

添加抗生素對肉雞腸道免疫之影響⁽¹⁾

洪靖崎⁽²⁾ 陳保基⁽³⁾ 陳靜宜⁽³⁾ 朱盈安⁽³⁾ 黃懿儂⁽³⁾ 許晉賓⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：111 年 8 月 18 日；接受日期：112 年 3 月 9 日

摘 要

本試驗探討飼糧中添加不同抗生素對肉雞腸道免疫能力之影響。使用 192 隻 1 日齡愛拔益加肉雞，隨機分為對照組 (control)、枯草菌素 (bacitracin) 55 ppm、六肽黴素 (nisiheptide) 2.5 ppm 及羥四環黴素 (oxytetracycline, OTC) 55 ppm 共四組。於 3 週與 6 週時，進行腸道免疫之測定。結果顯示在腸道免疫功能上，利用西方點墨方法發現，3 週齡雞隻迴腸的溶菌酶含量在六肽黴素組中較對照組為低 ($P < 0.05$)，枯草菌素及羥四環黴素處理組則與對照組無顯著差異。添加三種抗生素對雞隻迴腸中 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體 ($\gamma\delta$ T cell receptor) 的含量及脾臟淋巴球增生反應無顯著影響。添加六肽黴素組於 6 週齡時，顯著減少血液中 IgA 含量 ($P < 0.05$)，對枯草菌素及羥四環黴素則無顯著影響。添加三種抗生素對 3 與 6 週齡雞隻血液中 IgG 與 IgM 與對照組相比無顯著影響。綜上所述，不同的抗生素對於免疫調控模式可能不一致，雞隻飼糧添加六肽黴素可能通過改變溶菌酶及 IgA 來調節雞隻的免疫反應，因飼糧中可添加抗生素種類業已限縮，應積極開發具類似抑菌功能之飼料添加物以替代抗生素。

關鍵詞：抗生素、肉雞、腸道免疫、T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體。

緒 言

抗生素於家畜禽產業用於治療疾病、促進生長及降低死亡率。然而，抗生素殘留或抗生素耐藥病原體可能是由於在飼料中使用抗生素生長促進劑 (antibiotic growth promoters, AGPs) 造成的。歐盟已禁止使用抗生素促進生長 (EC, 2003)，進而促使業者積極尋找替代抗生素的飼料添加物，因此，如果要減少家禽生產中對抗生素的依賴，就必須瞭解抗生素對雞隻的作用機制，以作為抗生素替代物質研發之參考。

抗生素抑制亞臨床感染並減少炎症，進而降低免疫系統的代謝成本 (Niewold, 2007; Buret, 2010)。目前仍然未能完全瞭解飼料添加抗生素之作用機制，但推測與雞隻免疫反應有關，Al-Ankari and Homeida (1996) 指出添加 50 ppm 羥四環黴素 (oxytetracycline)，降低華氏囊及胸腺重，抑制血漿中溶菌酶的活性，並減少血液、脾臟中的白血球及 IL-2-dependent T cell blasts 數目，產生免疫抑制之效果。Nikolov *et al.* (1966b) 指出了氯四環素 (chlortetracycline)、羥四環黴素、四環素 (tetracycline) 抑制脾細胞中的抗體形成 (Gottlieb and Shaw, 1967)。Baba *et al.* (1998a, b) 則指出餵飼 140 ppm 泰黴素 (tylosin) 於 4 週齡來航蛋雞，顯著促進脾臟淋巴細胞增生，增加綿羊紅血球及 brucella abortus 的抗體力價，同時也會增加抗體生成細胞的數目，對免疫能力有促進之效果，但其添加劑量遠超過促進生長用之劑量。

促進生長用之抗生素，大多添加於飼料中口服或飲水，對腸道黏膜免疫可能具有直接的影響。因此，本研究選擇了家禽養殖使用之三種抗生素。枯草菌素、六肽黴素及羥四環黴素具有不同的抗菌圖譜，它們通常用於治療呼吸道、腸道細菌性下痢及促進生長，並促進家畜禽業的發展 (Diarra and Malouin, 2014)。評估雞隻飼糧中添加生長促進用之劑量，探討對腸道免疫、體液性免疫及細胞性免疫的影響。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2739 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 國立臺灣大學動物科學技術系。

(4) 通訊作者，E-mail: cbhsu@mail.tlri.gov.tw。

材料與方法

I. 試驗動物與飼養管理

自商業孵化場購入日齡白肉雞 192 隻，逢機分為四組，分別為對照組 (control, CON)、枯草菌素 (bacitracin) 添加組 (55 ppm)、六肽黴素 (nisiheptide, NHT) 添加組 (2.5 ppm) 與羥四環黴素 (oxytetracycline, OTC) 添加組 (55 ppm) 等處理組，公母混飼，每處理組 4 重複，每重複 12 隻，試驗為期六週，試驗期間飲水與飼料皆任飼，飼糧組成如表 1。所有實驗動物程序均經國立臺灣大學實驗動物管理與使用委員會批准，並符合 96 年含藥物飼料添加物使用規範。

