



张菁怡,翁林健,魏庆,等.蛋鸡禁食前后血清代谢物及肠道菌群结构的变化[J].江西农业大学学报,2024,46(6):1563-1576.

ZHANG J Y,WENG L J,WEI Q,et al.Changes of serum metabolites and intestinal microflora structure in laying hens before and after fasting[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2024,46(6):1563-1576.

蛋鸡禁食前后血清代谢物 及肠道菌群结构的变化

张菁怡¹,翁林健¹,魏庆¹,李伟²,刘红道²,卢新民³,
蔡志欢³,李强³,朱海燕¹,黄建珍^{1*},梁海平^{1*}

(1.江西农业大学 动物科学技术学院,江西 南昌 330045;2.江西省吉安县农业产业发展中心,江西 吉安 343100;3.江西省赣州市农业农村局,江西 赣州 341000)

摘要:【目的】试验旨在探究禁食前后蛋鸡血清代谢物和肠道菌群结构变化的规律,以揭示蛋鸡应对能量匮乏的策略,从而为改善家禽饲养方式、制定科学日粮配方等提供理论基础。【方法】以252日龄海兰褐蛋鸡为研究对象,将90只蛋鸡随机分为3组:对照(C)组、禁食1 d(F1)组和禁食3 d(F3)组,每组6个重复,每个重复5只鸡,试验结束后从每组每个重复中随机挑选1只鸡进行屠宰,采集血液和盲肠内容物进行血清非靶向代谢组和16S rDNA测序分析。【结果】(1)血清非靶向代谢组结果显示:禁食后,蛋鸡血清差异代谢物水平主要呈上升趋势,主要差异代谢物有1-甲基组氨酸(1-methylhistidine)、哌啶酸(pipelicolic acid)、L-赖氨酸(L-lysine)、泛酸(pantothenic acid)、吡哆胺(pyridoxamine)、脱氧胆酸(deoxycholic acid)、半乳糖醇(dulcitol)及乙酰左旋肉碱(acetyl-L-carnitine),表明禁食后肌肉蛋白质分解加强、生酮反应增加,以维持机体能量需求;(2)肠道菌群16S rDNA测序结果显示:禁食后,蛋鸡肠道菌群多样性呈下降趋势,且菌群结构发生显著变化,属水平上的差异优势菌群包括 *Rikenellaceae_RC9_gut_group*、*Bacteroides*、*Ruminococcus_torques_group* 和 *Desulfovibrio* 等,均与能量代谢相关;(3)差异优势菌群与差异代谢物关联分析发现:菌群丰度与脱氧胆酸和半乳糖醇水平呈负相关,与其他筛选出的差异代谢物水平呈正相关。【结论】禁食1 d和3 d后,蛋鸡血清代谢物水平和肠道菌群均发生显著变化,且主要差异代谢物改变可能与肠道菌群变化有关,二者共同维持蛋鸡的代谢稳态。

关键词:禁食;蛋鸡;代谢组学;肠道菌群

中图分类号:S852.2;S852.6 文献标志码:A

文章编号:1000-2286(2024)06-1563-14

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Changes of serum metabolites and intestinal microflora structure in laying hens before and after fasting

ZHANG Jingyi¹, WENG Linjian¹, WEI Qing¹, LI Wei², LIU Hongdao², LU Xinmin³,
CAI Zhihuan³, LI Qiang³, ZHU Haiyan¹, HUANG Jianzhen^{1*}, LIANG Haiping^{1*}

收稿日期:2024-07-15 修回日期:2024-09-03

基金项目:国家自然科学基金项目(32360867)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32360867)

作者简介:张菁怡,硕士生,orcid.org/0009-0002-3121-6149,1265334436@qq.com;*通信作者:黄建珍,教授,博士,主要从事动物营养代谢病及其表观调控研究,orcid.org/0000-0001-8086-1860,huang813813@163.com;梁海平,副研究员,主要从事动物营养生理生化研究,orcid.org/0009-0000-6225-3394,lianghaiping1967@126.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取 CC BY-NC-ND 协议

(1.College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Agricultural Industry Development Center of Ji'an County, Ji'an, Jiangxi 343100, China; 3. Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Ganzhou City, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: [Objective] This study aims to explore the changes of serum metabolites and intestinal flora structure of laying hens before and after fasting, thus revealing the strategies of laying hens to cope with energy deficiency, and providing a theoretical basis for improving the feeding method of poultry and formulating scientific dietary formulations. [Method] A total of 90 252-day-old Hyline brown laying hens were randomly divided into three groups: control group (C), fasting group for 1 day (F1) and fasting group for 3 days (F3) with 6 replicates in each group and 5 chickens in each replicate. After the experiment, 1 chicken was randomly selected from each replicate for slaughter. Blood and cecum contents were collected for serum non-targeted metabolome and 16S rDNA sequencing analysis. [Result] (1) The results of serum non-targeted metabolomics showed that after fasting, the levels of serum differential metabolites of laying hens increased, and the main differential metabolites were 1-methylhistidine, pipercolic acid, L-lysine, pantothenic acid, pyridoxamine, deoxycholic acid, dulcitol and acetyl-L-carnitine. That indicated that muscle protein decomposition and ketogenic reaction were enhanced after fasting in order to maintain the energy demand of the body. (2) The results of 16S rDNA sequencing of intestinal flora showed that after fasting, the intestinal flora diversity of laying hens showed a decreasing trend, and the flora structure changed significantly. The differentially dominant bacterial groups at the genus level included *Rikenellaceae_RC9_gut_group*, *Bacteroides*, *Ruminococcus_torques_group* and *Desulfovibrio*, etc., all of which were related to energy metabolism. (3) Correlation analysis between differential dominant bacteria and differential metabolites showed that the abundance of bacteria was negatively correlated with the levels of deoxycholic acid and dulcitol, and positively correlated with the levels of other screened differential metabolites. [Conclusion] After fasting for 1 and 3 days, serum metabolites levels and intestinal microbes of laying hens change significantly, and the changes of different metabolites may be related to the changes of intestinal flora, and they jointly maintain metabolic homeostasis of laying hens.

Keywords: fasting; laying hens; metabolomics; intestinal flora

【研究意义】代谢包括能量代谢与物质代谢,是生命活动的基本特征之一,能量代谢伴随物质代谢进行,是动物机体与外界环境之间能量交换和动物机体内能量转移的过程。动物在进化过程中会产生独特的代谢反应系统,以适应能量匮乏期间(如冬眠、迁徙等)的代谢变化^[1]。自研究^[2]表明,动物禁食后因体内碳水化合物减少,从而增加机体对脂肪作为能量供应物质的依赖。同时,禁食会影响动物肠道微生物群的种群动态和活动,这种相互作用也会使宿主代谢发生改变^[3]。此外,能量匮乏可能提高机体某些机能,如限饲可提高鸡的饲料转化率和抗病性^[4]。因此,探究能量剥夺后家禽代谢和肠道菌群变化规律,以揭示家禽应对能量缺乏的策略,最终可为改善家禽的饲喂方式、科学日粮营养配方及防治能量代谢疾病等提供理论参考。【前人研究进展】对于禁食诱导哺乳动物的代谢变化机制已有广泛研究。研究表明延长禁食时间结合降低能量摄入改变了雌性小鼠的代谢特征并对其健康有益^[5],短期禁食触发小鼠大脑和肝脏中N-酰基乙醇胺(一类神经保护脂质)的显著升高^[6]。史萃菡等^[7]通过对比持续禁食与恢复采食情况下小鼠中枢不同核团兴奋性变化,发现除经典的食欲调控下丘脑关键核团神经元兴奋性发生显著变化外,还存在多个核团有明显的c-Fos表达差异包括分泌催产素和抗利尿激素的视上核(supraoptic nucleus, SO),与抗应激相关的前缘皮层核 prelimbic cortex, PrL),以及可以抑制棕色脂肪产生的下丘脑后区核团(posterior hypothalamic area, PH)。Li等^[8]研究阐明猪在禁食后肝脏脂肪代谢发生显著变化,且饱和脂肪酸在肝脏脂肪中的比例增加。也有研究^[9]表明,禁食8 d后健康男性血清中3-羟基-L-犬尿氨酸、吡啶甲酸、苯丙氨酸和酪氨酸等代谢物水平升高,表明肌肉蛋白的蛋白水解增加。间歇性禁食与人类肠道微生物菌群相关,其16个菌属丰度因间歇性禁食而改变^[10]。短期(5 h)禁食显著上调参与线粒体和过氧化物酶体脂肪酸氧化途径的基因,且白色脂肪组织中的脂肪酸氧化受禽类机体营养状况动态

