

# 甘草次酸对早期断奶仔猪内脏器官发育的影响

何子双<sup>1,3</sup>, 胡元亮<sup>1</sup>, 印遇龙<sup>2\*</sup>, 黄瑞林<sup>2</sup>, 李飞务<sup>2</sup>, 王贵平<sup>3</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125;  
3. 广东省农业科学院兽医研究所, 广州 510640)

**摘要:** 7日龄断奶长×大仔公猪, 以代乳粉配制代乳液饲养。12头仔猪9日龄按体重随机均分为对照组(基础日粮)和甘草次酸(GA)组(代乳粉添加200 mg/kg的GA), 每组6头。连续饲喂12 d。仔猪21日龄称重后处死, 测定内脏指数、小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量、空肠和回肠黏膜绒毛高度、隐窝深度和固有层厚度以及空肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性。结果表明, 与对照组相比, GA组肝脏指数、小肠质量/长度比、空肠和回肠绒毛高度及回肠隐窝深度显著增加( $P < 0.05$ ), 空肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性显著增强( $P < 0.01$ )。提示GA促进了仔猪小肠和肝脏的发育, 改善黏膜结构; 提高上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性可能是GA影响小肠发育的分子机制之一。

**关键词:** 甘草次酸; 仔猪; 内脏指数; 形态学; 鸟氨酸脱羧酶

中图分类号: S853.74; S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)07-0989-05

## Effect of Glycyrrhetic Acid on Viscera Development in Early-weaned Piglet

HE Zi-shuang<sup>1,3</sup>, HU Yuan-liang<sup>1</sup>, YIN Yu-long<sup>2\*</sup>,  
HUANG Rui-lin<sup>2</sup>, LI Fei-wu<sup>2</sup>, WANG Gui-ping<sup>3</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 3. Veterinary Medicine Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Landrace Yorkshire male pigs were weaned at 7-day old and fed with milk prepared by milk-replacing powder (MRP) and water. At 9-day old, twelve pigs were randomly assigned into control (basic diet) or glycyrrhetic acid (GA) group (MRP containing 200 mg/kg GA) according to body weight, 6 pigs each. The pigs were fed with corresponding feed for 12 days. Pigs were weighed and killed at 21-day old, and the viscera index, the protein content in enterocytes of small intestine and the ornithine decarboxylase (ODC) activity in that of jejunum, and the villus height, crypt and lamina propria depth of jejunum and ileum were determined. The results showed that, compared with the control, the liver index and small intestine mass/length, the villus height of jejunum and ileum and the crypt of ileum in GA group were increased ( $P < 0.05$ ); The ODC activity was enhanced ( $P < 0.01$ ). It is indicated that the development of liver and small intestine of piglet were boosted and the mucosa structure was improved by GA; And increasing ODC activity is one of the potentially molecular mechanism of GA on the small intestine.

**Key words:** glycyrrhetic acid; piglet; viscera index; morphology; ornithine decarboxylase

收稿日期: 2007-08-21

基金项目: 国家自然科学基金(30671517); 国家973计划(2004CB117502)

作者简介: 何子双(1965-), 男, 四川西充人, 博士, 从事中药药理学研究, E-mail: hezishuang@163.com

\* 通讯作者: 印遇龙, 研究员, 博导, 从事动物营养与健康研究, E-mail: yyulong@isa.ac.cn

甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)为甘草的主要活性成分甘草酸的甾原,具有抗炎、抗溃疡和类氢化可的松作用等药理活性<sup>[1]</sup>。健脾益气中药(包括甘草)的提取物可刺激大鼠小肠隐窝干细胞增殖,生理水平的氢化可的松促进仔猪小肠发育,二者的作用机制都是提高细胞内鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)活性<sup>[2-3]</sup>。本试验研究了GA对新生仔猪内脏指数、小肠黏膜组织结构、上皮细胞蛋白质含量和鸟氨酸脱羧酶活性等的影响,以检验GA对仔猪消化器官发育的作用及其部分机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药品、试剂与仪器

GA(中国海洋大学兰太药业有限公司,批号20040704),苯甲磺酰氟(PMSF,美国 Amresco 公司),腐胺,1,6-己二胺(Sigma-aldrich 公司),色谱级甲醇(美国 Tedia 公司)。其余为国产分析纯。