表 1. 飼料組成分

Table 1. Composition of basal diets

Ingredients	0 – 3 wk	3 – 6 wk
	----- % -----	
	48.70	57.30
Soybean meal, 44%	34.88	29.64
Fish meal, 65%	5.00	2.80
Soybean oil	7.65	6.40
Dicalcium phosphate	1.10	1.38
Calcium carbonate	1.30	1.31
DL-methionine	0.30	0.32
Choline-chloride, 50%	0.07	0.05
Vitamin premix ^a	0.30	0.30
Mineral premix ^b	0.20	0.20
Salt	0.50	0.30
Total	100	100
Calculated analysis		
Crude protein, %	23.00	20.05
ME, kcal/kg	3,202	3,205
Calcium, %	1.03	1.00
Available phosphorus, %	0.46	0.45

^a Vitamin premix supplied per kilogram of diet: Vitamin A, 12,000 IU; Vitamin D₃, 3,125 ICU; Vitamin E, 37.5 IU; Vitamin K₃, 6.25 mg; Vitamin B₁, 3.75 mg; Vitamin B₂, 12.5 mg; Vitamin B₆, 10.0 mg; Ca-pantothenate, 18.8 mg; Niacin, 50 mg; Biotin, 0.06 mg; Folic acid, 1.25 mg; Vitamin B₁₂, 0.05 mg.

^b Mineral premix supplied per kilogram of diet: Cu (CuSO₄ · 5H₂O, 25.45% Cu), 6 mg; Fe (FeSO₄ · 7H₂O, 20.09% Fe), 50 mg; Mn (MnSO₄ · H₂O, 32.49% Mn), 40 mg; Zn (ZnO, 80.35% Zn), 60 mg; Se (NaSeO₃, 45.56% Se), 0.075 mg.

II. 樣品收集

試驗進行分別於第 21 天和第 42 天，每個處理組隨機選擇 8 隻雞進行安樂死。用無菌剪刀取出脾臟進行淋巴細胞增殖分析。於第 21 天取雞隻遠端迴腸 (迴盲腸交界處往迴腸方向 3 公分處取樣 3 公分之迴腸) 進行 T 細胞受體 $\gamma\delta$ (T cell receptor $\gamma\delta$, TCR $\gamma\delta$) 和溶菌酶 (lysozyme) 測定。在第 21 天和第 42 天每個處理組隨機選擇 8 隻雞，收集血液至到肝素化的真空採血管 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) 中，並在 4°C 下以 3,000 × g 離心 10 分鐘。血液樣品儲存在 -80°C 直到免疫球蛋白及淋巴球增生分析。

III. 測定項目及方法

(i) 腸道上皮內 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體 ($\gamma\delta$ T cell receptor, TCR $\gamma\delta$) 及溶菌酶分析

依據 Kirsch *et al.* (2000) 方法，於第 21 天取雞隻迴腸末端，縱向剪開腸道後，洗去管腔中的食糜，置於 1.5 mL 離心管中，放入液態氮中急速冷凍，置於 -80°C 儲存，以西方點墨法分析迴腸上皮內淋巴細胞 T $\gamma\delta$ 受器和溶菌酶含量。

1. SDS- 聚丙烯胺凝膠電泳法 (SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)

利用 SDS- 聚丙烯胺凝膠電泳法進行腸道上皮內 TCR $\gamma\delta$ 淋巴細胞受器及溶菌酶。先製備下層凝膠，依序加入 2.4 mL 二次水、2.5 mL 1.5M Tris pH 8.8、5 mL 29% acrylamide-bis-acrylamide、0.1 mL 10% 十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)、0.05 mL 10% 過硫酸銨 (ammonium persulfate, sigma)、5 μ L 四甲基乙二胺混合均勻後，緩緩加入 1.0 mm 厚度的 Bio-Rad (USA) 直立式電泳膠臺座中，加到約距膠臺頂端 2 公分處，緩慢加入水以壓平下膠，於靜置約 30 分鐘後，開始製備 4% 層凝膠，依序加入 6.1 mL 二次水、2.5 mL 0.5 M Tris pH 6.8、1.3 mL 29% acrylamide-bis acrylamide、0.1 mL 10% SDS、10 μ L 四甲基乙二胺混合均勻後，緩緩加入已插入 1.0 mm 厚度的梳狀版，靜置約 30 分鐘後待凝固小心取出梳狀膠片，之後將樣品蛋白溶液定量為 5 mg/mL 後，以 95°C 加熱 5 分鐘，再立即放入冰上冷卻，避免蛋白結構再度恢復。再取 1:1 的蛋白質樣品比電泳指示劑 (loading dye) 混合後，每個 well 加入濃度為 37.5 μ g/mL 之樣品，以 65 伏特電壓分析電泳 30 分鐘使樣品集聚於上下膠之交界處，再改以 100 伏特分析電泳 1 小時。