调控^[11]。也有研究^[12]发现禁食和复喂增加了鸡肝脏的脂肪含量和下丘脑中蛋白激酶 AMP 激活的催化亚基 Alpha (protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha, *AMPK α*)、蛋白激酶 AMP 激活的催化亚基 Beta (*AMPK β*) 和蛋白激酶 AMP 激活的催化亚基 Gamma (*AMPK γ*) 等脂解相关基因的表达,但降低了肝脏中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (stearoyl-CoA desaturase, *SCD*)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, *GR*) 和 Fas 细胞表面死亡受体 (fas cell surface death receptor, *FAS*),脂肪中 *SCD*、*GR* 和下丘脑中 *GR* 等脂肪合成相关基因的表达。与未禁食的鸡相比,禁食 4.5 h 和 9 h 鸡的肠道通透性增加,肠道细胞屏障完整性丧失^[13]。Liu 等^[14]研究发现,禁食 25 h 后,雏鸡体质量、大腿和腹部脂肪质量下降,且雏鸡空腹产热随禁食时间的延长呈极显著下降。同时,禁食后,鸡体内的葡萄糖碳循环会增强^[15]。

【本研究切入点】尽管已有一定研究揭示了短期或长期禁食前后动物组织内基因、代谢物等变化,但大多针对一种或几种基因或代谢物,未系统阐述持续多天禁食前后动物机体的代谢变化,且禁食前后家禽血清代谢物和肠道菌群改变及其关系的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】研究采集自由采食、禁食 1 d 和禁食 3 d 蛋鸡的血液样本和盲肠内容物,分别分析其血清代谢物和盲肠微生物,揭示禁食前后蛋鸡血清代谢物和肠道菌群变化规律,以期阐明蛋鸡应对能量缺乏挑战的代谢变化,为之后家禽日粮配方及代谢相关疾病等提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

试验在江西农业大学动物试验基地进行。90 只 252 日龄的海兰褐蛋鸡从江西省进贤恒容生态农业发展有限公司(已完成马立克氏、新城疫和传染性法氏囊病毒免疫程序)购入。将购入的鸡放在 A 型笼适应性饲养 13 d 后随机分成 3 组,每组 6 个重复,每个重复 5 只鸡:(1)自由采食对照组(Control, C);(2)禁食 1 d 组(Fasting for 1 day, F1);(3)禁食 3 d 组(Fasting for 3 days, F3)。试验期间,对照组饲喂基础饲粮,饲粮配方参考国家研究委员会(NRC, 1994)进行制定(表 1)。3 组分别在试验结束后于同 1 天从每个

表 1 基础饲粮组成及营养水平(风干基础)

Tab.1 Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)

基础饲粮组成 Composition of diet	含量/% Content	营养水平 Nutrient level	含量 Content
玉米 Corn	64.5	代谢能 ME/(MJ·kg ⁻¹) ^{b)}	11.56
豆粕 Soybean meal	23.50	粗蛋白质/% CP	16.35
鱼粉 Fish meal	1.50	粗脂肪/% EE	3.08
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.50	粗灰分/% Ash	3.16
石粉 CaCO ₃	8.00	钙/% Ca	3.49
食盐 NaCl	0.30	总磷/% TP	0.58
赖氨酸 L-lysine	0.10	有效磷/% AP	0.39
饲料级蛋氨酸 Feed grade Lys	0.20	赖氨酸/% Lys	0.91
氯化胆碱 Choline chloride	0.10	蛋氨酸/% Met	0.51
预混料 Premix ^{a)}	0.30	苏氨酸/% Thr	0.57
合计 Total	100		

a)预混料为每千克饲粮提供:维生素 A(VA)12 000 IU,维生素 B1(VB1)4 mg,维生素 B2(VB2)15 mg,维生素 B3(VB3)65 mg,维生素 B5(VB5)21 mg,维生素 B6(VB6)7 mg,维生素 B12(VB12)0.035 mg,维生素 D3(VD3)4 400 IU,维生素 E(VE)85 mg,维生素 K3(VK3)5 mg,生物素(biotin)0.35 mg,叶酸(folic acid)3 mg,铜(Cu)2.5 mg,铁(Fe)75 mg,锰(Mn)25 mg,锌(Zn)115 mg,碘(I)1.0 mg,硒(Se)0.35 mg,铬(Cr)0.2 mg,钴(Co)0.48 mg;b)代谢能为计算值,其余为实测值。

a)The premix provided the following per Kg of diets: VA 12 000 IU, VB1 4 mg, VB2 15 mg, VB3 65 mg, VB5 21 mg, VB6 7 mg, VB12 0.035 mg, VD3 4 400 IU, VE 85 mg, VK3 5 mg, biotin 0.35 mg, folic acid 3 mg, Cu 2.5 mg, Fe 75 mg, Mn 25 mg, Zn 115 mg, I 1.0 mg, Se 0.35 mg, Cr 0.2 mg, Co 0.48 mg;b)ME was a calculated value, while the others were measured values.

重复中随机挑选1只鸡即共6只鸡进行屠宰,并采集翅静脉血液2 000 μL ,将血液室温静置15 min后4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min离心10 min收集血清,存放于 -80°C 冰箱备用^[15]。蛋鸡处死后,采集其盲肠内容物,液氮速冻后置于 -80°C 冰箱备用^[16]。

1.2 血清代谢物测定

血清代谢物检测参考楚玉婷^[17]的方法进行。在100 μL 血清中加入400 μL 80%甲醇水溶液,混合均匀后冰浴静置5 min,15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min后取一定量的上清,加质谱级水稀释至甲醇含量为53%,15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min后收集上清。之后采用Vanquish UHPLC系统(赛默飞世尔科技公司)结合Orbitrap Q ExactiveTM HF-X质谱仪(赛默飞世尔科技公司)对上清进行UHPLC-MS/MS分析,正极性模式的洗脱液为洗脱液A(0.1%水溶性甲酸)和洗脱液B(甲醇),负极性模式的洗脱液为洗脱液A(5 mM乙酸铵)和洗脱液B(甲醇)。对下机原始数据文件进行质控,对不同样品根据保留时间偏差0.2 min和质量偏差 5×10^{-6} 对齐,使鉴定更准确,随后对信息进行峰提取并定量,整合目标离子后与mzCloud、mzVault和Masslist数据库进行比对,用blank样本去除背景离子,并对定量结果进行归一化,最后得到数据鉴定及定量结果。

1.3 盲肠内容物菌群测定

盲肠内容物菌群测定试验参考Beckers等^[18]的方法进行。首先,对样品进行DNA提取,并使用Nano-rope微量分光光度计(NanoDrop 2000,赛默飞世尔科技公司)进行DNA样品质量检测。根据所选测序区域,用带有barcode的特异引物扩增16s rDNA的目标区域,使用AMPure XP Beads对扩增产物进行纯化,用ABI StepOnePlusReal-Time PCR System(Life Technologies)进行定量,根据Novaseq6000的PE250模式pooling上机测序。

1.4 数据统计分析

试验数据均用平均值 $\pm$ 标准误表示,所有数据均采用SPSS 26.0软件的单因素方差分析(one-way ANOVA),以Tukey's HSD multiple range test事后比较确定各组间的差异。*代表 $P<0.05$,**代表 $P<0.01$ 。结果图1~7、图9、图10A、图10C和图11利用基迪奥生物在线平台(OmicShare)绘制,图8、图10B和图10D使用GraphPad Prism 8软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 蛋鸡禁食前后血清非靶向代谢组结果

2.1.1 蛋鸡禁食前后代谢物PCA分析

为观察组内样本重复性及组间样本分离趋势,本研究对各组血清样本代谢物进行PCA分析。结果如图1所示,第一主成分(PC1)可解释原始数据集39.5%的特征,第二主成分(PC2)可解释原始数据集21.6%的特征。且3组样本数据离散点均在各组内聚集,说明组内样本稳定性和重复性较好,而离散点在各组间分离并存在显著差异,表明3组间血清代谢谱发生显著变化。

2.1.2 蛋鸡禁食前后代谢物PLS-DA分析

为进一步研究3组间血清代谢物差异,在PCA分析的基础上进行PLS-DA分析。由PLS-DA分析图(图2A)可知,各组样本分离明显,无重叠,表示各组血清代谢物差异显著。之后通过置换检验评估PLS-DA模型的可靠性。如图2B所示,Q2的Y轴截距 -0.82 小于0,R2的Y轴截距均高于Q2的Y轴截距,说明PLS-DA模型较可靠,无过拟合现象,可用于后续分析。

