

日粮中添加桑叶提取物和1-脱氧野尻霉素对大鲵生长、消化、免疫能力和肠道菌群的影响

冯麒凤 李战福 黄先智 李虹 翟旭亮 薛洋 林仕梅 陈拥军 罗莉

EFFECTS OF DIETARY MULBERRY LEAF EXTRACT AND 1-DEOXYNOJIRIMYCIN ON GROWTH, DIGESTION AND IMMUNITY CAPACITY, AND INTESTINAL MICROORGANISM OF CHINESE GIANT SALAMANDER (*ANDRIAS DAVIDIANUS*)

FENG Qi-Feng, LI Zhan-Fu, HUANG Xian-Zhi, LI Hong, ZHAI Xu-Liang, XUE Yang, LIN Shi-Mei, CHEN Yong-Jun, LUO Li

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.116>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究

EFFECTS OF FERMENTED SOYBEAN MEAL ON THE GROWTH AND INTESTINAL HISTOLOGY AND MICROBIOTA OF JUVENILE LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

水生生物学报. 2018, 42(5): 919–928 <https://doi.org/10.7541/2018.113>

饲料中添加谷胱甘肽对黄颡鱼幼鱼组织谷胱甘肽含量、免疫及抗氧化性能的影响

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH GLUTATHIONE ON TISSUE GSH LEVEL, IMMUNITY, AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF JUVENILE YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2018, 42(4): 728–735 <https://doi.org/10.7541/2018.089>

白藜芦醇对高脂胁迫团头鲂抗氧化能力、非特异免疫机能和抗病力的影响

EFFECTS OF RESVERATROL SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, IMMUNITY, ANTIOXIDANT CAPABILITY AND DISEASE RESISTANCE OF BLUNT SNOUT BREAM FED HIGH-FAT DIET

水生生物学报. 2017, 41(1): 155–164 <https://doi.org/10.7541/2017.20>

腐殖酸对沉积物中纳米银的释放及其毒性的影响研究

THE RELEASE OF SEDIMENT-ASSOCIATED SILVER NANOPARTICLES BY HUMIC ACID AND ITS TOXICITY ON ZEBRAFISH

水生生物学报. 2020, 44(5): 1119–1129 <https://doi.org/10.7541/2020.130>

感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响

EFFECTS OF REOVIRUS INFECTION ON THE INTESTINAL MICROBIOTA DIVERSITY OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2019, 43(1): 109–116 <https://doi.org/10.7541/2019.014>

转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究

COMPARISON BETWEEN THE INTESTINAL BACTERIAL COMMUNITIES OF THE TRANSGENIC COMMON CARP AND THE CONTROLS

水生生物学报. 2018, 42(2): 349–355 <https://doi.org/10.7541/2018.044>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.116

日粮中添加桑叶提取物和1-脱氧野尻霉素对大鲵生长、 消化、免疫能力和肠道菌群的影响

冯麒凤¹ 李战福¹ 黄先智² 李虹³ 翟旭亮³ 薛洋³
林仕梅¹ 陈拥军¹ 罗莉¹

(1. 西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715; 3. 重庆市水产技术推广总站, 重庆 401121)

摘要: 为探究桑叶提取物(MLE)和单体1-脱氧野尻霉素(DNJ)对大鲵(*Andrias davidianus*)生长、消化、免疫能力和肠道菌群影响的差异, 研究以基础饲料为对照组, 分别添加0.75%的MLE和0.04‰的DNJ制成3种等氮等脂的饲料, 饲喂初始均重为(47.81±0.23) g的大鲵90d。结果: MLE组和DNJ组增重率和饲料效率显著提高($P<0.05$); 肠道脂肪酶和胰蛋白酶活力显著提高($P<0.05$), 肠道丙二醛、血浆内毒素显著降低($P<0.05$), 肠黏膜绒毛数量显著增加($P<0.05$), 肠黏膜上皮细胞间紧密连接更加紧密; 与对照组相比, MLE组雷帕霉素靶蛋白(Target of rapamycin, TOR)、白细胞介素-10 (Interleukin, IL-10)、多聚免疫球蛋白受体(Polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)、类Toll受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)和髓样分化初级反应基因88 (Myeloid differentiation primary response gene88, MyD88) mRNA表达水平显著上调($P<0.05$), DNJ组pIgR mRNA表达水平显著上调($P<0.05$); 肠道菌群中瘤胃球菌科细菌丰度降低, *Romboutsia*丰度增加, 肠道微生物多样性较对照组提高($P<0.05$)。与DNJ组相比, MLE组和DNJ组增重率和饲料效率无显著差异($P>0.05$), MLE组胃蛋白酶、 H^+-K^+ -ATP酶和 Na^+-K^+ -ATP酶活力显著提高, 肠道总抗氧化能力显著提高($P<0.05$), 肠黏膜上皮细胞紧密连接程度提高, 肠绒毛高度显著增加($P<0.05$), 血浆内毒素含量显著降低。结果表明, 在大鲵配合饲料中添加MLE和DNJ均能不同程度改善大鲵胃和肠的消化吸收功能, 提高生长性能、肠道抗氧化能力和免疫能力, 提高肠道微生物多样性, 促进肠道发育; 综合胃和肠结构和功能, 复合MLE较单体DNJ效果更优。

关键词: 桑叶提取物; 1-脱氧野尻霉素; 抗氧化; 肠黏膜屏障功能; 肠道微生物

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)03-0582-11



大鲵(*Andrias davidianus*), 俗称“娃娃鱼”, 属两栖纲(Amphibia)、有尾目(Caudata)、隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)。因其肉质鲜嫩, 营养丰富, 且具有极高的药用价值^[1], 被誉为“水中人参”, 是我国农业产业化和特色农业重点开发的品种。目前大鲵的人工养殖以饲喂活饵及冰鲜鱼虾为主, 配合饲料使用还不普遍。大鲵在养殖过程中易患胃肠相关疾病, 长期投喂冰鲜鱼虾时疾病问题尤为突出。因此迫切需要绿色和高效的添加剂来增强配合饲料

的功效, 以改善其胃和肠功能, 提高其生长性能, 优化肠道微生态环境, 同时增强其免疫能力和抗应激能力, 减少疾病的发生。

桑叶提取物(Mulberry leaf extract, MLE)是桑叶经水浸提后干燥而得, 富含生物碱、黄酮类和多糖等多种生物活性成分。1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)是MLE中主要活性物质之一, 是一种多羟基哌啶生物碱。目前关于DNJ的研究多集中在药理活性方面, 而关于DNJ作为饲料添

收稿日期: 2020-05-19; 修订日期: 2020-10-16

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CRAS-18); 重庆市生态渔产业技术体系(2016-2021); 重庆市社会民生科技创新专项(cstc2016shmszx80084)资助 [Supported by the National System of Modern Agriculture Industrial Technology, China (CRAS-18); Chongqing Ecological Fishery Technology System, China (2016-2021); Special Project for Scientific and Technological Innovation of Social Livelihood in Chongqing (cstc2016shmszx80084)]

作者简介: 冯麒凤(1995—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: fqf1415158407@163.com