以下试剂均由超纯水(电阻值 $\geq 16k$ ,重庆艾科浦水处理系统)配制。匀浆缓冲液:灭菌 PBS 加入维生素 B<sub>6</sub> 0.1 mmol/L, EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mmol/L, 二硫苏糖醇(DTT) 2.5 mmol/L, PMSF 5  $\mu$ g/mL。反应缓冲液:灭菌 PBS 加入 L-鸟氨酸盐酸盐 0.2 mmol/L, 维生素 B<sub>6</sub> 0.2 mmol/L, DTT 0.5 mmol/L。对照缓冲液:灭菌 PBS 加入维生素 B<sub>6</sub> 0.2 mmol/L, DTT 0.5 mmol/L。色谱衍生剂、流动相参考文献<sup>[2]</sup>配制, 0.22  $\mu$ m 滤膜减压过滤。

UV-2000 型分光光度计(日本岛津)、高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、LC21000 荧光检测器(日本岛津,激发波长 345 nm、发射波长 445 nm)、反相高效色谱柱 ODS 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, ID 5  $\mu$ m)。N300 色谱工作站(浙江大学智能信息研究所)。

### 1.2 代乳粉配料及营养水平

代乳粉由乳清浓缩蛋白(北京佩思德食品配料科技有限公司)、乳脂粉(江西维尔宝食品生物有限公司)、微量元素氨基酸螯合剂(广州天科科技有限公司)及赖氨酸、蛋氨酸、乳酸钙、磷酸二氢钙、维生素预混剂等配合而成。其营养水平(计算值)为消化能 18.62 MJ/kg, 干物质为 93.27%, 粗蛋白 22.44%, 粗脂肪 14.00%, 乳糖 45.68%, 总钙 0.80%, 有效磷 0.58%。饲喂时先以少量 50  $^{\circ}$ C 左右水溶解, 自来水配成 1:5 代乳液。

### 1.3 实验动物及饲养管理

7 日龄长 $\times$ 大公猪(湖南省长沙星城种猪有限公司)单笼饲养。室温 29 $^{\circ}$ C, 自然光照, 每日机械通风 4 h。饲养笼为有机玻璃四壁、塑料漏缝底板, 前部设凹形槽盛放代乳液和饮水。每日 08:00 前清洗 1 次, 08:00—19:30 分 4~5 次添加新鲜代乳液。自由饮水。适应性饲喂 2 d 后, 仔猪按体重随机分为对照组(基础日粮)和甘草次酸(GA)组(代乳粉添加 200 mg/kg GA, 剂量由预试验确定), 每组 6 头。连续 12 d。

### 1.4 样品采集及预处理

21 日龄仔猪称重后放血处死。迅速取出内脏器官, 称重。以含 1  $\mu$ mol/L PMSF 的生理盐水冲洗胃、肠道内容物, 吸干表面水分后称重。在空肠、回肠的前 1/3 与中 1/3 交界处取约 1.5 cm 段, 中性福尔马林固定, 24 h 后换新鲜固定液, 常温保存。取十二指肠、回肠中段约 5 cm, 空肠中段约 20 cm, 以含 1  $\mu$ mol/L PMSF 的生理盐水冲洗内容物, 无菌玻片刮取黏膜, 无菌锡箔包装, 液氮速冻后 -70 $^{\circ}$ C 保存。准确称量 0.1 g 左右肠黏膜细胞, 1 mL 4  $^{\circ}$ C 预冷的匀浆缓冲液在玻璃匀浆器(冰浴)匀浆, 2 mL 匀浆缓冲液分 2 次清洗匀浆器, 收集匀浆液。4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 15 min。-70 $^{\circ}$ C 保存上清液备用。

### 1.5 测定指标及方法

1.5.1 内脏指数 按下列公式计算。

$$\text{内脏指数} = \frac{\text{内脏质量(g)}}{\text{体质量(kg)}}$$

$$\text{小肠质量/长度} = \frac{\text{质量(g)}}{\text{长度(cm)}}$$

1.5.2 小肠黏膜组织结构 参考文献<sup>[4]</sup>制作空肠、回肠常规石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 测定绒毛高度、隐窝深度和固有层厚度。

1.5.3 小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量 取 20  $\mu$ L 上清液, 以牛血清白蛋白为标准, 考马斯亮蓝结合法测定蛋白质浓度<sup>[5]</sup>。

1.5.4 空肠黏膜上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性 参考文献<sup>[3, 6]</sup>并略作改进。取备用上清液和反应缓冲液各 200  $\mu$ L, 加入 5 mL 塑料离心管, 盖上盖子, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。置冰上, 加入 400  $\mu$ L 1.5 mol/L 高氯酸终止反应。蛋白质沉淀后, 加入 200  $\mu$ L 2 mol/L 碳酸钾中和。4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min。收集上清, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤。对照管取备用上清液和对照缓冲液按同样步骤进行(每个样品 1 个对照)。HPLC 法分析上清腐胺浓度。