2. SDS-PAGE 的轉漬及抗體偵測

準備聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜，用甲醇浸潤一下約 15 秒，再改以二次水清洗 10 分鐘。將分析完畢的電泳片小心取下，同時在電泳片的上下各平鋪上 2 張的 3M 濾紙，一起浸泡在緩衝液中約 1 分鐘，利用濕式轉漬器 (Transfer, Bio-Rad, USA) 以 100 mV 的條件下進行 60 分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到 PVDF 膜。將轉漬完成的 PVDF 膜浸泡在含有 5% 脫脂奶粉的 1X Tris 緩衝鹽水 (Tris-buffered saline, TBS) 中，於室溫下搖晃 1 小時，進行 blocking 1 小時，加入一級抗體 TCR $\gamma\delta$ (mouse monoclonal antibody, Santa Cruz, USA) 或 Rabbit polyclonal to lysozyme (abcam, UK)，於 4°C 下 60 rpm 搖晃一個晚上，次日取出轉漬膜，以 1X TBS buffer 在室溫下清洗 4 次，分別為 15 分鐘一次及 5 分鐘 3 次。再加入二級抗體 anti-mouse IgG-HRP (sigma) 或 anti-rabbit IgG-HRP (Cell signaling, USA)，於室溫下搖晃一小時，重覆清洗步驟後。加入呈色劑將催化 HRP，偵測影像，並使用 Gel Doc MultiImager 軟體 (Bio-Rad, USA) 來偵測條帶密度。

(ii) 脾臟淋巴細胞增生反應

當抗原進入人體，淋巴細胞會與其專一性抗原結合而被活化，產生增殖反應。因此，淋巴細胞的增殖能力，可作為檢視淋巴細胞功能的指標之一；T 淋巴細胞及 B 淋巴細胞可被不同的 mitogens 活化，其中 concanavalin A (Con A)，可刺激 T 淋巴細胞分裂增生，而 lipopolysaccharide (LPS)，可刺激 B 淋巴細胞分裂生長。本試驗依據 Shan *et al.* (2007) 方法進行淋巴細胞增生反應分析。

(iii) 血液免疫球蛋白濃度測定

利用酵素聯結免疫附著套組測定 (ELISA Quantitation Kit; E30-103, E30-102, E30-104)，購自 Bethyl Laboratories Inc. (USA)。依據 Bartell and Batal (2007) 方法進行雞隻血漿中免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 及免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 之測定。

IV. 統計分析

實驗所獲得之資料使用 SAS 統計分析軟體 (Statistical Analysis System, Ver. 9.1.3 for Windows, XP) (SAS Institute, 2003)，以一般線性模式 (GLM, General Linear Models Procedure) 進行變方分析，再以鄧肯氏新多變域測定法 (Duncan's new multiple range test)，進行平均值比較，檢測其差異之顯著性。資料皆以平均值 \pm 標準偏差表示。

結果與討論

I. 抗生素對腸道上皮內 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體 (TCR $\gamma\delta$) 及溶菌酶的影響

在腸道免疫功能結果顯示，利用西方點墨方法發現，三組抗生素處理對於迴腸中 TCR $\gamma\delta$ 皆無顯著影響 (圖 1)。三週齡雞隻迴腸的溶菌酶含量在六肽黴素組中顯著較對照組低 ($P < 0.05$)，而枯草菌素及經四環黴素與對照組無顯著影響 (圖 2)。