通信作者: 罗莉, 副教授; E-mail: luoli1972@163.com

加剂在水生动物上的研究未见报道。研究表明,MLE和DNJ均具有降糖降脂、抗菌抗氧化和抑制癌细胞生长等作用^[2-6]。研究表明,在蛋鸡^[7]、矮脚黄鸡^[8]和AA肉鸡^[9]的日粮中添加桑叶提取物或桑枝提取物,可以提高养殖动物的采食量和生长性能,在饲料中添加桑叶黄酮^[10,11]和桑叶多糖^[12,13]可提高养殖动物生长性能和机体抗氧化性能及肠道菌群多样性,添加DNJ可以改善小鼠肠道内环境,调节肠道菌群^[14,15]。本课题组先前的研究发现,添加适宜的MLE可提高中国大鲵的生长性能、抗氧化能力、消化吸收功能和免疫功能^[16]。至于MLE与DNJ作为饲料添加剂对养殖动物胃、肠结构和功能有无不同影响的研究尚未见相关报道。

基于此,本实验以中国大鲵为研究对象,比较研究MLE和DNJ对大鲵生长、消化、免疫功能及肠道菌群的影响,评价二者作用效果的异同,并初步揭示其作用机制,为科学应用该绿色饲料添加剂,生产优质、高效和安全的大鲵配合饲料提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

饲料原料均购于重庆市大发饲料有限公司,MLE由家蚕基因组生物学国家重点实验室提供,DNJ(HPLC≥98%)购于北京世纪奥科生物技术有限公司。

以大鲵基础饲料为对照组,分别添加0.75%的MLE和0.04‰的DNJ为MLE组和DNJ组,用膨润土调平,配制3种等氮等脂的实验饲料,实验饲料配方及主要营养水平见表1。其中,MLE和DNJ的添加剂量设置依据为根据前期大鲵配合饲料中MLE添加量的研究,设置本实验MLE添加量为0.75%,同时根据本批次桑叶提取物中DNJ的含量,换算该MLE添加量下饲料中DNJ添加量为0.04‰。饲料原料过60目筛,混合制粒机制成直径3 mm的硬颗粒饲料,风干后-20℃保存。

1.2 实验鲵饲养与管理

实验大鲵购于陕西省汉中市绿源大鲵养殖场,大鲵饥饿5d后以对照组饲料驯养15d。选择72尾规格均匀、体质健壮的大鲵[初始体质量(47.81±0.23)g],随机置于9个70 cm×45 cm×17.5 cm的塑料方形箱中,每箱8尾大鲵,分为3组,每组3个重复。

每天17:00饱食投喂,投喂2d停食1d。水深3—5 cm,每天早晚用曝气自来水100%换水,正式实验90d。饲养期间避光,水温19—23℃,溶解氧>6.0 mg/L,氨氮含量<0.10 mg/L,亚硝酸盐含量<0.10 mg/L, pH 6.5—7.0。

表1 实验饲料配方及主要营养成分(风干基础)

Tab. 1 Formulation and nutrient composition of diets (air-dry basis)

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE组	DNJ组
鱼粉Fish meal (%)	15	15	15
肉粉Meat meal (%)	3	3	3
酪蛋白Casein (%)	6	6	6
明胶Gelatin (%)	6	6	6
复合蛋白粉 ¹⁾ Compound protein powder (%)	17	17	17
面粉Wheat flour (%)	28	28	28
α-预糊化淀粉α-pregelatinized starch (%)	11	11	11
大豆油Soybean oil (%)	4.8	4.8	4.8
预混料Premix ²⁾ (%)	7.7	7.7	7.7
桑叶提取物MLE (%)	0	0.75	0
1-脱氧野尻霉素DNJ(‰)	0	0	0.04
膨润土Bentonite (%)	1.5	0.75	1.5
合计Total (%)	100	100	100
营养组成(干基实测)Nutrient composition (measured dry basis, %)			
粗蛋白Crude protein	55.36	55.60	55.41
粗脂肪Crude lipid	8.70	8.81	8.73
粗灰分Crude ash	10.30	10.15	10.12
粗纤维Crude fiber	0.91	0.95	0.92

注: ¹⁾复合蛋白粉成分保密; ²⁾预混料含多维、多矿、功能性添加剂和载体,多维、多矿的组成参照肉食性鱼类

Note: ¹⁾The ingredients of compound protein powder are confidential; ²⁾Premix contains multi-vitamins, complex mineral, functional additives and carrier, multi-vitamin and complex mineral refer to carnivorous fishes

1.3 样品采集

因大鲵消化食物时间较长,在养殖结束后,停食72h。MS-222麻醉,分别计数、称重。每个重复取3尾大鲵,冰盘中解剖,分离胃和肠道,取前肠分别于多聚甲醛和戊二醛固定液中固定,用于石蜡切片和扫描电镜的制备;胃及其余肠道组织液氮速冻后-80℃中保存。另外,每重复取3尾实验鲵,MS-222麻醉后于无菌操作台上分离肠道并收集肠道内容物,液氮速冻后-80℃保存,用于肠道微生物多样性分析;取前肠于1.5 mL无酶管后液氮速冻,-80℃保存,用于肠道免疫相关基因表达量测定。

1.4 生长指标测定

生长指标测定:采用以下公式计算生长性能和生物学性状:摄食量(Feed intake, FI, g)=ΣF₀-ΣF_i; 增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(W_t-W₀)/W₀×100; 平均日增重(ADG, g/d)=(W_t-W₀)/t; 饲料效率(Feed Efficiency, FE, %)=(W_t-W₀)/F×100。式中, W₀为起始鲵尾均重(g); W_t为终末鲵尾均重(g); F₀为每次投

喂量(g); F_t 为每次残饵量(g); F 为尾均摄食量(g); t 为饲喂天数。

1.5 肠道组织结构与消化酶指标测定

前肠石蜡组织切片制样:多聚甲醛固定后,乙醇脱水,置于二甲苯中透明,用低熔点的石蜡包埋成蜡块,用Leica UC7 RT切片机连续切片,厚度为4 μ m,展片后HE染色,中性树胶封片。

前肠扫描电镜制样:经戊二醛固定后,蒸馏水漂洗样品,乙醇脱水,环氧丙烷处理2次,临界点干燥,EIKO离子溅射仪镀膜,处理好的样品在JSM-6380LV型扫描电镜中观察并拍照。

消化酶指标的测定:胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、 H^+-K^+-ATP 酶和 Na^+-K^+-ATP 酶活力采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定,碳酸酐酶(CA)采用上海优选Elisa试剂盒测定。

肠黏膜屏障指标测定:内毒素和D-乳酸指标采用上海优选Elisa试剂盒测定。

1.6 肠道抗氧化指标测定

肠道总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

1.7 Illumina-HiSeq宏基因组测序

采用DNA提取试剂盒(TaKaRa)提取肠道细菌总DNA后进行16S rDNA(V3+V4)区扩增特异区域,细菌16S rDNA(V3+V4)区域引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCGAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。扩增好的DNA序列,经1.8%琼脂糖(TaKaRa, 100 bp)电泳检测阳性后,委托百迈客生物科技有限公司用Illumina HiSeq高通量测序技术进行序列测定和分析。

1.8 总RNA的提取与免疫相关基因表达量测定

按照RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa)的方法提取肝脏组织总RNA,用1.2%琼脂糖凝胶Agarose Regular (TaKaRa)电泳检测RNA完整性,并用核酸测定仪(Thermo Fisher)测定RNA的纯度和浓度。采用Premix ScriptTM RT Master Mix反转录试剂盒(TaKaRa)得到cDNA,于-20℃保存备用。根据本课题组大鲵肠道转录组测序(RNA Seq)结果,设计特异性引物(表2),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用ABI7500型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, 美国)进行RT-PCR。反应体系:总体积20 μ L, 2 μ L cDNA模板, 10 μ L SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa), 上、下游引物各0.5 μ L, 7 μ L ddH₂O。RT-PCR反应条件:95℃预变性60s, 95℃变性5s, 60℃退火30s, 共40个循环,每个样品3个重复,以EF-1 α 作为内参,分别测定肠道组织IL-8、IL-10、TOR、pIgR、TLR2、