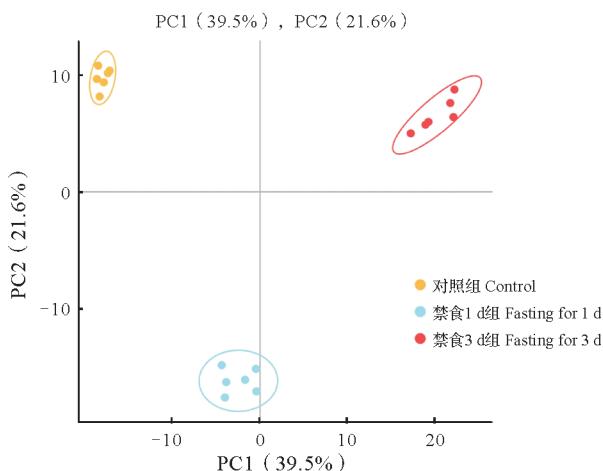


图1 蛋鸡禁食前后血清代谢物主成分(PCA)分析

Fig.1 Principal component Analysis(PCA) of serum metabolism of laying hens before and after fasting

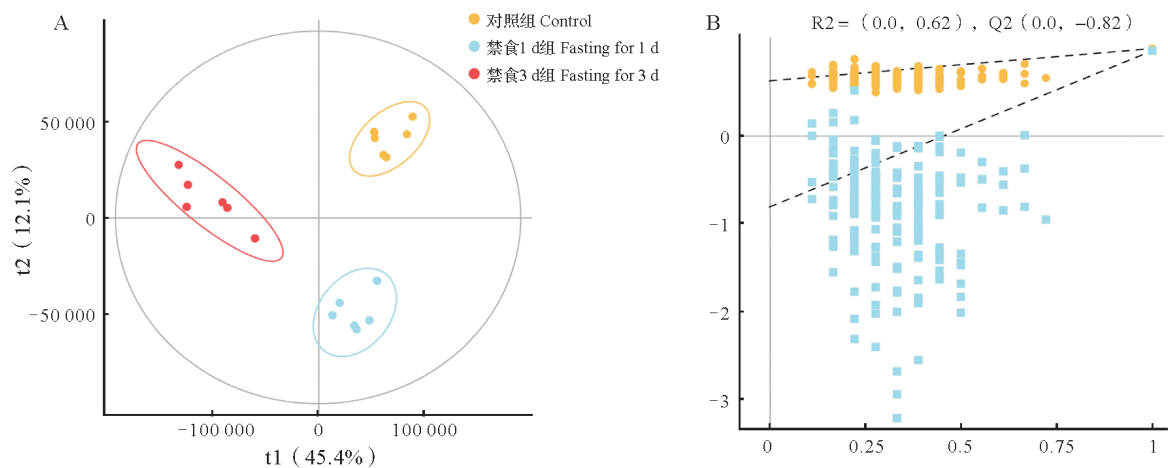


图2 蛋鸡禁食前后血清代谢物PLS-DA(A)与PLS-DA模型置换检验(B)分析
Fig.2 PLS-DA model analysis of the serum metabolites of laying hens before and after fasting

2.1.3 蛋鸡禁食前后差异代谢物统计分析

使用 *t* 检验 *P* 值及差异倍数 (fold-change, FC) 比较分析对照组、禁食 1 d 组和禁食 3 d 组之间的差异代谢物。设置 FC 上调 ≥ 2 和 FC 下调 ≤ 2、VIP ≥ 1 及 *P* < 0.05 作为条件筛选显著差异代谢物。韦恩图 (图 3) 和差异代谢物火山图 (图 4) 结果显示, 对照组和禁食 1 d 组筛选到 31 个显著差异代谢物, 与对照组相比, 禁食 1 d 组上调的差异代谢物 15 个, 下调的 16 个; 对照组和禁食 3 d 组有 36 个显著差异代谢物, 相比于对照组, 禁食 3 d 组差异代谢物上调的 20 个, 下调的 16 个; 禁食 1 d 组和禁食 3 d 组找到 19 个显著差异代谢物, 与禁食 1 d 组相比, 禁食 3 d 组差异代谢物有 11 个上调, 8 个下调。差异代谢物种类包括有机酸类, 脂质, 有机杂环化合物, 核苷、核苷酸和类似物, 有机氧化合物和苯类化合物。

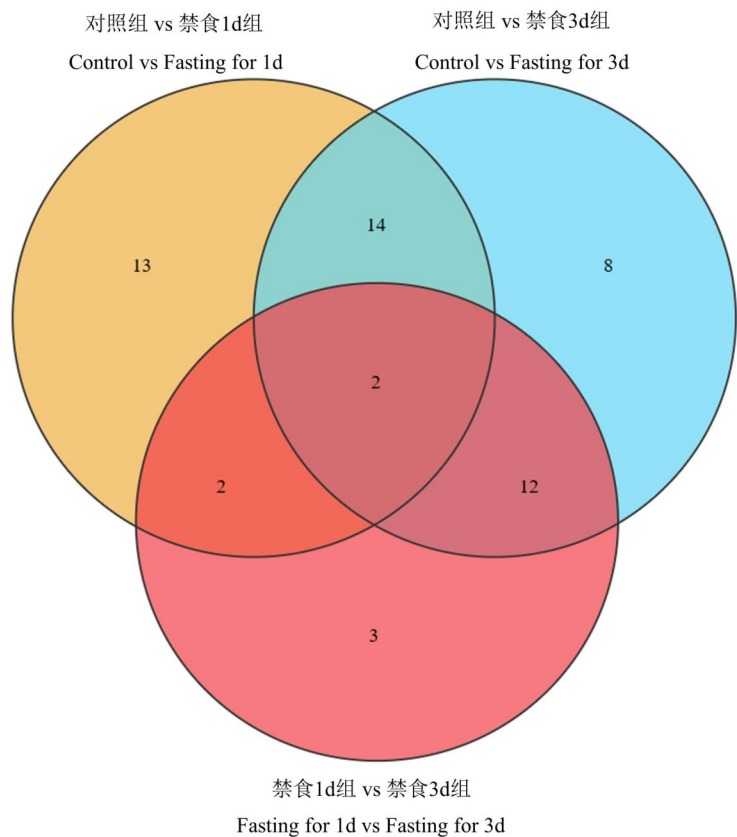
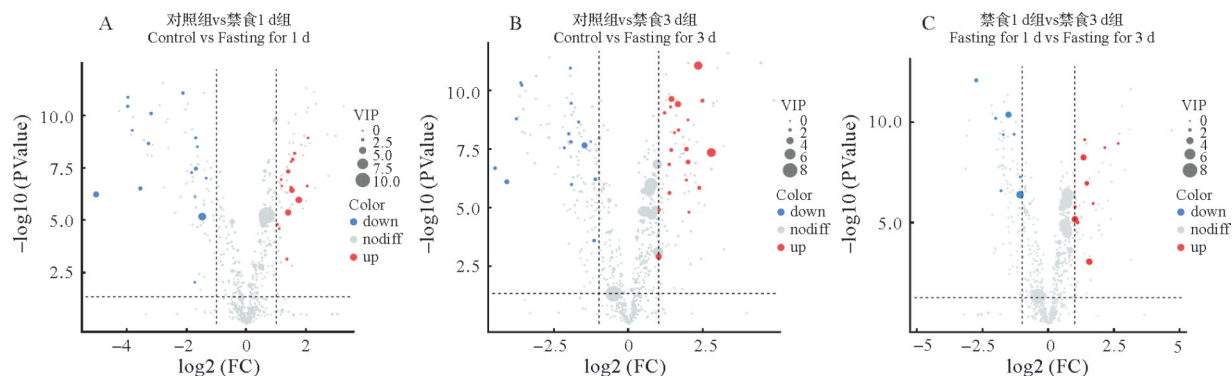


图3 蛋鸡禁食前后差异代谢物韦恩分析
Fig.3 Venn diagram of the metabolites of laying hens before and after fasting



A. 对照组和禁食 1 d 组代谢物差异分析; B. 对照组和禁食 3 d 组代谢物差异分析; C. 禁食 1 d 组和禁食 3 d 组代谢物差异分析。

A. Analysis of metabolites difference between group C and group F1; B. Analysis of metabolites difference between group C and group F3; C. Analysis of metabolites difference between group F1 and group F3.