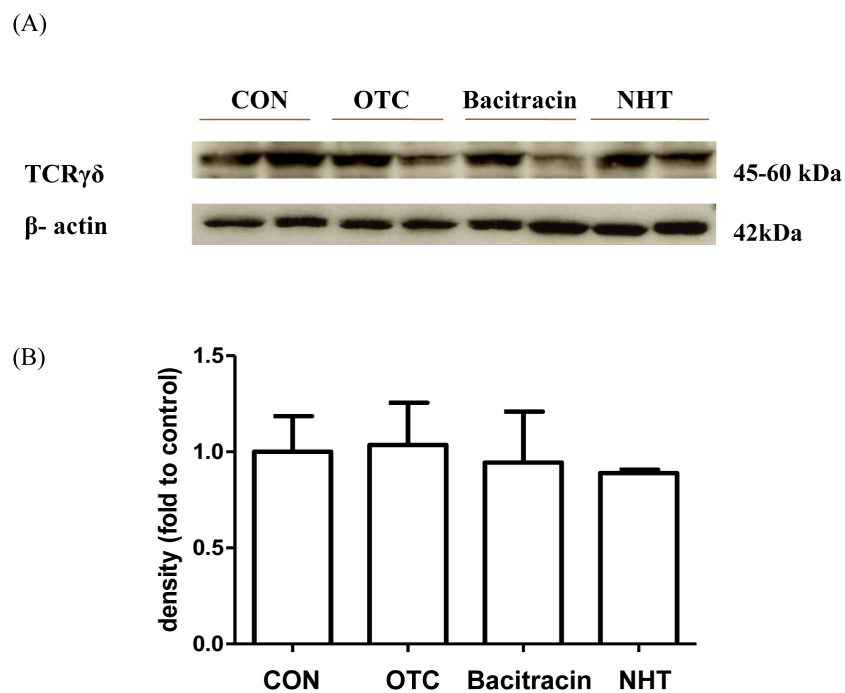


圖 1. 添加抗生素對 3 週齡雞隻迴腸 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 之影響。(A) 西方點墨法分析迴腸上皮內 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體總量 (B) 迴腸內 T 淋巴細胞 $\gamma\delta$ 受體定量分析。(n = 8)。

Fig. 1. Effect of dietary antibiotic supplement on T cell receptor $\gamma\delta$ in ileum of broiler at 3 weeks of age. (A) T cell receptor $\gamma\delta$ level; (B) Densitometry assay of T cell receptor $\gamma\delta$ level. CON, control; OTC, oxytetracycline; NHT, nosiheptide.

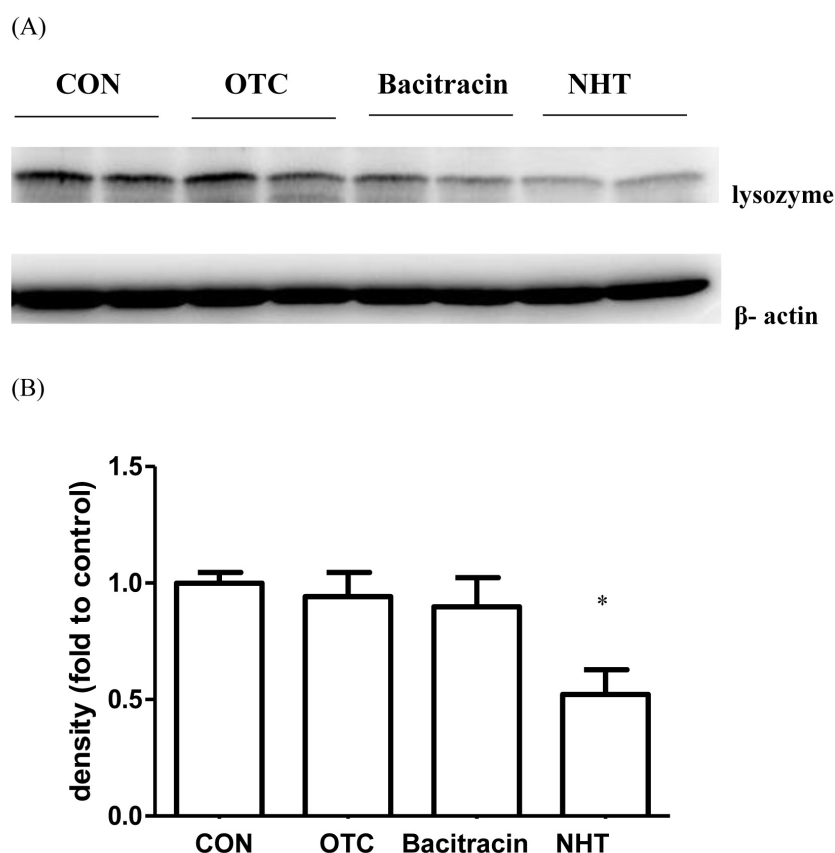


圖 2. 添加抗生素對 3 週齡雞隻迴腸溶菌酶之影響 (A) 西方點墨法分析迴腸溶菌酶含量 (B) 西方點墨法分析迴腸溶菌酶定量分析。(n = 8)。

Fig. 2. Effect of dietary antibiotic supplement on lysozyme in ileum of broiler at 3 weeks of age. (A) antimicrobial lysozyme level; (B) Densitometry assay of antimicrobial lysozyme level. *P < 0.05. CON, control; OTC, oxytetracycline; NHT, nosiheptide.