表2 免疫相关基因及内参基因引物序列

Tab. 2 Primers used for quantitative real-time PCR

基因 Gene	引物序列Sequences (5'—3')	长度 Length (bp)
EF-1 α	GGACAGACCCGTGAACATGC CTTCCTTAGTGATCTCCTCGTAGC	130
IL-8	TGCAGACAGACGCACTTCAA CACAGCCATCAGTCACCCTT	112
IL-10	GCCGCGTGCATCTATTTTGG CAGCAACCTGGAGAACCCTCA	104
TOR	CGTTTACCTCGAAGTCCAC ATCTCCTGCCCTCCAGTGAC	109
pIgR	CGCTTGGAGTCACTGAACCT AGCCTCCTCCAAAGCATCAC	102
TLR2	TGGACAATGTCAACCCCTGTG TCATCCGCTGAAGAAACCCC	150
MyD88	TCCCTGCCATTTCTTGGGAC CTCACCAGCCTGAAACCGAA	130
IRAK4	TTCTGGGTCACTGTCTTGCG ATCAAAGGAGGCATCTGGGC	112

注:EF-1 α . 延伸因子-1 α elongation factor-1 α ; IL-8. 白细胞介素-8 interleukin-8; IL-10. 白细胞介素-10 interleukin-10; TOR. 雷帕霉素靶蛋白target of rapamycin; TLR2. 类Toll受体2 toll-like receptor 2; IRAK4. 白细胞介素-1受体相关激酶4 interleukin-1 receptor-associated kinase 4; MyD88. 髓样分化初级反应基因88 myeloid differentiation primary response gene 88; pIgR. 多聚免疫球蛋白受体polymeric immunoglobulin receptor

MyD88和IRAK4相对表达量,结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.9 数据处理

采用SPSS 22.0进行方差齐性检验和单因素方差分析(One-way ANOVA)。用Duncan氏多重比较分析组间差异显著性程度,显著水平为($P<0.05$)。数据用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)形式表示。

2 结果

2.1 生长性能及饲料利用指标

由表3可知,MLE和DNJ组的FBW、WGR、ADG及FE均显著高于对照组($P<0.05$),而MLE和DNJ组间无显著差异($P>0.05$)。其中,MLE和DNJ组的WGR分别较对照组提高了39%和46%,FE提高了20%和27%。此外,MLE组的FI显著高于对照组($P>0.05$)。

表3 MLE和DNJ对大鲵生长性能及饲料效率的影响

Tab. 3 Effects of MLE and DNJ on growth performance and feed utilization of *Andrias davidianus*

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE组	DNJ组
终末鲵尾均重FBW (g)	76.92 $\pm$ 4.31 ^a	88.13 $\pm$ 1.82 ^b	90.15 $\pm$ 3.11 ^b
增重率WGR (%)	60.8 $\pm$ 9.3 ^a	84.5 $\pm$ 2.9 ^b	88.5 $\pm$ 6.1 ^b
平均日增重ADG (g/d)	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	0.45 $\pm$ 0.02 ^b	0.47 $\pm$ 0.04 ^b
摄食量FI (g)	119.73 $\pm$ 11.36 ^a	138.79 $\pm$ 3.57 ^b	137.29 $\pm$ 10.36 ^{ab}
饲料效率FE (%)	145.3 $\pm$ 8.3 ^a	174.5 $\pm$ 7.2 ^b	185.1 $\pm$ 6.1 ^b

2.2 胃的消化、泌酸能力指标

由表 4 可知, MLE 组和 DNJ 组 CA 酶活性均显著高于对照组 ($P<0.05$), 而 MLE 组与 DNJ 组差异不显著 ($P>0.05$)。MLE 组胃蛋白酶和 H^+-K^+-ATP 酶活性均显著高于对照组和 DNJ 组 ($P<0.05$), 而 DNJ 组与对照组差异不显著 ($P>0.05$), MLE 组胃蛋白酶和 H^+-K^+-ATP 酶活性分别较 DNJ 组提高了 45% 和 9%。

2.3 肠道消化、吸收能力指标

由表 5 可知, 与对照组相比, MLE 组和 DNJ 组胰蛋白酶和脂肪酶活力均显著提高 ($P<0.05$), 淀粉酶活力显著降低 ($P<0.05$)。其中, MLE 组和 DNJ 组胰蛋白酶活力较对照组分别升高了 69% 和 59%, 脂肪酶较对照组分别升高了 16% 和 13%。MLE 组胰蛋白酶和 Na^+-K^+-ATP 酶活力均显著高于 DNJ 组 ($P<0.05$), 其中, Na^+-K^+-ATP 酶活性较 DNJ 组提高了 14%。MLE 组和 DNJ 组的脂肪酶和淀粉酶活力无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.4 肠黏膜通透性指标

由表 6 可知, 与对照组相比, MLE 和 DNJ 组血浆内毒素含量显著降低, 其中, MLE 组显著低于 DNJ 组 ($P<0.05$)。MLE 组 D-乳酸含量显著低于对照组 ($P<0.05$)。

表 4 MLE 和 DNJ 对大鲵胃功能的影响

Tab. 4 Effects of MLE and DNJ on gastric function of *Andrias davidianus* (U/mg)

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE 组	DNJ 组
胃蛋白酶Pepsin	14.6±0.6 ^a	23.0±1.9 ^b	15.9±0.4 ^a
$H^+-K^+-ATPase$	4.14±0.14 ^a	4.65±0.12 ^b	4.25±0.15 ^a
碳酸酐酶CA	191±9 ^a	212±12 ^b	208±8 ^b

表 5 MLE 和 DNJ 对大鲵肠道消化吸收功能的影响

Tab. 5 Effects of MLE and DNJ on intestinal digestion and absorption function of *Andrias davidianus* (U/mg)

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE 组	DNJ 组
胰蛋白酶Trypsin	155±5 ^a	263±6 ^c	247±9 ^b
脂肪酶Lipase	742±48 ^a	858±35 ^b	835±48 ^b
淀粉酶Amylase	0.212±0.008 ^b	0.168±0.007 ^a	0.159±0.007 ^a
$Na^+-K^+-ATPase$	3.16±0.13 ^a	3.59±0.09 ^b	3.14±0.12 ^a

表 6 MLE 和 DNJ 对大鲵肠黏膜通透性影响的比较

Tab. 6 Effects of MLE and DNJ on intestinal permeability of *Andrias davidianus*

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE 组	DNJ 组
内毒素ET (EU/mL)	64.3±1.6 ^c	51.7±2.6 ^a	61.9±1.9 ^b
D-乳酸D-LA (μmol/L)	241±14 ^b	183±16 ^a	209±23 ^{ab}

DNJ 组 D-乳酸含量与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。

2.5 肠道形态结构及肠黏膜上皮细胞紧密连接结构观察

由图 1 和表 7 可知, 与对照组相比, MLE 组和 DNJ 组肠道绒毛数量分别增加了 16% 和 12% ($P<0.05$)。MLE 组绒毛高度显著高于对照组和 DNJ 组 ($P<0.05$)。MLE 组和 DNJ 组的肠道空腔率分别较对



图 1 MLE 与 DNJ 对大鲵前肠形态结构的影响 (HE 染色, 40×)

