YI H B, ZHANG L, GAN Z S, et al. High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25679..
- [17] 员世宇. 氟苯尼考致脾虚证及复方中药的作用机制[D]. 太谷:山西农业大学, 2018.
- [18] 操继跃, 周洪波, 卢笑丛, 等. 氟苯尼考和中草药黄芪淫羊藿合剂对鸡体液免疫反应的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(4): 412-416.
- [19] 朱买勋, 邱洪, 刘娟, 等. 苜蓿颗粒对氟苯尼考致雏鸡胃肠功能异常的调节影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(19):65-67.
- [20] MCFARLAND L V. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea[J]. *Dig Dis*, 1998, 16(5): 292-307.
- [21] SINGER R S, FINCH R, WEGENER H C, et al. Antibiotic resistance: the interplay between antibiotic use in animals and human beings[J]. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3(1): 47-51.
- [22] 郑卫霞. 婴泻颗粒对抗生素所致菌群失调型腹泻小鼠免疫功能的影响[D]. 郑州:河南中医学院, 2015.
- [23] UPRETI R K, SHRIVASTAVA R, KANNAN A, et al. A comparative study on rat intestinal epithelial cells and resident gut bacteria: (I) effect of hexavalent chromium[J]. *Toxicol Mech Method*, 2005, 15(5): 331-338.
- [24] 李汝春. 氟苯尼考对鸡新城疫体液免疫的影响及其对鸡免疫器官损害的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [25] 聂立欣, 于博. 猪不同肠段肠绒毛与肠腺形态的测量研究[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(6): 28-29.
- [26] 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.
- [27] EDWARD J H. Clinical laboratory evaluation of small intestinal function[J]. *Vet Clin N Am-Small*, 1999, 29(2): 441-469.
- [28] 刘起胜, 徐筱红, 刘怀, 等. 七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠绒毛和隐窝的影响[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2014, 12(23): 154-155.
- [29] KELLY P. Nutrition, intestinal defence and the microbiome[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(2):261-268.
- [30] 李岩. 慢性腹泻与肠道菌群失调[J]. *中国实用内科杂志*, 2003, 23(10): 584-586.
- [31] LEVIN A, SHIBOLET O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease-stepping into uncharted territory[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(33):5149-5153.
- [32] BRANDL K, PLITAS G, SCHNABL B, et al. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1891-1900.
- [33] KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity[J]. *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(3): 124-130.
- [34] SUENAERT P, BULTEEL V, LEMMENS L, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(8): 2000-2004.
- [35] 徐立新. 嗜酸乳杆菌和亚油酸治疗抗生素引起大鼠腹泻的研究[D]. 泸州:泸州医学院, 2011.
- [36] 刘洋. 小鼠肠道菌群失衡模型建立及菌群失衡对肠道 Toll 样受体的影响[D]. 大连:大连医科大学, 2009.
- [37] 李鹏. 鸡白痢沙门氏菌致病性及 MyD88 依赖途径信号分子表达的研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2009.