腸道健康對於家禽和牲畜的生長、整體健康和福利至關重要，而腸道免疫調節在維持腸道健康提供重要的角色 (Ducatelle *et al.*, 2018)。T 細胞表面存在許多標記， $\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ T cells) 表面的 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 是由 γ 鏈和 δ 鏈組成的異二聚體 (TCR $\gamma\delta$)，主要分佈於腸道、呼吸道以及泌尿生殖道等黏膜和皮下組織，是構成腸道黏膜組織上皮內淋巴細胞 (intraepithelial lymphocyte, IEL) 的主要成分之一 (Ma *et al.*, 2021)。產生細胞毒性是 $\gamma\delta$ T 細胞的主要免疫作用 (Oliveres-Villagómez and Van Kaer, 2018)，研究顯示雞隻感染產氣莢膜梭菌、沙門氏菌和艾美球菌， $\gamma\delta$ T 細胞會增加來提升免疫反應 (Choi and Lillehoj, 2000; Sarson *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2010)。抗生素如第二代頭孢子素 (cefexitin) 或恩氟奎林羧酸 (enrofloxacin) 通過增加盲腸中的 $\gamma\delta$ T 細胞數量來提升免疫調節功能 (Strzēpa *et al.*, 2017)。Lee *et al.* (2012) 指出沙利黴素 (salinomycin) 誘導肉雞腸道和脾臟中 $\gamma\delta$ T 細胞產生白細胞介素 17F (interleukin 17F) 的表達，在啟動炎症反應、調節中性顆粒細胞和單核細胞的擴增與募集中起著重要的作用 (Cua and Tato, 2010; Pantelyushin *et al.*, 2012)。於健康動物，免疫系統所耗費的能量佔基礎代謝能的 1 – 3% (Romanyukha *et al.*, 2006)。Martin *et al.* (2003) 指出免疫活動在代謝上是昂貴的。Demas *et al.* (1997) 指出使用鎖孔帽貝血藍素 (Keyhole Limpet Hemocyanin) 進行免疫挑戰的小鼠，使將靜態代謝率 (Resting Metabolic Rate) 增加了 27%，這表明免疫活化增加了能量需求。抗生素具有抗發炎作用 (Matzneller *et al.*, 2017)，亞治療劑量 (subtherapeutic) 的黏菌 (colistin) 和泰黴素藉由降低仔豬 B 淋巴細胞和 CD4⁺ CD8⁺ T 細胞的百分比，並通過脂多糖 (lipopolysaccharide) 感染上調細胞因子來調節免疫反應 (Er *et al.*, 2010; Mazutti *et al.*, 2016)。本試驗研究顯示 TCR $\gamma\delta$ 的總量在抗生素處理組與對照組間無顯著差異 (圖 1)，顯示三種抗生素添加，不會誘導 $\gamma\delta$ T 細胞大量產生，間接減少後續免疫調控所消耗之代謝成本。

溶菌酶被認為是先天免疫系統的重要防禦分子，能有效地水解細菌細胞壁的肽聚糖 (Ferraboschi *et al.*, 2021)。研究指出四環素 (tetracycline)、氯四環黴素 (chlortetracycline) 和羧四環黴素可以結合溶菌酶裂隙 (cleft) 並與活性位置 (active site) 相互作用，導致溶菌酶活性產生競爭性抑制 (Chi and Liu, 2012)。我們的研究顯示，添加羧四環黴素及枯草菌素對 3 週齡雞隻未影響迴腸溶菌酶活性 (圖 2)，這與 Long *et al.* (2016) 的研究一致，但是在六肽黴素組雞隻迴腸的溶菌酶較對照組顯著降低 (圖 2)，同時我們亦發現六肽黴素處理組對 3 週齡雞隻腸道大腸桿菌有增加之趨勢 (六肽黴素組 $7.06 \pm 0.47 \log \text{cfu/g}$ vs. 對照組 $6.49 \pm 0.28 \log \text{cfu/g}$, $P = 0.91$) (未發表)。溶菌酶是 1, 4- β -N-乙酰胞壁質酶 (1, 4- β -N-acetylmuramidase)，可裂解革蘭氏陽性細菌 (gram-positive bacteria) 細胞壁中肽聚糖間的糖苷鍵 (glycosidic) (Arabski *et al.*, 2015)，Huang *et al.* (2018) 指出溶菌酶對革蘭氏陰性菌 (gram-negative bacteria) 細胞壁的破壞不如革蘭氏陽性菌嚴重。推測六肽黴素添加，無法利用溶菌酶來抑制大腸桿菌增生，需要進一步的研究來了解溶菌酶與不同細菌抗菌作用的相關性。

II. 抗生素對脾臟淋巴細胞增生及血液免疫球蛋白的影響

飼糧添加三種抗生素處理不影響 3 及 6 週齡雞隻以 Con A 或以 LPS 刺激脾臟之淋巴細胞之增生反應 (表 2)。添加六肽黴素組於 6 週齡時，顯著減少血液中 IgA 含量，但對枯草菌素及羧四環黴素無顯著影響，添加三種抗生素不影響 3 及 6 週齡雞隻血液中 IgG 及 IgM。