Fig. 1 Effects of MLE and DNJ on intestinal morphology and structure of *Andrias davidianus*

a. 对照组; b. MLE 组; c. DNJ 组

a. control group; b. MLE group; c. DNJ group

表 7 MLE 与 DNJ 对大鲵肠道形态结构的影响

Tab. 7 Effects of MLE and DNJ on intestinal morphology and structure of *Andrias davidianus*

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE 组	DNJ 组
绒毛数量 Villus number	12.1±0.9 ^a	14.0±1.3 ^b	13.5±0.5 ^b
绒毛高度 Villus height (μm)	350.3±70.2 ^a	470.3±52.4 ^b	319.7±27.4 ^a
空腔率* Cavity rate (%)	22.4±3.2 ^c	16.3±2.8 ^a	19.8±3.6 ^b

注: *空腔率(%)=肠道横切空腔面积/肠道横切面积×100
Note: *Cavity rate(%)= $S_{cavity\ of\ intestine}/S_{intestine} \times 100$

照组降低27%和12% ($P<0.05$), MLE组空腔率显著低于DNJ组。

通过图2扫描电镜结果的观察, MLE组和DNJ组上皮细胞间紧密程度高于对照组, 且相比之下, MLE组上皮细胞间的连接更加紧密。

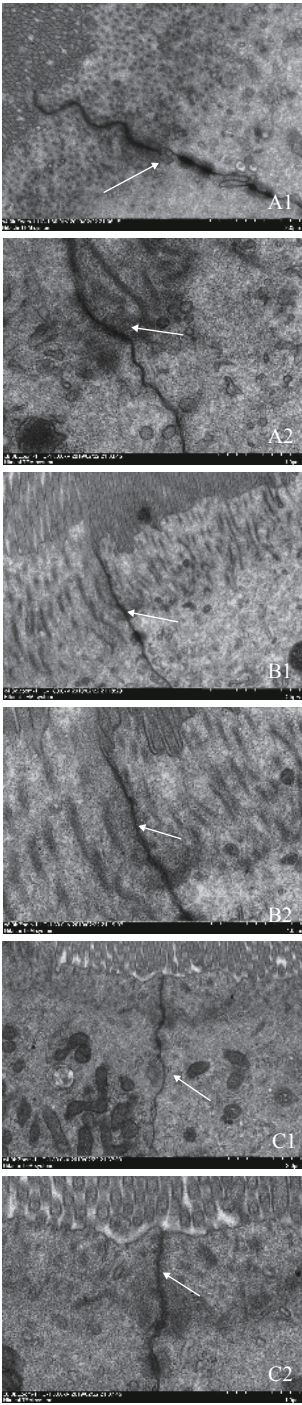


图2 MLE与DNJ对大鲵肠黏膜细胞紧密连接结构的影响
Fig. 2 Effects of MLE and DNJ on tight junctions in intestinal mucosa of *Andrias davidianus*
A1. 对照组(4000 $\times$); B1. MLE组(4000 $\times$); C1. DNJ组(4000 $\times$);
A2. 对照组(8000 $\times$); B2. MLE组(8000 $\times$); C2. DNJ组(8000 $\times$)

2.6 肠道抗氧化能力指标

由表8可知, MLE组肠道总抗氧化能力(T-AOC)显著高于对照组和DNJ组 ($P<0.05$)。MLE组和DNJ组肠道MDA含量显著低于对照组 ($P<0.05$), 分别较对照组降低了28%和16%, MLE组和DNJ组的T-AOC和MDA含量无显著差异 ($P>0.05$)。

表8 MLE与DNJ对大鲵肠道抗氧化能力的影响

Tab. 8 Effects of MLE and DNJ on intestinal antioxidant of *Andrias davidianus*

项目Item	组别Group		
	对照组Control	MLE组	DNJ组
总抗氧化能力T-AOC (U/mg)	4.28 $\pm$ 0.09 ^a	4.72 $\pm$ 0.09 ^b	4.45 $\pm$ 0.11 ^a
总超氧化物歧化酶T-SOD (U/mg)	48.6 $\pm$ 1.2	52.9 $\pm$ 1.5	50.6 $\pm$ 2.8
丙二醛MDA (nmol/mg)	2.76 $\pm$ 0.09 ^b	2.15 $\pm$ 0.10 ^a	2.38 $\pm$ 0.20 ^a

2.7 肠道免疫基因相对表达量

由图3可知, MLE和DNJ的添加对大鲵肠道免疫相关基因表达量有不同程度的影响。相较对照组, MLE组TOR、IL-10、pIgR、TLR2、MyD88和IRAK4表达量显著提高 ($P<0.05$), DNJ组pIgR和MyD88表达量显著提高 ($P<0.05$)。

MLE组TOR、IL-10和pIgR表达量较DNJ组显著提高 ($P<0.05$), 其他基因表达量与DNJ组无显著差异 ($P>0.05$)。

2.8 肠道菌群结构分析

运用usearch进行聚类划分共获得255个OTUs (图4a), 其中有180个OTUs是3个组共有的, 占三者的70.59%; MLE与DNJ共有OTUs占两者总数的93%, CTR与MLE、DNJ共有OTUs分别占两者总数的73%和75%。通过图4b发现, MLE组与DNJ组聚为一枝, 而CTR组独立一枝。在门和属水平上进行物种丰度分析, 共有14个门163个属的细菌被发现, 3个处理组的最具优势菌门均为厚壁菌门(Firmicutes), MLE和DNJ组厚壁菌门丰度较对照组下降, MLE组变形菌门(Proteobacteria)丰度高于CTR及DNJ组 (图4c)。在属水平上, MLE组和DNJ组均以 *Romboutsia* 为优势菌属, 而对照组以 *Runimococcaceae* 为优势菌属 (图4d)。

测试结果覆盖率均在99.9%以上, MLE组和DNJ组Chao1和Ace指数要比CTR组高, MLE组的香农指数最高, 辛普森指数最低 (表9)。

3 讨论

3.1 MLE和DNJ对大鲵生长性能影响的比较

本实验结果显示, 添加MLE和DNJ均提高了大

鲢的生长性能和饲料效率。宋琼莉等^[8]在矮脚黄鸡饲料中分别添加0.2%、0.5%和0.8%的MLE,发现实验组的日增重和平均日采食量均比对照组显著增高;范京辉等^[9]在AA肉鸡上添加0.3%的MLE,肉鸡生长速度和日粮表观消化率均提高^[17];李婉涛等^[18]在日粮中添加0.3%的杜仲和MLE,发现育肥猪的平均日增重和饲料报酬显著提高;此外,本课题组先前的研究已经证明添加适宜含量的MLE可以提高大鲢的生长性能以及饲料利用率^[16],与本研究结果相似。而关于DNJ对动物生长性能影响的研究未见报道。桑叶提取物富含多种天然活性成分,其中,桑叶黄酮^[19]和多糖^[12]等已被证明可以提高养殖动物生长性能,这些单体活性成分可能在大鲢体内发挥了协同效应共同起到了促生长作用。另外,MLE组和DNJ组大鲢摄食量提高是其生长性能提高的可能原因之一,关于MLE提高养殖动物摄食量在大鲢^[16]和矮脚黄鸡^[8]等的研究中得到了证实。

3.2 MLE和DNJ对大鲢胃和肠道消化、吸收能力影响的比较

动物获取营养物质主要是通过胃、肠的消化与吸收作用实现的。在胃酸和胃蛋白酶的作用下,实现对饲料蛋白的初步消化。盐酸的分泌是在 H^+-K^+-ATP 酶(又称为胃质子泵或酸泵)和碳酸酐酶