图 4 蛋鸡禁食前后差异代谢物火山分析

Fig.4 Differential metabolite volcano map of laying hens before and after fasting

为更好地分析对照组(C)、禁食 1 d 组(F1)和禁食 3 d 组(F3)差异代谢物变化规律,将任意两组间 $|FC| \geq 2$ 的差异代谢物进行趋势分析,共得到 8 个模块。如图 5 所示,每个模块代表一种表达趋势。表 2 展示了几个趋势中的主要差异代谢物。模块 7(profile7)中差异代谢物包括 1-甲基组氨酸、哌啶酸、L-赖氨酸、泛酸和吡哆胺等,模块 1(profile1)、模块 0(profile0)和模块 6(profile6)中差异代谢物分别包括脱氧胆酸、半乳糖醇及乙酰左旋肉碱等。

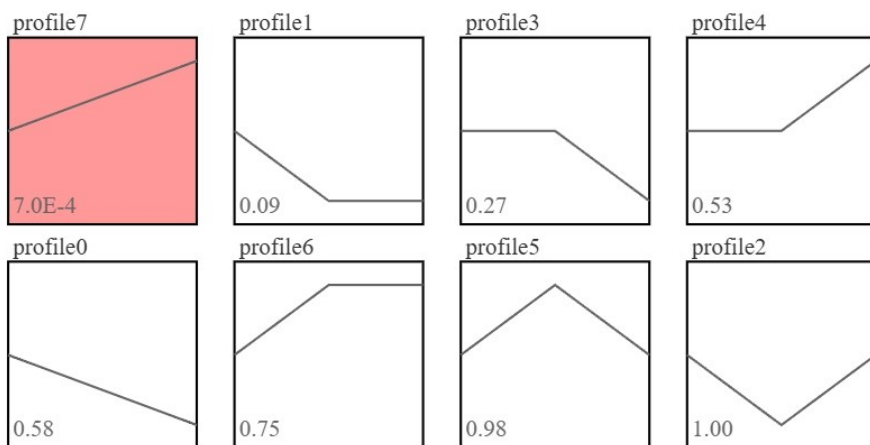


图 5 蛋鸡禁食前后差异代谢物趋势分析

Fig.5 Trend analysis of differential metabolites of laying hens before and after fasting

将所有差异代谢物进行 KEGG 富集分析,发现大部分差异代谢物富集于代谢相关通路,如氨基酸代谢、脂类代谢及辅助因子和维生素的代谢(图 6)。

2.2 蛋鸡禁食前后肠道菌群结果分析

2.2.1 蛋鸡禁食前后样本 OTUs 分析

OTUs (Operational Taxonomic Units) 是人为设置的便于分析群体遗传学或系统发育的某一个分类单元的标志。在 16S 全长比对中,97% 相似性能被认定为同一个种的肠道菌群,所以可以初步认为一个 OTU 都是属于一个种的菌群,而肠道菌群研究主要聚焦于菌群属的层面,所以 97% 相似度划分 OUT 能被接受。且 OUT 分析时进行了抽平处理,排除了测序深度不同导致的偏好性,矫正了因总菌数差异导致得到的差异菌属不可靠的问题。对照组、禁食 1 d 组和禁食 3 d 组的 OUTs 数分别为 1 257、1 171、1 252 个(图 7)。

表 2 蛋鸡禁食前后差异代谢物
Tab.2 Differential metabolites of laying hens before and after fasting

模块 Profile	名称 Name	对照组 vs 禁食 1 d 组		对照组 vs 禁食 3 d 组		禁食 1 d 组 vs 禁食 3 d 组	
		<i>P</i> 值	$\log_2$ FC	<i>P</i> 值	$\log_2$ FC	<i>P</i> 值	$\log_2$ FC
		<i>P</i> -value	$\log_2$ FC	<i>P</i> -value	$\log_2$ FC	<i>P</i> -value	$\log_2$ FC
模块 7 Profile7	1-甲基组氨酸	<0.001	0.470	<0.001	1.198	<0.001	0.727
	嘧啶酸	<0.001	1.355	<0.001	2.467	<0.001	1.112
	L-赖氨酸	<0.001	1.163	<0.001	2.016	0.002	0.852
	泛酸	<0.001	0.581	<0.001	1.421	<0.001	0.840
	吡哆胺	<0.001	1.400	<0.001	1.985	<0.001	0.586
模块 1 Profile1	脱氧胆酸	<0.001	-3.968	<0.001	-3.108	<0.001	0.225
模块 0 Profile0	半乳糖醇	0.010	-1.727	<0.001	-3.560	0.335	-1.833
模块 6 Profile6	乙酰左旋肉碱	<0.001	1.524	<0.001	1.361	0.177	-0.163

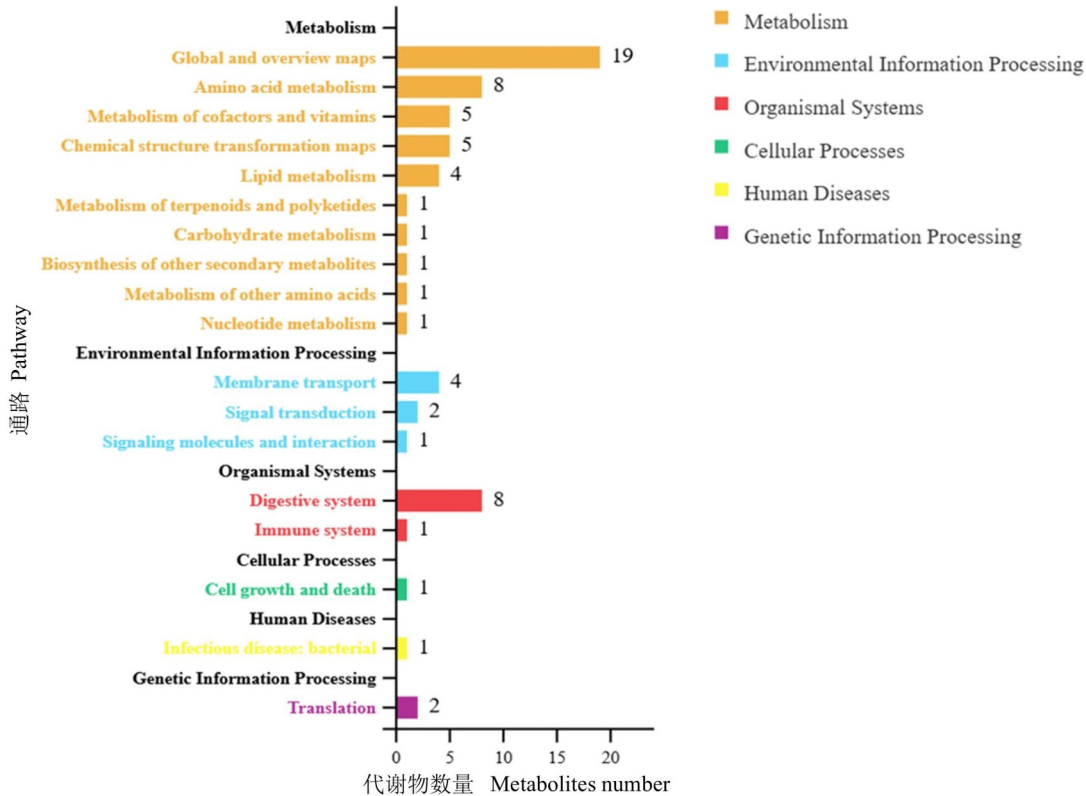


图 6 蛋鸡禁食前后差异代谢物 KEGG 富集分析

Fig.6 Analysis of KEGG enrichment of different metabolites of laying hens before and after fasting

2.2.2 肠道菌群α多样性分析

α多样性可反映一个特定区域内的物种多样性。如图 8 所示,禁食 3 d 组的肠道菌群丰富度(Chao1)、多样性(Shannon)均极显著($P<0.01$)低于对照组和禁食 1 d 组。

2.2.3 肠道菌群β多样性分析

β多样性为基于样本间距离,进行两组样本间菌群结构、物种组成的差异分析。主坐标分析 PcoA (principal coordinate analysis) 基于 OTU 分类水平,运用 unifrac 算法计算样本间距离,反映不同组之间的 β 多样性,且样本间距离远近反映样本菌群结构等差异大小。由图 9 可知,3 组样本的肠道菌群结构差异显著,表明禁食改变了肠道菌群组成。