淋巴細胞的增殖能力，可作為檢視淋巴細胞功能的指標之一，飼糧中添加抗生素對血液淋巴球增生之影響如表 2，抗生素處理組對於由 Con A 所刺激 T 淋巴細胞之增生，或由 LPS 所刺激 B 淋巴細胞皆無顯著之影響，表示此三種不同的抗生素對於 B 及 T 淋巴球之增生，無促進或抑制之作用。Al-Ankari and Homeida (1996) 指出添加 50 ppm 羧四環黴素，會減少血液、脾臟中的白血球及 IL-2-dependent T cell blasts 數目，Nikolov *et al.* (1966a) 也指出氯四環黴素、羧四環黴素和四環素都能抑制脾臟細胞的抗體形成，推測雞隻飼糧中羧四環黴素抗生素的添加，似乎會抑制免疫功能。本試驗結果顯示，羧四環黴素添加於肉雞飼料中，並不會影響由 Con A 或 LPS 所刺激之 B 淋巴細胞及 T 淋巴細胞增生。

雞隻的血漿免疫球蛋白水平顯示了對抗各種感染的抗體產生。免疫球蛋白分為 5 類，其中 IgG、IgM 和 IgA 主要代表宿主的體液免疫反應 (Salim *et al.*, 2013)。IgA 是腸黏膜中抵禦病原體的主要保護工具，防止病原菌貼附於腸道上皮細胞，具有中和毒性之作用 (Heller and Duchmann, 2003)，無菌動物的固有層 IgA 陽性細胞和腸道 IgA 水平均顯著降低，證明腸道微生物群在其調節中的作用 (Broom, 2018)。Cebra (1999) 也指出 IgA 是腸道屏障的重要組成部分，腸道微生物群高度影響腸道 IgA 的產生。本試驗添加六肽黴素減少肉雞第 42 天血液 IgA 含量；本研究團隊同時也發現六肽黴素減少迴腸大腸桿菌數量 (六肽黴素 $5.66 \pm 1.62 \log \text{cfu/g}$ vs. 對照組 $6.34 \pm 0.78 \log \text{cfu/g}$)，但枯草菌素及羧四環黴素添加則無顯著差異 (洪等, 2007)，顯示六肽黴素的添加減少腸道大腸桿菌可能與 IgA 下調有關。

表 2. 飼糧中添加抗生素對脾臟淋巴細胞增生之影響 (n = 8)

Table 2. Effect of dietary antibiotic supplement on lymphocyte proliferation of spleen in broilers

Item	Control	Oxytetracycline	Bacitracin	Nosiheptide
3 wk	----- PI -----			
Con A	1.01 ± 0.01	1.06 ± 0.05	1.14 ± 0.12	1.19 ± 0.15
LPS	1.02 ± 0.02	1.02 ± 0.09	1.11 ± 0.09	1.45 ± 0.31
6 wk				
Con A	1.06 ± 0.04	1.12 ± 0.16	1.08 ± 0.06	1.09 ± 0.04
LPS	1.07 ± 0.07	1.18 ± 0.35	1.05 ± 0.06	1.05 ± 0.09

The lymphoid proliferation response is presented as proliferation index (PI).

表 3. 飼糧中添加抗生素對肉雞血液免疫球蛋白之影響 (n = 8)

Table 3. Effect of dietary antibiotic supplement on immunoglobulin level in blood of broilers

	Control	Oxytetracycline	Bacitracin	Nosiheptide
3 week, µg/ mL				
IgA	284 ± 122	323 ± 200	246 ± 107	251 ± 72.4
IgG	1,092 ± 626	1,021 ± 593	1,253 ± 723	873 ± 557
IgM	229 ± 90.6 ^{ab}	264 ± 80.3 ^a	218 ± 101 ^{ab}	168 ± 75.2 ^b
6 week, µg/ mL				
IgA	690 ± 223 ^a	612 ± 243 ^a	625 ± 290 ^a	513 ± 213 ^b
IgG	3,391 ± 301	3,289 ± 1,311	3,143 ± 1,933	3,060 ± 1,574
IgM	338 ± 212	315 ± 220	467 ± 119	415 ± 133

^{a, b} Means (number of observations) within the same row without the same superscripts differ significantly (p < 0.05).