(CA)的共同作用下完成的,这2种酶是反映胃泌酸能力的指标^[20, 21]。关于MLE和DNJ对胃消化酶的影响尚未见报道。在本研究中,添加MLE提高了胃CA酶、蛋白酶和 H^+-K^+-ATP 酶活力,添加DNJ提高了胃CA酶活力。可见添加MLE可以提高大鲢胃的消化及泌酸能力,而添加DNJ仅对胃的泌酸能力有所改善,这可能是桑叶提取物中除了DNJ之外,有其他活性成分在提高胃的消化及泌酸能力方面发挥了作用。杨春涛^[22]的研究表明,桑叶黄酮可以提高瘤胃 α -淀粉酶以及皱胃蛋白酶活性从而提高犊牛对营养物质的消化能力;彭思博等^[23]发现饲料中添加60—120 mg/kg的 γ -氨基丁酸,乌鳢(*Ophicephalus argus*)肠道胰蛋白酶和脂肪酶活性显著提高。

肠道是营养物质消化和吸收的主要场所。在肠道内,食物在胰蛋白酶和脂肪酶等的作用下消化分解为小分子物质,通过肠绒毛内的乳糜管和毛细血管吸收入血,为机体提供营养。肠道消化吸收酶活力、绒毛高度和数量的提高及空腔率的降低反映肠道消化、吸收能力的提高。王永昌^[24]和王咏梅等^[10]的研究表明,桑叶粉和桑叶黄酮可以改善肠道结构,提高消化吸收能力。在本研究中,饲料中添加MLE和DNJ均能促进大鲢肠道发育,改善肠道的形态结构,提高肠道蛋白酶和脂肪酶活力,同时

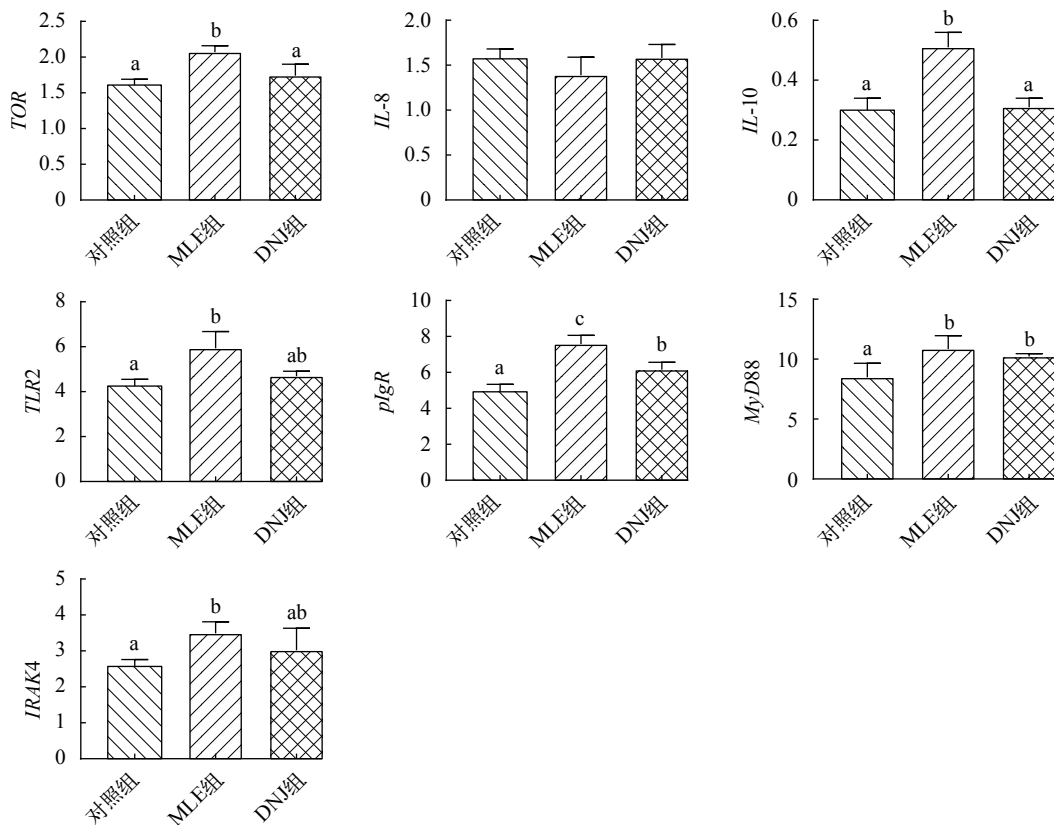


图3 MLE和DNJ对大鲢肠道免疫相关基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of MLE and DNJ on intestinal immune related gene expression of *Andrias davidianus*

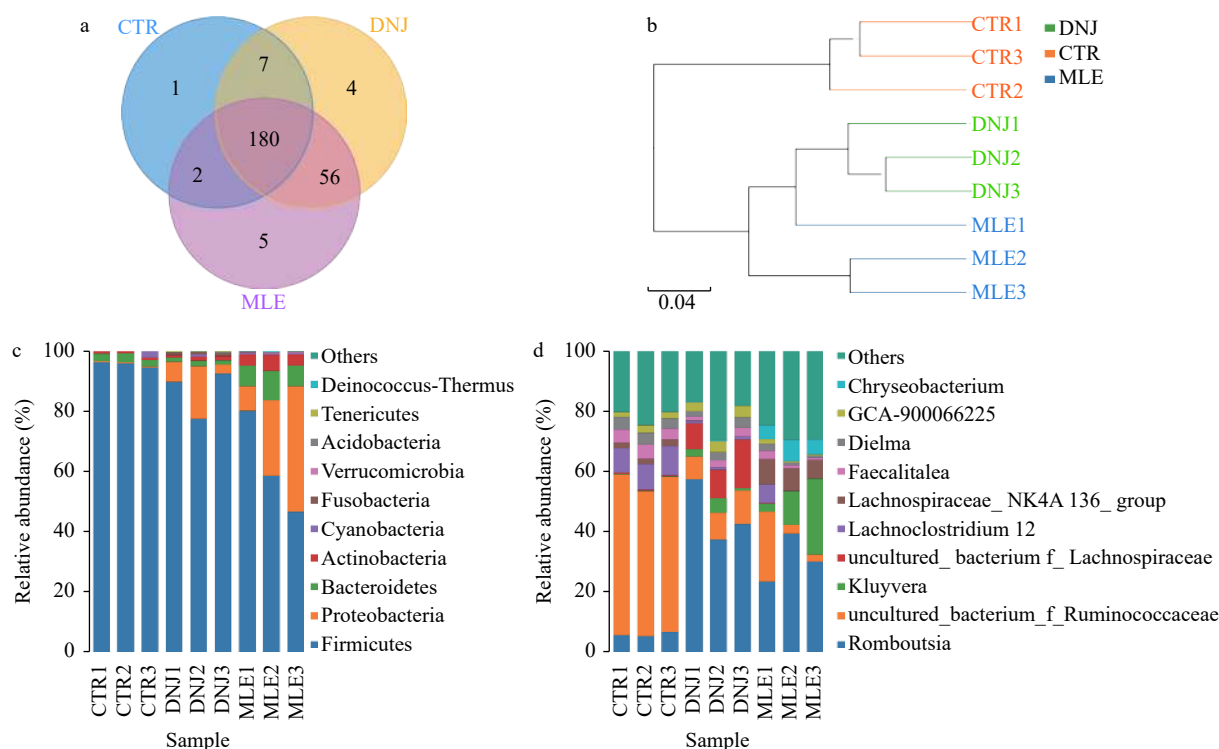


图4 MLE和DNJ对大鲵肠道菌群的结构分析

Fig. 4 Effects of MLE and DNJ on intestinal flora structure of *Andrias davidianus*

a. 不同组OUT分析; b. 样品UPGMA聚类树; c. 门水平样品序列分类; d. 属水平样品序列分类

表9 肠道菌群Alpha多样性指数

Tab. 9 Alpha diversity indices of samples

样品 Simple	Alpha多样性指数				
	ACE	Chao1	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖率 Coverage (%)
对照组 Control	189.8	191.4	2.63	0.201	99.98
MLE组	204.2	205.3	2.82	0.152	99.98
DNJ组	228.1	231.2	2.48	0.244	99.95
P-value	0.014	0.017	0.254	0.377	99.90