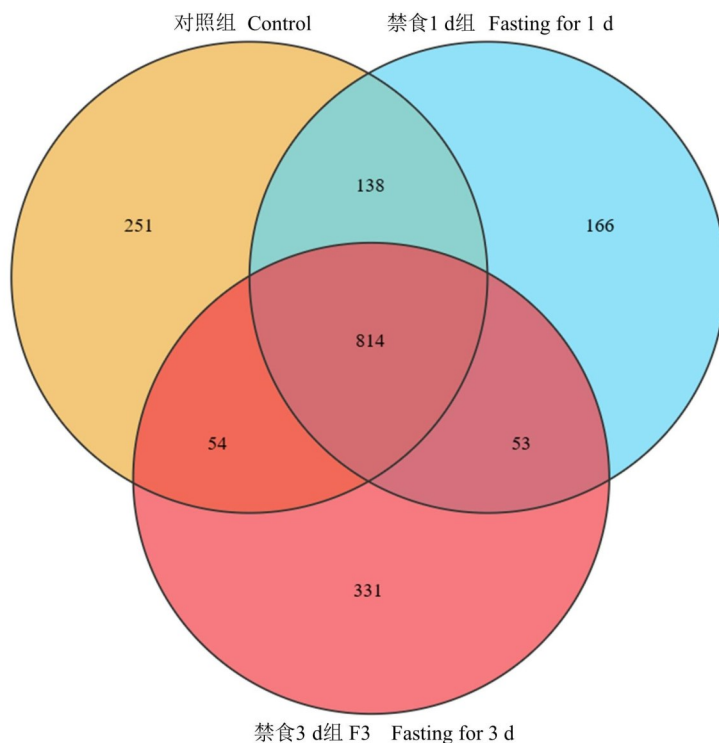


图 7 蛋鸡禁食前后肠道微生物 OTU 数目韦恩分析

Fig.7 VENN plot of the number of OTUs of intestinal microbiota of laying hens before and after fasting

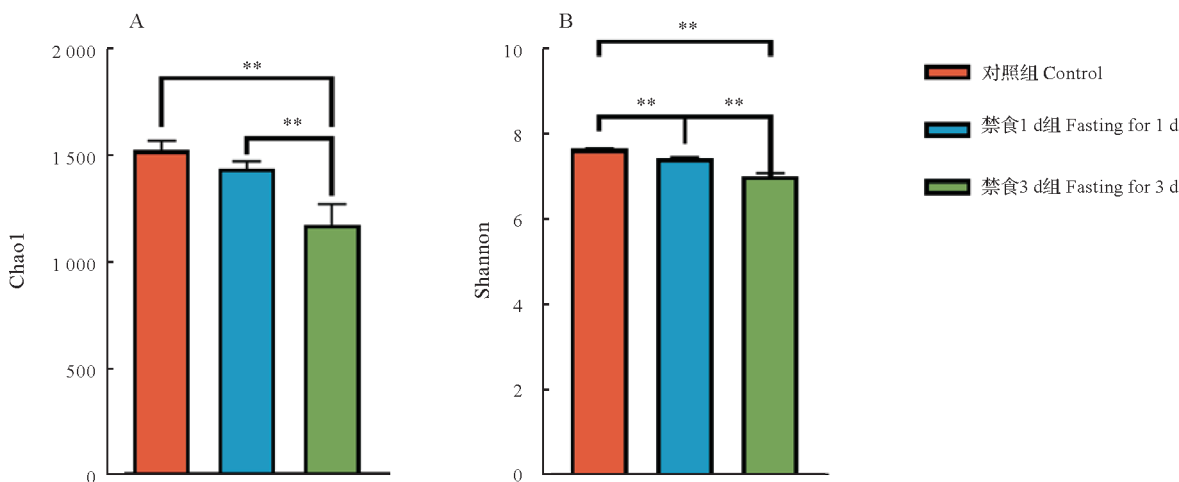


图 8 蛋鸡禁食前后肠道菌群 α 多样性 Chao1(A)和 Shannon(B)指数分析

Fig.8 Chao1(A)and Shannon(B)index analysis of alpha diversity of intestinal microbiota of laying hens before and after fasting

2.2.4 肠道菌群组成结构

图 10 展示了不同组之间肠道菌群结构的差异。在门水平上,3 组的优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes)。对菌群结构占比最高的几个菌门进行比较,禁食 3 d 后,Firmicutes 相对丰度比对照组极显著($P<0.01$)降低,脱硫菌门(Desulfobacterota)和变形菌门(Proteobacteria)相对丰度比对照组极显著($P<0.01$)升高。而 Bacteroidota 禁食 1 d 后极显著($P<0.01$)升高,禁食 3 d 后与对照组无显著差异。

在属水平上,与对照组相比,优势菌群拟杆菌属(*Bacteroides*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus_torques_group*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)在禁食 3 d 后均极显著($P<0.01$)升高。而理研菌科 RC9 肠道群属(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)禁食 1 d 后与对照组相比极显著($P<0.01$)升高,禁食 3 d 后则无显著差异。

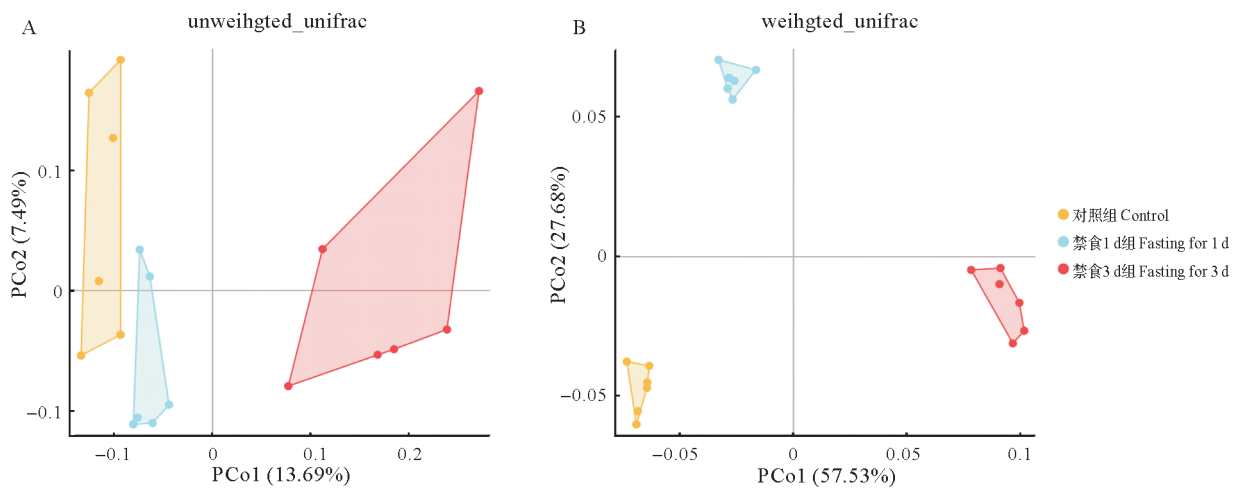


图9 基于未加权unifrac距离(A)与加权unifrac距离PCoA(B)蛋鸡禁食前后肠道菌群β多样性分析
Fig.9 β diversity analysis of intestinal microbiota of laying hens before and after fasting based on unweighted(A) and weighted(B)unifrac PCoA