綜上所述，抗生素對於免疫調控不完全具有一致性，雞隻飼糧添加六肽黴素於 6 週齡時，可通過改變溶菌酶及 IgA 來調節雞隻的免疫反應，有益於雞隻健康。由於這三種促生長抗生素在本研究之後已被禁用，因此，應積極開發具有類似抗菌功能的飼料添加劑，以取代促進生長用抗生素之使用。

參考文獻

- 洪靖崎、朱盈安、黃懿儂、魏恆巍、余佳慧、陳保基。2007。肉雞腸道生理及免疫之發展。中國畜牧學會會誌 36 (增刊): 283。
- Al-Ankari, A. S. and A. M. Homeida. 1996. Effect of antibacterial growth promoters on the immune system of broiler chicks. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53: 277-283.
- Arabski, M., I. Konieczna, E. Tusińska, S. Wąsik, I. Relich, K. Zajac, Z. J. Kamiński, and W. Kaca. 2015. The use of lysozyme modified with fluorescein for the detection of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Res.* 170: 242-247.
- Baba, T., N. Yamashita, H. Kodama, M. Mukamoto, M. Asada, K. Nakamoto, Y. Nose, and E. D. McGruder. 1998a. Effect of tylosin tartrate (Tylan Soluble) on cellular immune responses in chickens. *Poult. Sci.* 77: 1306-1311.
- Baba, T., N. Yamashita, H. Kodama, M. Mukamoto, M. Asada, K. Nakamoto, Y. Nose, and E. D. McGruder. 1998b. Effect of tylosin tartrate on humoral immune responses in chickens. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 45: 279-286.
- Bartell, S. M. and A. B. Batal. 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult. Sci.* 86: 1940-1947.
- Broom, L. J. 2018. Gut barrier function: Effects of (antibiotic) growth promoters on key barrier components and associations with growth performance. *Poult. Sci.* 97: 1572-1578.
- Buret, A. G. 2010. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can. J. Vet. Res.* 74: 1-10.

- Cebra, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1046s-1051s.
- Chi, Z. and R. Liu. 2012. New insights into the characterization of the binding of tetracycline analogues with lysozyme: A biophysical study. *Chemosphere* 86: 92-97.
- Choi, K. D. and H. S. Lillehoj. 2000. Role of chicken IL-2 on $\gamma\delta$ T-cells and *Eimeria acervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and $\gamma\delta$ T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 309-321.
- Cua, D. J. and C. M. Tato. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Immunol.* 10: 479-489.
- Demas, G. E., V. Chefer, M. I. Talan, and R. J. Nelson. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* 273: R1631-R1637.
- Diarra, M. S. and F. Malouin. 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front. Microbiol.* 5: 1-15.
- Ducatelle, R., E. Goossens, F. De Meyer, V. Eeckhaut, G. Antonissen, F. Haesebrouck, and F. Van Immerseel. 2018. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Vet. Res.* 49: 1-9.
- EC. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition.
- Er, A., E. Yazar, K. Uney, M. Elmas, F. Altan, and G. Cetn. 2010. Effects of tylosin on serum cytokine levels in healthy and lipopolysaccharide-treated mice. *Acta Vet. Hung.* 58: 75-81.
- Ferraboschi, P., S. Ciceri, and P. Grisenti. 2021. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic. *Antibiotics* 10: 1534.
- Gottlieb, D. and P. D. Shaw. 1967. Antibiotics: Volume I Mechanism of Action. springer-verlag berlin heidelberg, New York.
- Heller, F. and R. Duchmann. 2003. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 77-86.
- Holt, P. S., L. E. Vaughn, and R. K. Gast. 2010. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133: 276-281.
- Huang, G., X. Li, D. Lu, S. Liu, X. Suo, Q. Li, and N. Li. 2018. Lysozyme improves gut performance and protects against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Vet. Res.* 49: 20.
- Kirsch, T., G. Harrison, E. E. Golub, and H. D. Nah. 2000. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.* 275: 35577-35583.
- Lee, K. W., Y. Ho Hong, S. H. Lee, S. I. Jang, M. S. Park, D. A. Bautista, G. Donald Ritter, W. Jeong, H. Y. Jeoung, D. J. An, E. P. Lillehoj, and H. S. Lillehoj. 2012. Effects of anticoccidial and antibiotic growth promoter programs on broiler performance and immune status. *Res. Vet. Sci.* 93: 721-728.
- Long, Y., S. Lin, J. Zhu, X. Pang, Z. Fang, Y. Lin, L. Che, S. Xu, J. Li, Y. Huang, X. Su, and D. Wu. 2016. Effects of dietary lysozyme levels on growth performance, intestinal morphology, non-specific immunity and mRNA expression in weanling piglets. *Anim. Sci. J.* 87: 411-418.
- Ma, H., Y. Qiu and H. Yang. 2021. Intestinal intraepithelial lymphocytes: maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. *J. Leukoc Biol.* 109: 339-347.
- Martin, L. B., A. Scheuerlein, and M. Wikelski. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. Biol. Sci.* 270: 153-158.
- Matzneller, P., S. Strommer, C. Drucker, K. Petroczi, C. Schörghofer, E. Lackner, B. Jilma, and M. Zeitlinger. 2017. Colistin Reduces LPS-Triggered Inflammation in a Human Sepsis Model In Vivo: A Randomized Controlled Trial. *Clin. Pharmacol. Ther.* 101: 773-781.
- Mazutti, K., L. B. Costa, L. V. Nascimento, T. Fernandes Filho, B. C. B. Beirão, P. C. Machado Júnior, and A. Maiorka. 2016. Effect of colistin and tylosin used as feed additives on the performance, diarrhea incidence, and immune response of nursery pigs. *Semina Ciênc. Agrár.* 37: 1947-1962.
- Niewold, T. A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.* 86: 605-609.
- Nikolov, T., B. Stanchev, and S. Boyadjiev. 1966a. The Mg^{2+} -influence on the antibody biosynthesis in vitro inhibited by tetracyclines and chloramphenicol. *Nauchni. Tr. Vissh. Med. Inst. Sofia.* 45: 15-20.