注: 每组数值分别为每组三个样品的均值

Note: The values are the mean values of three samples in each group

降低了肠道淀粉酶活力。大鲵作为肉食性水产动物, 对淀粉的利用率较低。对于肉食性动物来说, 提高机体对饲料蛋白和脂肪的消化吸收, 降低对淀粉的利用是有利的。MLE和DNJ对肠道淀粉酶活力有抑制作用, 这可能与桑叶中的生物碱抑制机体对二糖类分解酶活性密切相关^[25], 相似的结果在Nuraniye等^[26]的研究中也有发现。

3.3 MLE和DNJ对大鲵肠黏膜屏障功能影响的比较

肠道是机体抵御病原体入侵的第一道屏障, 其结构和功能完整性是维持养殖动物肠道健康的基础。肠道上皮细胞紧密连接及细胞膜结构是维持肠道通透性的物质基础, 保证营养物质的正常运转,

同时阻止有害物质进入^[27]。肠道上皮细胞结构受损会破坏肠黏膜屏障功能, 致使肠道通透性增加, 使得内毒素等有害物质透过上皮细胞, 随血液循环至全身各处, 危害养殖动物健康。D-乳酸是胃肠道细菌的代谢产物; 内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁成分, 正常情况下由于肠黏膜屏障功能完整难以进入血液循环^[28]。当屏障功能受损时, 细胞内的D乳酸会释放出来, LPS穿过肠黏膜, 进入血液循环系统, 从而对机体产生毒害作用。因此, 血浆中的DAO活力及内毒素、D-乳酸含量可反映肠道损伤状态。有研究表明, 在NASH小鼠日粮中添加DNJ可以上调肠道ZO-1的表达水平, 增强肠黏膜屏障功能^[15], 与本研究结果相似。在本研究中, 添加MLE和DNJ均降低了血液中内毒素和D-乳酸, 但二者差异较大, MLE降低幅度较大, DNJ降低幅度较小。有研究表明, 植物多糖^[29]和黄酮^[29]等活性物质可以增加细胞间紧密连接蛋白的表达, 有利于调节肠黏膜屏障通透性、保持上皮结构完整和修复受损的肠黏膜屏障。MLE中的多糖和黄酮类物质可能与DNJ发挥了协同作用增强了大鲵的肠黏膜屏障功能。

3.4 MLE和DNJ对大鲵肠道抗氧化能力影响的比较

抗氧化能力的强弱是衡量机体健康程度重要指标。肠道与外源物质直接接触, 因此极易产生各种氧化应激反应, 影响肠道的正常生理功能。T-

AOC和MDA是反映机体抗氧化综合能力的指标。MDA是体内脂质过氧化反应的终产物, 其含量的高低反映了体内脂质过氧化程度。MLE和DNJ的抗氧化作用在其他研究中得到证实, 如桑叶水提取物可以降低糖尿病大鼠血清中MDA含量^[30], DNJ可以提高胃溃疡小鼠胃的抗氧化能力, 具体表现为抗氧化酶活性提高, MDA含量降低^[31]。本研究得到了与前人相似的结果, 在大鲵饲料中添加MLE和DNJ均可提高肠道总抗氧化能力, 降低丙二醛含量, 但二者差异较大, MLE对肠道抗氧化能力的增强效果优于DNJ。除DNJ外, 桑叶提取物中所含的桑叶多酚^[32]、黄酮^[33]和多糖^[34]等物质也具有较好的抗氧化作用, 这些活性成分与DNJ一同发挥了抗氧化作用, 这可能是本研究中MLE组肠道抗氧化能力强于DNJ组的主要原因。

3.5 MLE和DNJ对大鲵肠道免疫相关基因影响的比较

肠道不仅是主要的消化吸收与抗氧化器官, 也是机体重要的免疫器官。IL-8和IL-10由活化的免疫细胞产生, IL-8是重要的促炎细胞因子, IL-10是抗炎因子, 在控制和消除炎症中起重要作用^[35, 36]。多聚免疫球蛋白受体(pIgR)参与多聚免疫球蛋白(pIg)的转运, 与免疫球蛋白的形成有关。TLRs识别病原体表面的脂多糖、酵母多糖、肽聚糖和脂蛋白等PAMP, 通过MAL与接头蛋白MyD88结合, 并向下游传递信号, 募集IRAK家族成员, 引起一系列级联反应, 调控炎症因子的转录。DNJ及其他桑叶活性成分如桑叶黄酮等的免疫作用在其他研究中得到证实, 例如, DNJ降低了糖尿病小鼠肝脏组织中TNF- α , IL-1 β 和IL-6的水平^[31, 37]。在本实验中, 添加MLE和DNJ均可以提高大鲵肠道免疫能力, MLE不同程度上调了IL-10、pIgR、TLR2、MyD88和IRAK4的表达, 可能是通过TLR2 $\rightarrow$ MyD88 $\rightarrow$ IRAK4信号通路途径激活机体免疫系统, 提高抗炎因子IL-10和多聚免疫球蛋白受体的表达, 改善大鲵肠道免疫功能, 而DNJ的提高效果不及MLE, 这可能是MLE中所含的桑叶多糖增强了大鲵的免疫功能。有研究表明, 桑叶多糖能增强长期大负荷运动小鼠机体免疫功能, 调节免疫细胞及免疫分子, 其中桑叶多糖中、高剂量的效果尤为明显^[38]。

3.6 MLE和DNJ对大鲵肠道菌群结构影响的比较

肠道微生物群作为一种新的功能器官和营养靶点, 参与人体多种代谢, 其重要性受到越来越多的关注^[39]。通过Chao1指数、ACE指数和Shannon指数等Alpha多样性指标反映了肠道微生物的丰富度和均匀度。本研究显示, 在饲料中添加MLE和

DNJ对肠道菌群有影响, 可以提高肠道菌群的丰富性和多样性, MLE组和DNJ组肠道菌群结构也更加接近; 在门水平上, 厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)为大鲵肠道优势菌群, 这一结果与许超^[40]在大鲵上的研究一致。有研究表明, 添加DNJ^[14, 15]、桑叶多糖^[41]和桑叶粉^[42]等可以促进小鼠肠道有益菌的生长并抑制有害菌的生长, 改善肠道菌群结构。此外, 在本实验中, 添加MLE和DNJ降低了大鲵肠道厚壁菌门的丰度, 添加MLE提高了拟杆菌门的丰度, Yuan等^[42]和Zheng等^[15]在桑叶粉和DNJ上的研究得到了相似的结果。在属水平上, 对照组肠道优势菌群为瘤胃球菌科中的属, 添加MLE和DNJ后, 瘤胃球菌科细菌丰度降低, 而*Romboutsia*丰度增加并成为优势菌属。瘤胃球菌科细菌和*Romboutsia*均属梭菌目, 能够降解纤维素, 是肠道中的有益菌^[43, 44]。