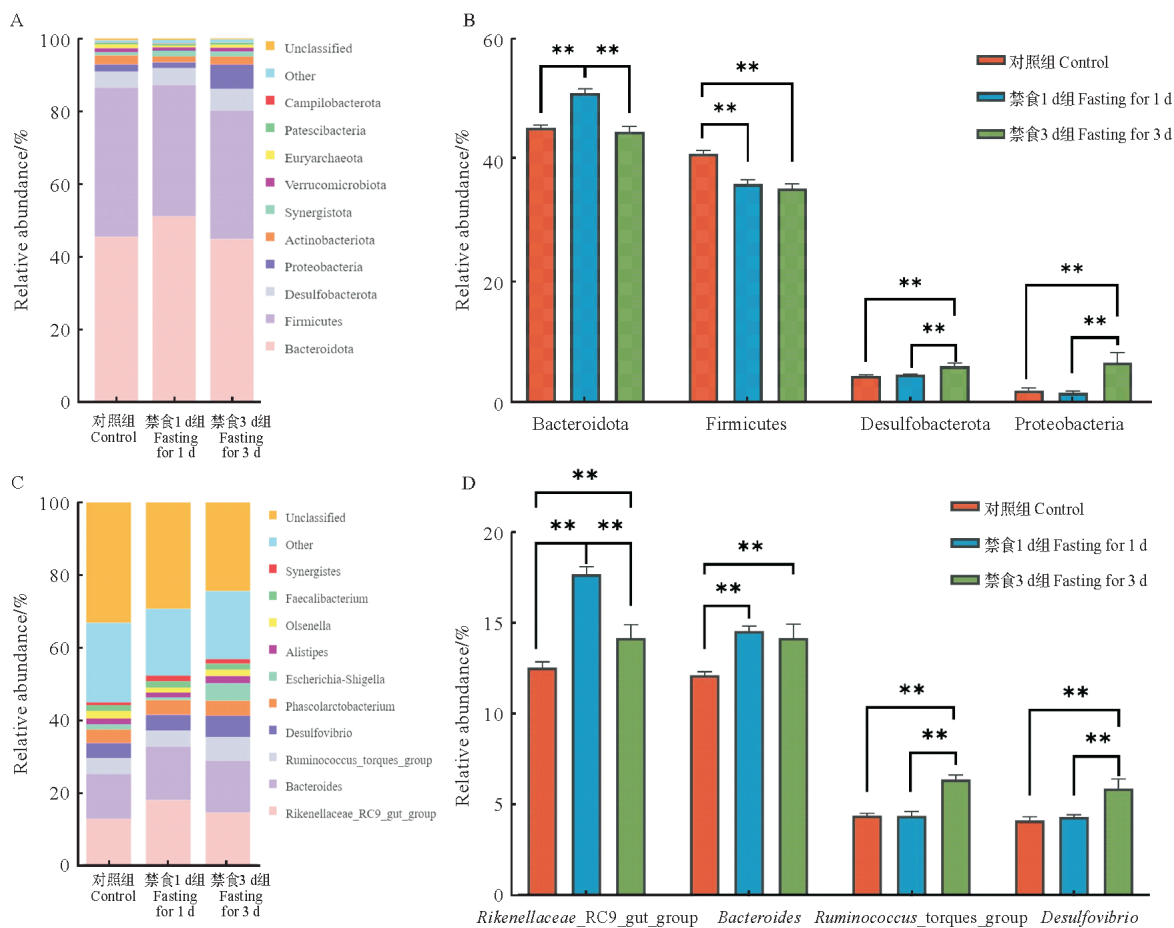


图10 蛋鸡禁食前后肠道菌群在门水平(A、B)和属水平(C、D)上的相对丰度
Fig.10 Relative abundance of gut microbiota at the phylum level(A, B)and genus level(C, D) in intestinal microbiota of laying hens before and after fasting

2.3 蛋鸡禁食前后代谢组学与肠道菌群联合分析

为进一步探索肠道菌群和代谢物之间可能存在的功能关系,对属水平上存在组间差异的优势菌群与趋势分析中筛选出的差异代谢物进行关联分析。如图 11 所示,除脱氧胆酸和半乳糖醇水平与优势菌群呈负相关外,几乎所有的优势菌属与差异代谢物水平都呈正相关。

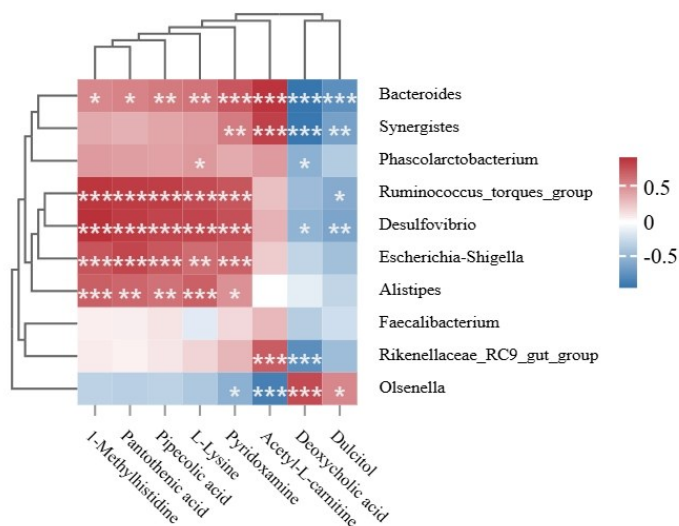


图 11 蛋鸡禁食前后肠道菌群及代谢物联合分析

Fig.11 Combined analysis of intestinal microbiota and metabolites in before and after fasting in laying hens

3 讨 论

3.1 蛋鸡禁食前后代谢组变化

已有大量研究^[19-20]证明,禁食会影响人类和动物的血清代谢物水平。本试验中,禁食同样改变了高产蛋鸡的血清代谢物水平,其中禁食前后蛋鸡血清主要差异显著代谢物包括:1-甲基组氨酸、哌啶酸、L-赖氨酸、泛酸、吡哆胺、脱氧胆酸、半乳糖醇及乙酰左旋肉碱。1-甲基组氨酸、哌啶酸、L-赖氨酸、泛酸和吡哆胺均为 profile7 中富集的代谢物。1-甲基组氨酸是由 S-腺苷酰甲硫氨酸的甲基转移到组氨酸上生成的,且作为鹅肌肽(anserine,β-丙氨酰-1-甲基组氨酸)的前体物质大量存在于肌肉中,它能反映动物机体肌肉蛋白质的分解速率^[21-22]。在以往研究中,1-甲基组氨酸常被描述为不同蛋白质饮食中特定氨基酸供应过多或过少的敏感指标^[23]。与先前的研究^[19-20]结果一致,本试验中 1-甲基组氨酸水平呈上升规律,表明蛋鸡的肌肉蛋白质发生分解,且随着禁食天数增加,蛋白质分解随之增加。

哌啶酸是赖氨酸分解代谢的非蛋白质产物,参与动物机体多种代谢活动^[24]。禁食后,血清中哌啶酸的浓度不断升高,说明赖氨酸代谢水平升高^[25-26]。但在哌啶酸水平升高的同时,赖氨酸水平也呈上升状态。赖氨酸的代谢特点与其他氨基酸不同,它存在延迟补充效应,赖氨酸在刚进入动物体内时不会被快速的分解代谢,而要经过一段时间才会被动用^[27-28]。在禁食条件下,赖氨酸和哌啶酸在小鼠大脑中都增加,哌啶酸形成途径是小鼠和大鼠赖氨酸分解代谢的重要途径,该途径可能在大脑中发挥最积极的作用^[29]。本试验赖氨酸和哌啶酸水平均呈上升状态,与上述研究结果相似,但在动物全身范围内,赖氨酸分解代谢有两条途径:哌啶酸途径和糖精碱途径,说明在禁食条件下,家禽可能偏好于哌啶酸途径进行赖氨酸代谢,但具体机制还需进一步探究。

泛酸又名维生素 B5,属于水溶性 B 族维生素。泛酸的活性形式辅酶 A(CoA)是线粒体有氧呼吸和细胞能量产生中必不可少的辅酶,它在柠檬酸循环、电子传递链和三磷酸腺苷(ATP)的形成中发挥直接作用^[30]。泛酸缺乏的动物无法维持正常的糖原储存,也使肝脏总 CoA 水平降低,但禁食和运动状态均有正常的生酮反应,可提供所需能量^[31]。Saravanan 等^[32]的研究表明,禁食状态下小鼠的大脑、晶状体和视网膜中的泛酸水平上调。禁食 1 d 后,动物血糖水平降低,禁食 3 d 后,糖原储备减少,血糖水平低下,此时泛酸水平逐渐增加,CoA 生成增多,生酮反应增加,动物机体可优先利用酮体以节约葡萄糖^[33]。吡哆胺是维生素 B6 的 3 种天然形式之一,它是维生素 B6 依赖性酶催化转氨反应的关键瞬时中间体^[34]。同时,吡哆胺是晚期糖基化终产物,在禁食期间持续上调,可调节禁食产生的氧化应激和代谢紊乱^[35-36]。