- Nikolov, T. K., B. D. Stantchev, and S. I. Boyadjiev. 1966b. Influence of antibiotics on antibody formation in vitro. I. Comparative study of the inhibitory influence of tetracyclines and chloramphenicol. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 110: Suppl: 181-185.
- Olivares-Villagómez, D. and L. Van Kaer. 2018. Intestinal intraepithelial lymphocytes: sentinels of the mucosal barrier. *Trends Immunol.* 39: 264-275.
- Pantelyushin, S., S. Haak, B. Ingold, P. Kulig, F. L. Heppner, A. A. Navarini, and B. Becher. 2012. Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* 122: 2252-2256.
- Romanyukha, A. A., S. G. Rudnev, and I. A. Sidorov. 2006. Energy cost of infection burden: an approach to understanding the dynamics of host-pathogen interactions. *J. Theor. Biol.* 241: 1-13.
- Salim, H. M., H. K. Kang, N. Akter, D. W. Kim, J. H. Kim, M. J. Kim, J. C. Na, H. B. Jong, H. C. Choi, O. S. Suh, and W. K. Kim. 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92: 2084-2090.
- Sarson, A. J., Y. Wang, Z. Kang, S. E. Dowd, Y. Lu, H. Yu, Y. Han, H. Zhou, and J. Gong. 2009. Gene expression profiling within the spleen of *Clostridium perfringens*-challenged Broilers fed antibiotic-medicated and non-medicated diets. *BMC Genomics*. 10: 260.
- SAS institute. 2003. SAS User's Guide. Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Shan, T., Y. Wang, Y. Wang, J. Liu, and Z. Xu. 2007. Effect of dietary lactoferrin on the immune functions and serum iron level of weanling piglets. *J. Anim. Sci.* 85: 2140-2146.
- Strzępa, A., M. Majewska-Szczepanik, F. M. Lobo, L. Wen, and M. Szczepanik. 2017. Broad spectrum antibiotic enrofloxacin modulates contact sensitivity through gut microbiota in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140: 121-133.e123.

Effects of antibiotics on intestinal immunity in broilers ⁽¹⁾

Ching-Chi Hung ⁽²⁾, Bao-Ji Chen ⁽³⁾, Ching-Yi Chen ⁽³⁾, Ying-An Chu ⁽³⁾,
I-Nung Huang ⁽³⁾ and Chin-Bin Hsu ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Aug. 18, 2022; Accepted: Mar. 9, 2023

Abstract

This study was to investigate the effect of antibiotics on intestinal immune response. One hundred and ninety-two broilers were randomly allocated to 4 treatments with 4 replicates of 12 birds each. The 4 treatments were: control, bacitracin 55 ppm, nisin 2.5 ppm, and oxytetracycline 55 ppm supplements. Intestinal mucosal immunity was measured at 3 and 6 wk of age. In the intestinal mucosal immunity, the nisin supplemented group significantly decreased the expression of mucosal antimicrobial lysozyme level at 3 weeks of age ($P < 0.05$), but had no effect on the bacitracin and oxytetracycline groups. The three antibiotic supplements had no significant differences in T cell receptor $\gamma\delta$, ileum and lymphocyte proliferation of blood. The nisin supplementation group had lower blood IgA levels ($P < 0.05$) at 6 wk of age, but did not affect the bacitracin and oxytetracycline groups. Antibiotic administration did not alter plasma IgG and IgM at 6 wk of age. In conclusion, different antibiotics may be inconsistent in immune regulation. Supplementation of nisin in chicken diets modulates the immune response of chickens by downregulating lysozyme and IgA.

Key words: Antibiotics, Broilers, Intestinal immunity, $\gamma\delta$ T cell receptor.

(1) Contribution No. 2739 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, No. 50, Lane 155, Sec. 3, Keelung Road, Taipei 106, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: cbhsu@mail.tlri.gov.tw.