4 结论

在日粮中添加MLE可以提高大鲵生长性能, 促进肠道发育, 提高大鲵胃和肠消化吸收、抗氧化与免疫功能, 改善肠道菌群结构, 提高肠道微生物多样性; 而添加DNJ对大鲵肠道消化、抗氧化、免疫能力及肠道发育有一定改善作用, 改善肠道菌群结构。综合胃和肠结构和功能, 复合MLE较单体DNJ效果更优。

参考文献:

- [1] Wang H, Bai Y, Yang W J, et al. Expression regulation of *Andrias davidianus* antimicrobial peptide genes induced by *Citrobacter freundii* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 32(9): 2233-2237. [王慧, 白禹, 杨文佳, 等. 大鲵抗菌肽家族基因对弗氏柠檬酸杆菌侵染的表达调控 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(9): 2233-2237.]
- [2] Mary V S, Jibu T. Polyphenolic constituents in mulberry leaf extract (*M. latifolia* L. cv. BC259) and its antidiabetic effect in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 32(1): 69-74.
- [3] He X, Li H, Gao R, et al. Mulberry leaf aqueous extract ameliorates blood glucose and enhances energy expenditure in obese C57BL/6J mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019(63): 103505.
- [4] Yu X M, An X, Lu H, et al. Hypoglycemic effects of mulberry leaf extracts on diabetic mice [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2018, 47(3): 432-436.
- [5] Chang C H, Chang Y T, Tseng T H, et al. Mulberry leaf extract inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation

- via depressing IL-6 and TNF- α derived from adipocyte [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, **26**(3): 1024-1032.
- [6] Ling W, Gang C, Jian S P, *et al.* Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory properties and LC-MS/MS identification of compounds of ethanolic extract from Mulberry leaves [J]. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 2018, **17**(4): 313-319.
- [7] Lei C L, Li J, Wu Y S, *et al.* Effects of mulberry branch and leaf extract on growth performance, serum immune indexes and antioxidant capacity of laying hens [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2019, **55**(8): 118-122. [雷春龙, 李娟, 吴永胜, 等. 桑枝叶提取物对蛋鸡生产性能、血清免疫指标与抗氧化能力的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2019, **55**(8): 118-122.]
- [8] Song Q L, Zhou Q Y, Wei Q P, *et al.* Effects of mulberry leaf extract on growth performance, slaughter performance and meat quality of yellow dwarf chickens [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, **30**(1): 191-201. [宋琼莉, 周泉勇, 韦启鹏, 等. 桑叶提取物对矮脚黄鸡生长性能、屠宰性能及肉品质的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, **30**(1): 191-201.]
- [9] Fan J H, Zhang Y H, Lou L F, *et al.* Effects of mulberry leaf and its extracts on growth nutrient digestion and carcass quality of AA broiler chickens [J]. *Hangzhou Agricultural Science and Technology*, 2012(5): 29-32. [范京辉, 张永华, 楼立峰, 等. 桑叶及其提取物对AA肉鸡生长、养分消化与胴体品质的影响 [J]. 杭州农业与科技, 2012(5): 29-32.]
- [10] Wang Y M, Chen B, Cao J M, *et al.* Effects of mulberry leaf flavonoids on intestinal mucosal morphology and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, **32**(4): 1817-1825. [王咏梅, 陈冰, 曹俊明, 等. 桑叶黄酮对凡纳滨对虾肠道黏膜形态和肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2020, **32**(4): 1817-1825.]
- [11] Chen B, Yang J H, Cao J M, *et al.* Effects of dietary mulberry leaf flavonoids on muscle antioxidant indices and nutritional compositions of GIFT, *Oreochromis niloticus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, **48**(3): 90-95. [陈冰, 杨继华, 曹俊明, 等. 桑叶黄酮对吉富罗非鱼肌肉抗氧化指标及营养组成的影响 [J]. 淡水渔业, 2018, **48**(3): 90-95.]
- [12] Zhao X, Li L, Luo Q, *et al.* Effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharides on growth performance, diarrhea, blood parameters, and gut microbiota of early-weanling pigs [J]. *Livestock Science*, 2015(177): 88-94.
- [13] Luo Q L. Effect of mulberry leaf polysaccharide on growth performance and immune function of weaned piglets [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2012: 35. [罗秋兰. 桑叶多糖对断奶仔猪生长性能和免疫功能的影响研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2012: 35.]
- [14] Hu T G, Peng W, Shen W Z, *et al.* Effect of 1-deoxynojirimycin isolated from mulberry leaves on glucose metabolism and gut microbiota in a streptozotocin-induced diabetic mouse model [J]. *Journal of Natural Products*, 2019, **82**(8): 2189-2200.
- [15] Zheng J, Zhu L, Hu B, *et al.* 1-Deoxynojirimycin improves high fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by restoring gut dysbiosis [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019(71): 16.
- [16] Li Z, Chen X, Chen Y, *et al.* Effects of dietary mulberry leaf extract on the growth, gastrointestinal, hepatic functions of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **51**(6): 2613-2623.
- [17] Wu P, Li B L, Li L, *et al.* Effect of dietary mulberry powder on growth performance, slaughter performance and meat quality of yellow-feather broilers [J]. *China Poultry*, 2007, **29**(7): 13-15. [吴萍, 厉宝林, 李龙, 等. 日粮中添加桑叶粉对黄羽肉鸡生长性能、屠宰性能和肉品质的影响 [J]. 中国家禽, 2007, **29**(7): 13-15.]
- [18] Li W T, Wang Y C, Xu Q L, *et al.* Effect of eucommia ulmoides oliv and mulberry leaf extract on growth performance and pork quality of fattening pigs [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(10): 157-160. [李婉涛, 王义翠, 徐秋良, 等. 杜仲和桑叶提取物对育肥猪生长性能及猪肉品质的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(10): 157-160.]
- [19] Yang J H, Chen B, Huang Y H, *et al.* Effects of dietary mulberry leaf flavonoids on growth performance, body composition, antioxidant indices and resistance to nitrite exposure of genetic improvement of farmed Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, **29**(9): 3403-3412. [杨继华, 陈冰, 黄燕华, 等. 饲料中添加桑叶黄酮对吉富罗非鱼生长性能、体成分、抗氧化指标及抗亚硝酸盐应激能力的影响 [J]. 动物营养学报, 2017, **29**(9): 3403-3412.]
- [20] Shin J M, Munson K, Vagin O, *et al.* The gastric HK-AT-Pase: structure, function, and inhibition [J]. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 2009, **457**(3): 609.
- [21] Unwin R J, Shirely D G, Capasso G. Urinary acidification and distal renal tubular acidosis [J]. *Journal of Nephrology*, 2002, **15**(Suppl 5): S142-150.
- [22] Yang C T. Effects of *candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on growth and gastrointestinal development in calves [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016: 26-27. [杨春涛. 热带假丝酵母与桑叶黄酮对犊牛生长和胃肠道发育的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016: 26-27.]
- [23] Peng S B, Chen X M, Kong Y X, *et al.* Effects of γ -aminobutyric acid on the growth performance, activities of digestive enzymes and antioxidant enzymes in the intestinal tract of snakehead [J]. *Feed Industry*, 2020, **41**(14): 40-45. [彭思博, 陈秀梅, 孔雨昕, 等. γ -氨基丁酸