除 Profile7 中差异代谢物,其他趋势中代谢物水平变化也与禁食显著相关。Profile6 中,蛋鸡血清乙

酰左旋肉碱水平在禁食后显著升高,与 Yamaguti 等^[37]的研究结果一致。乙酰左旋肉碱可运送脂肪酸至线粒体以维持机体能量水平,禁食后动物机体脂肪酸氧化增强,所需的乙酰左旋肉碱水平随之增强^[38-39]。与此同时,profile0 中半乳糖醇水平在禁食后显著降低。半乳糖醇与葡萄糖均为半乳糖代谢产物,由于禁食期间循环葡萄糖减少且脂肪酸成为主要能量来源,半乳糖醇产生减少,且有研究表明半乳糖醇减少可能是动物机体发生生酮反应的标志^[40]。脱氧胆酸是一种次级胆汁酸,最新研究发现胆汁酸可能通过激活胆汁酸受体在禁食期间触发饱腹感^[41]。亦有研究^[42]证明,禁食后,动物血清中脱氧胆酸水平会降低,与本试验结果一致。

3.2 蛋鸡禁食前后肠道菌群变化

肠道菌群与宿主和谐共存,参与营养物质的消化、吸收及全身代谢^[43]。肠道菌群由各种低丰度或高丰度的细菌组成,这些细菌与宿主共同进化,当宿主为肠道菌群提供营养和合适的生存场所时,肠道菌群以更高效的方式帮助宿主吸收营养^[44]。研究^[3]表明,禁食会显著改变肠道微生物群。本试验阐述禁食后蛋鸡肠道菌群变化的结果显示,与对照组相比,禁食 1 d 和 3 d 的蛋鸡肠道菌群 Chao1 及 Shannon 指数均呈下降趋势,说明禁食显著降低了肠道菌群物种多样性。过去有研究^[45]证明,禁食期间的鸡由于缺乏肠道菌群,产热量增加。Muramatsu 等^[46]研究发现,在禁食期间,肠道菌群会减少能量损耗而有益于鸡,当提供膳食能量时,肠道微生物群会降低能量利用效率。本试验结果符合上述报道,禁食 1 d 和 3 d 相对于对照组肠道菌群减少,有益于能量的利用,可在无外界能量摄入时维持动物机体代谢稳态。

除肠道菌群数量变化之外,禁食后蛋鸡的肠道菌群结构也发生了改变。在门水平上,优势菌门 Bacteroidota 和 Firmicutes 均为有益菌,有研究^[47-48]报道,肠道菌群的组成影响动物机体从饮食中提取能量的高低,且相对瘦的动物肠道中 Bacteroidota 和 Firmicutes 的比值比肥胖动物的低。有研究者^[49]提出 Bacteroidota 比 Firmicutes 能更有效地从食物中提取能量,从而促进更高效的热量吸收和随后的体质量增长。本试验中,Bacteroidota 在禁食 1 d 时丰度最高,Firmicutes 的趋势为持续下降,在对照组中丰度最高。造成这种结果的原因可能是在禁食 1 d 时,肠道菌群需要更高效地从食物中提取能量,而禁食 3 d 时,肠道中已无可提供能量的食物,菌群丰度下降。在属水平上,*Bacteroides* 丰度禁食 3 d 后显著升高,与门水平 Bacteroidota 丰度结果一致。而 *Ruminococcus_torques_group* 和 *Desulfovibrio* 丰度在禁食 1 d 后与对照组相比无显著差异,禁食 3 d 后显著升高。Lyu 等^[50]发现 *Ruminococcus_torques_group* 与番鸭脂肪沉积显著相关,高 *Ruminococcus_torques_group* 丰度的鸭子腹部脂肪百分比往往高于低 *Ruminococcus_torques_group* 丰度的鸭子。另有研究^[51]报道,*Ruminococcus_torques_group* 具有潜在的抗炎特性并参与胆汁酸代谢。因此,*Ruminococcus_torques_group* 和 *Desulfovibrio* 的改变均与动物机体的代谢调控有关。有趣的是,在以往的报道中 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 丰度与饮食中能量、膳食纤维等含量成正比^[52-53]。而本试验中,*Rikenellaceae_RC9_gut_group* 呈先升后降的趋势,可能与 Bacteroidota 所呈现趋势的原因相同,即禁食 1 d 后需更多代谢相关菌群摄取能量,而禁食 3 d 后几乎没有能量可摄取,而具体的原因需要更深入的研究进行探索与阐述。但不管菌群丰度的变化规律如何,其均为稳定动物机体代谢平衡作贡献。

3.3 蛋鸡禁食前后代谢组学与肠道菌群联合分析

代谢组学与肠道菌群联合分析结果显示,除脱氧胆酸和半乳糖醇,几乎所有差异优势菌属与筛选得到的差异代谢物水平均呈正相关,且这些优势菌属的功能和差异代谢物均与能量代谢有关。研究^[46]表明,禽类可以利用通过肠道细菌作用提取的膳食能量,且通过细菌从膳食纤维中提取的能量能被有效用于宿主禽类的生长。有研究^[54]发现,B 族维生素(泛酸、吡哆胺)除从饮食中获得外,肠道微生物群被认为是其潜在来源,赖氨酸代谢同样与宿主肠道的微生物群落有关^[55]。除此之外,胆汁酸库由肠肝循环形成,是肠道微生物群的主要调节因子之一,且脱氧胆酸由分泌到肠道的初级胆汁酸被肠道微生物群去羟基化后形成^[56]。说明在禁食过程中,差异代谢物的产生可能与菌群相关,且二者共同维系动物机体代谢稳态,使之在能量极端缺乏的环境下得以生存。

4 结 论

禁食后蛋鸡肠道菌群结构发生改变,血清中1-甲基组氨酸(1-Methylhistidine)、哌啶酸(Pipecolic acid)、L-赖氨酸(L-Lysine)、泛酸(Pantothenic acid)、吡哆胺(Pyridoxamine)和乙酰左旋肉碱(Acetyl-L-carnitine)等代谢物水平上调,脱氧胆酸(Deoxycholic acid)和半乳糖醇(Dulcitol)等代谢物水平下调,表明禁食后,蛋鸡生酮反应增加、蛋白质分解增强且脂肪酸成为主要能量来源。肠道菌群结构发生的变化与其从饮食中摄取能量的能力有关。除此之外,肠道菌群变化与代谢物的变化存在一定关联,表明二者共同调节蛋鸡禁食诱导的能量紊乱,维持代谢稳态。通过对禁食后代代谢物和肠道菌群变化规律的研究,更深层次地了解家禽在能量缺乏下的代谢机制,能为之后家禽日粮配方的制定及代谢疾病防治等提供理论基础。未来,应进一步探究某一代谢物通过肠道菌群调控能量代谢的具体机制,为动物生产提供新的视角。

参考文献 Reference:

- [1] DÉSSERT C, DUCLOS M J, BLAVY P, et al. Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver[J]. *BMC genomics*, 2008, 9: 611.
- [2] MAUGHAN R J, FALLAH J, COYLE E F. The effects of fasting on metabolism and performance[J]. *British journal of sports medicine*, 2010, 44(7): 490-494.
- [3] SECOR S M, CAREY H V. Integrative physiology of fasting[J]. *Comprehensive physiology*, 2016, 6(2): 773-825.
- [4] ZUKIWSKY N M, AFROUZIYEH M, ROBINSON F E, et al. Broiler growth and efficiency in response to relaxed maternal feed restriction[J]. *Poultry science*, 2021, 100(4): 100993.
- [5] DUREGON E, FERNANDEZ M E, MARTINEZ R J, et al. Prolonged fasting times reap greater geroprotective effects when combined with caloric restriction in adult female mice[J]. *Cell metabolism*, 2023, 35(7): 1179-1194.
- [6] SHAO Y, FU Z, WANG Y, et al. A metabolome atlas of mouse brain on the global metabolic signature dynamics following short-term fasting[J]. *Signal transduction and targeted therapy*, 2023, 8(1): 334.
- [7] 史萃菡, 李绮琪, 隋承融, 等. 持续禁食与恢复采食状态下食欲调控中枢不同核团兴奋性的比较[J]. *江西农业大学学报*, 2022, 44(6): 1488-1497.
- [8] SHI C H, LI Q Q, SUI C R, et al. Comparison of the excitability of different nucleus in appetitive regulatory centers under fasting and refeeding[J]. *Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis*, 2022, 44(6): 1488-1497.
- [9] LI Y, CHU Y, YU L, et al. Transcriptomic analysis of Bama pig's liver in various nutritional states reveals a metabolic difference of fatty acids[J]. *Food & function*, 2017, 8(10): 3480-3490.
- [10] JUHAS U, RECZKOWICZ J, KORTAS J A, et al. Eight-day fasting modulates serum kynurenines in healthy men at rest and after exercise[J]. *Frontiers in endocrinology*, 2024, 15: 1403491.
- [11] PÉREZ-GERDEL T, CAMARGO M, ALVARADO M, et al. Impact of intermittent fasting on the gut microbiota: a systematic review[J]. *Advanced biology*, 2023, 7(8): e2200337.
- [12] TORCHON E, RAY R, HULVER M W, et al. Fasting rapidly increases fatty acid oxidation in white adipose tissue of young broiler chickens[J]. *Adipocyte*, 2017, 6(1): 33-39.
- [13] XU Z, YU Y, ZHAO H, et al. Expression patterns of AMPK and genes associated with lipid metabolism in newly hatched chicks during the metabolic perturbation of fasting and refeeding[J]. *Poultry science*, 2022, 101(12): 102231.
- [14] GILANI S, HOWARTH G S, TRAN C D, et al. Reduced fasting periods increase intestinal permeability in chickens[J]. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 2018, 102(1): 486-492.
- [15] LIU Y, JIAO H, ZHAO J, et al. Research note: effect of fasting time on the fasting heat production, blood metabolites, and body components of layer-type pullets[J]. *Poultry science*, 2024, 103(4): 103557.
- [16] BELO P S, ROMSOS D R, LEVILLE G A. Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken[J]. *Journal of nutrition*, 1976, 106(8): 1135-1143.
- [17] BEAUCLERCQ S, NADAL-DESBARATS L, HENNEQUET-ANTIER C, et al. Relationships between digestive efficiency and metabolomic profiles of serum and intestinal contents in chickens[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 6678.

- [17] 楚玉婷. 基于微生物组学和代谢组学分析 MAPK/ERK 信号通路在鸡坏死性肠炎中的作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- CHU Y T. The role of MAPK/ERK signaling pathway in chicken necrotic enteritis was analyzed based on microbiomics and metabolomics[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
- [18] BECKERS B, OP D BEECK M, THIJS S, et al. Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 650.
- [19] BERMINGHAM K M, MAZIDI M, FRANKS P W, et al. Characterisation of fasting and postprandial NMR metabolites: insights from the ZOE PREDICT 1 study[J]. *Nutrients*, 2023, 15(11): 2638.
- [20] ZHAO R, WANG X, ZHOU X, et al. Metabolites and gene expression in the myocardium of fasting rats in an acute hypoxic environment[J]. *BMC genomics*, 2023, 24(1): 251.
- [21] WANG H, HU P, JIANG J. Measurement of 1- and 3-methylhistidine in human urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Clinica chimica acta*, 2012, 413(1/2): 131-138.
- [22] BLOCK W D, HUBBARD R W, STEELE B F. Excretion of histidine and histidine derivatives by human subjects ingesting protein from different sources[J]. *Journal of nutrition*, 1965, 85: 419-425.
- [23] KAR S K, JANSMAN A, SCHOKKER D, et al. Amine metabolism is influenced by dietary protein source[J]. *Frontiers in nutrition*, 2017, 4: 41.
- [24] WANG C, LIU R, LIM G H, et al. Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals[J]. *Science advances*, 2018, 4(5): 1-11.
- [25] KAWASAKI H, HORI T, NAKAJIMA M, et al. Plasma levels of pipecolic acid in patients with chronic liver disease[J]. *Hepatology*, 1988, 8(2): 286-289.
- [26] SINGH I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease[J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 1997, 167(1/2): 1-29.
- [27] BENEVENGA N J, BLEMMINGS K P. Unique aspects of lysine nutrition and metabolism[J]. *Journal of nutrition*, 2007, 137(Sup6): 1610-1615.
- [28] OUSTERHOUT L E. Survival time and biochemical changes in chicks fed diets lacking different essential amino acids[J]. *Journal of nutrition*, 1960, 70: 226-234.
- [29] MURTHY S N, JANARDANASARMA M K. Identification of L-amino acid/L-lysine alpha-amino oxidase in mouse brain[J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 1999, 197(1/2): 13-23.
- [30] KENNEDY D O. B Vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy-a review[J]. *Nutrients*, 2016, 8(2): 68.
- [31] SMITH C M, NARROW C M, KENDRICK Z V, et al. The effect of pantothenate deficiency in mice on their metabolic response to fast and exercise[J]. *Metabolism*, 1987, 36(2): 115-121.
- [32] SARAVANAN M, XU R, ROBY O, et al. Tissue-specific sex difference in mouse eye and brain metabolome under fed and fasted states[J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2023, 64(3): 18.
- [33] REIBEL D K, WYSE B W, BERKICH D A, et al. Regulation of coenzyme A synthesis in heart muscle: effects of diabetes and fasting[J]. *The American journal of physiology*, 1981, 240(4): 606-611.
- [34] VOZIYAN P A, HUDSON B G. Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor[J]. *Annals of the New York academy of sciences*, 2005, 1043: 807-816.
- [35] PEREIRA E, SILVARES R R, FLORES E E I, et al. Pyridoxamine improves metabolic and microcirculatory complications associated with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Microcirculation*, 2020, 27(3): e12603.
- [36] PAWAR R, CHAUDHRAN P, PANDEY D, et al. Chemical modifications of pyridoxine for biological applications: an overview[J]. *Current topics in medicinal chemistry*, 2023, 23(2): 98-113.
- [37] YAMAGUTI K, KURATSUNE H, WATANABE Y, et al. Acylcarnitine metabolism during fasting and after refeeding[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1996, 225(3): 740-746.
- [38] ODO S, TANABE K, YOHDA M, et al. Liver-oriented acute metabolic effects of a low dose of L-carnitine under fat-mobilizing conditions: pilot human clinical trial[J]. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 2020, 66(2): 136-149.
- [39] RUPPERT P M M, KERSTEN S. Mechanisms of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis during fasting[J]. *Trends in endocrinology and metabolism*, 2024, 35(2): 107-124.

- [40] WASHBURN R L, COX J E, MUHLESTEIN J B, et al. Pilot study of novel intermittent fasting effects on metabolomic and trimethylamine N-oxide changes during 24-hour water-only fasting in the FEELGOOD trial[J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 246.
- [41] PERINO A, VELÁZQUEZ-VILLEGAS L A, BRESCIANI N, et al. Central anorexigenic actions of bile acids are mediated by TGR5[J]. *Nature metabolism*, 2021, 3(5): 595-603.
- [42] HALMY L, FEHER T, STECZEK K, et al. High serum bile acid level in obesity: its decrease during and after total fasting[J]. *Acta medica hungaricae*, 1986, 43(1): 55-58.
- [43] ALBHAISI S, BAJAJ J S, SANYAL A J. Role of gut microbiota in liver disease[J]. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 2020, 318(1): 84-98.
- [44] GUO X, OKPARA E S, HU W, et al. Interactive relationships between intestinal flora and bile acids[J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(15): 8343.
- [45] MURAMATSU T, NAKAJIMA S, FURUSE M, et al. Influence of the gut microflora on fasting heat production in chicks[J]. *British poultry science*, 1988, 29(2): 301-309.
- [46] MURAMATSU T, NAKAJIMA S, OKUMURA J. Modification of energy metabolism by the presence of the gut microflora in the chicken[J]. *British journal of nutrition*, 1994, 71(5): 709-717.
- [47] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [48] BÄCKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [49] KRAJMALNIK-BROWN R, ILHAN Z E, KANG D W, et al. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation[J]. *Nutrition in clinical practice*, 2012, 27(2): 201-214.
- [50] LYU W, LIU X, LU L, et al. Cecal microbiota modulates fat deposition in muscovy ducks[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2021, 8: 609348.
- [51] ZHANG M, MO R, WANG H, et al. Grape seed proanthocyanidin improves intestinal inflammation in canine through regulating gut microbiota and bile acid compositions[J]. *The FASEB journal*, 2023, 37(12): e23285.
- [52] WANG B, KONG Q, LI X, et al. A high-fat diet increases gut microbiota biodiversity and energy expenditure due to nutrient difference[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3197.
- [53] QIU M, HU J, PENG H, et al. Research note: the gut microbiota varies with dietary fiber levels in broilers[J]. *Poultry science*, 2022, 101(7): 101922.
- [54] PETERSON C T, RODIONOV D A, OSTERMAN A L, et al. B vitamins and their role in immune regulation and cancer[J]. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3380.
- [55] MCCANN J R, RAWLS J F. Essential amino acid metabolites as chemical mediators of host-microbe interaction in the gut[J]. *Annual review of microbiology*, 2023, 77: 479-497.
- [56] AN C, CHON H, KU W, et al. Bile acids: major regulator of the gut microbiome[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1792.