- 对乌鳢生长性能、肠道消化酶和抗氧化酶活性的影响[J]. 饲料工业, 2020, **41**(14): 40-45.]
- [24] Wang Y C. Study on the feeding values of mulberry leaf powder in geese diets [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016: 43-46. [王永昌. 桑叶粉对鹅饲用价值的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016: 43-46.]
- [25] Asano N, Kizu H, Oseki K, *et al.* N-alkylated nitrogen-in-the-ring sugars: conformational basis of inhibition of glycosidases and HIV-1 replication [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, **38**(13): 2349-2356.
- [26] Nuraniye E, Emrah D. Determination of 1-Deoxynojirimycin by a developed and validated HPLC-FLD method and assessment of In-vitro antioxidant, α -Amylase and α -Glucosidase inhibitory activity in mulberry varieties from Turkey [J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2019(53): 234-242.
- [27] Zhang S, Zhou Q, Li Y, *et al.* MitoQ modulates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction via regulating Nrf2 signaling [J]. *Mediators of Inflammation*, 2020(44): 1-9.
- [28] Chen K Q, Ye Y T, Cai C F, *et al.* Effects of dietary oxidized fish oil on the intestinal structure and permeability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(4): 804-813. [陈科全, 叶元土, 蔡春芳, 等. 饲料氧化鱼油引起草鱼肠道结构损伤、通透性增加[J]. 水生生物学报, 2016, **40**(4): 804-813.]
- [29] Chen J. Intestinal absorption barricade network and the effect of apigenin influencing bioavailability of Raloxifene [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2008: 80. [陈建. 黄酮类成分Apigenin影响肠吸收屏障网络及其提高雷洛昔芬生物利用度的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2008: 80.]
- [30] Liu C Y, Zhu R Y, Liu H X, *et al.* Aqueous extract of mori folium exerts bone protective effect through regulation of calcium and redox homeostasis via PTH/VDR/CaBP and AGEs/RAGE/Nox4/NF- κ B signaling in diabetic rats [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018(9): 1239.
- [31] Xuehua P, Shuangdi L, Xiaodan S, *et al.* 1-Deoxynojirimycin (DNJ) ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer in mice by affecting NF- κ B signaling pathway [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018(9): 372.
- [32] Mahmood T, Anwar F, Afzal N, *et al.* Influence of ripening stages and drying methods on polyphenolic content and antioxidant activities of mulberry fruits [J]. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 2017(1): 1-9.
- [33] Wang B, Yang C T, Diao Q Y, *et al.* The influence of mulberry leaf flavonoids and *Candida tropicalis* on antioxidant function and gastrointestinal development of preweaning calves challenged with *Escherichia coli* O141: K99 [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, **101**(7): 6098-6108.
- [34] Yuan Q X. Isolation, purification, structure and bioactivity of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016: 113-126. [袁清霞. 桑叶多糖分离纯化、结构分析及生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 113-126.]
- [35] Cenci S, Weitzmann M N, Roggia C, *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, **106**(10): 1229-1237.
- [36] Waugh D J J, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer [J]. *Clinical Cancer Research an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2008, **14**(21): 6735-6741.
- [37] Qingpu L, Xuan L, Cunyu L, *et al.* 1-Deoxynojirimycin alleviates liver injury and improves hepatic glucose metabolism in db/db mice [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2016, **21**(3): 279.
- [38] Li X B. Effect of mulberry leaves polysaccharide on immune function in mice with long-term heavy training [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2012, **18**(24): 269-272. [李小兵. 桑叶多糖对长期大负荷运动训练小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, **18**(24): 269-272.]
- [39] Leclercq S, Sébastien M, Patrice D C C A, *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**(42): E4485-E4493.
- [40] Xu C. The study of intestinal bacterial community structure and antibiotics susceptibility of intestinal bacterial strains from the farming giant salamander [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 49. [许超. 养殖大鲵肠道菌群结构及肠道细菌药敏性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 49.]
- [41] Chen L H, Zhang X, Sun S F, *et al.* Regulation of *Morus alba* polysaccharides on disturbance of intestinal flora in mice [J]. *Drugs & Clinic*, 2015, **30**(6): 633-636. [陈涟昊, 张霞, 孙世芳, 等. 桑叶多糖调节小鼠肠道菌群失调的研究[J]. 现代药物与临床, 2015, **30**(6): 633-636.]
- [42] Chen Y, Ni J J, Li H W. Effect of green tea and mulberry leaf powders on the gut microbiota of chicken [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, **15**(1): S142-S150.
- [43] Jacoline G, Alexander U, Ivelina S, *et al.* *Romboutsia hominis* sp. nov., the first human gut-derived representative of the genus *Romboutsia*, isolated from ileostoma effluent [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, **68**(11): 3479-3486.
- [44] Pamela A, Ibrahima T S, Niokhor D, *et al.* Description and genomic characterization of *Massiliimalia massiliensis* gen. nov., sp. nov., and *Massiliimalia timonensis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Ruminococcaceae isolated from the human gut [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, **112**(6): 905-918.

EFFECTS OF DIETARY MULBERRY LEAF EXTRACT AND 1-DEOXYNOJIRIMYCIN ON GROWTH, DIGESTION AND IMMUNITY CAPACITY, AND INTESTINAL MICROORGANISM OF CHINESE GIANT SALAMANDER (*ANDRIAS DAVIDIANUS*)

FENG Qi-Feng¹, LI Zhan-Fu¹, HUANG Xian-Zhi², LI Hong³, ZHAI Xu-Liang³, XUE Yang³,
LIN Shi-Mei¹, CHEN Yong-Jun¹ and LUO Li¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Reproduction and Development, Ministry of Education; College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China; 3. Chongqing Fisheries Technical Extension Center, Chongqing 401121, China)

Abstract: This study explored the effects of feeding basal diet, mulberry leaf extract diet (containing 0.75% MLE) and 1-deoxynojirimycin diet (containing 0.04% DNJ) on growth, digestion and immunity capacity, and intestinal microorganism in giant salamanders for a 90-day trial. Giant salamanders with an initial body weight of (47.81±0.23) g were randomly divided into 3 groups for these 3 diets. Compared with the control diet, the weight gain rate and feed efficiency in MLE and DNJ groups were significantly improved ($P<0.05$); lipase and trypsin activities were also significantly increased ($P<0.05$). The contents of endotoxin in plasma acid and malondialdehyde in intestine in MLE and DNJ groups were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). Compared with control group, the number of intestinal villi in MLE and DNJ groups were increased, and the tight junction between intestinal mucosa cells in MLE and DNJ groups were closer. Compared with the control group, the mRNA expression levels of target of rapamycin (TOR), interleukin-10 (IL-10), polymeric immunoglobulin receptor (pIgR), toll-like receptor-2 (TLR2) and myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88) in MLE group were significantly increased ($P<0.05$), and the mRNA expression level of pIgR in the DNJ group was significantly increased ($P<0.05$). The diversity of intestinal bacteria in MLE and DNJ group was higher than that in control group. There was no significant difference in weight gain rate and feed efficiency among 3 groups ($P>0.05$); MLE group significantly increased the activities of pepsin, H^+-K^+ -ATPase, Na^+-K^+ -ATPase and the total intestinal antioxidant capacity compared with the control group ($P<0.05$). In addition, MLE group had closer tight junction between intestinal mucosa cells, higher intestinal villi height ($P<0.05$), and lower plasma endotoxin content ($P<0.05$), compared with DNJ group. In summary, MLE and DNJ can improve growth performance, digestion and absorption functions, intestinal antioxidant and immune capabilities, promote the growth of beneficial bacteria in the intestine, increase the diversity of intestinal microorganisms, and promote the intestinal development of the giant salamander. Combined the structure and function of the stomach and intestines, MLE is more effective than DNJ.

Key words: Mulberry leaf extract; 1-deoxynojirimycin; Antioxidant; Intestinal mucosa baries function; Intestinal microbiota