ODC 的活性以释放出的 pmol 腐胺/mg $\cdot$ h 来

表示。根据上清液蛋白质浓度(C, mg/mL)和腐胺测定结果计算鸟氨酸脱羧酶活性(O)。

$$O = (\text{反应管} - \text{对照管}) \times 10 / C$$

## 1.6 数据处理

数据以  $\bar{x} \pm S\bar{x}$  表示,用 SPSS 11.5 软件统计分析组间的差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 仔猪内脏器官指数的变化

GA 组肝脏指数和小肠质量/长度比显著高于对照组( $P < 0.05$ )。胃指数、小肠指数也有所提高

( $P > 0.05$ )(表 1)。表明 GA 显著促进了肝脏发育,提高了小肠单位长度的质量。

### 2.2 仔猪小肠黏膜结构的变化

GA 组空肠和回肠绒毛高度及回肠隐窝深度比对照组显著增加( $P < 0.05$ );空肠和回肠固有层厚度及空肠的隐窝深度亦有所增加( $P > 0.05$ )(表 2)。表明 GA 改善了仔猪的小肠黏膜结构,从而可以影响空肠和回肠的发育及消化、吸收等功能。

### 2.3 仔猪小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量的变化

GA 组十二指肠黏膜上皮细胞蛋白质含量比对照组有所提高,而空肠和回肠的蛋白质含量有所降

表 1 仔猪内脏器官指数的变化 ( $n=6$ )

Table 1 Changes of visceral index in piglets

组别 Group	胃指数/(g/kg) Stomach index	小肠指数/(g/kg) Small intestine index	小肠质量/长度/(g/cm) Small intestine mass/length	肝脏指数/(g/kg) Liver index
对照组 Control	7.02±0.34	36.72±1.96	0.19±0.01	24.28±0.48
甘草次酸组 GA	7.67±1.18	39.45±2.66	0.21±0.00*	26.92±1.20*

\* 数据与对照组差异显著( $P < 0.05$ ),下同

\* Data differ from the control significantly ( $P < 0.05$ ). The same as follows

表 2 仔猪小肠黏膜结构的变化 ( $n=6$ )

Table 2 Structural changes of small intestine mucosa of piglets

组别 Group	空肠黏膜 Jejunum mucosa			回肠黏膜 Ileum mucosa		
	绒毛 Villus	隐窝 Crypt	固有层 Lamina propria	绒毛 Villus	隐窝 Crypt	固有层 Lamina propria
	$\mu\text{m}$					
对照组 Control	268.87±32.90	159.83±9.94	143.87±6.70	102.78±9.03	181.67±13.65	131.42±10.94
甘草次酸组 GA	361.97±15.42*	178.83±18.47	148.67±11.83	167.77±28.83*	216.83±10.81*	155.73±14.56

低,差异均不显著( $P > 0.05$ )(表 3)。表明 GA 对仔猪小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量没有显著影响。

表 3 仔猪小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量的变化 ( $n=6$ )

Table 3 Protein content changes of small intestine enterocytes of piglets

组别 Group	mg/g		
	十二指肠 Duodenum	空肠 Jejunum	回肠 Ileum
对照组 Control	44.73±6.13	48.53±9.77	41.18±14.40
甘草次酸组 GA	47.97±5.70	41.93±8.53	36.93±3.69

### 2.4 仔猪空肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性的变化

GA 组空肠上皮细胞 ODC 活性比对照组极显著提高(分别为  $48.27 \pm 3.93$  和  $27.55 \pm 3.19$

pmol 腐胺/mg·h,  $P < 0.01$ )。表明 GA 可以通过影响仔猪空肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶的活性,增加细胞内的多胺合成,促进上皮细胞的增殖。

## 3 讨论

### 3.1 甘草次酸对仔猪小肠发育的影响

小肠是动物消化和吸收的主要部位。新生仔猪小肠发育迅速<sup>[7-8]</sup>。GA 组仔猪小肠质量/长度比显著提高。表明 GA 在一定程度上促进了仔猪小肠发育。提示 GA 可能是甘草对仔猪健脾益气作用的物质基础。氢化可的松也是通过增加仔猪小肠质量(不增加长度)来促进小肠发育<sup>[3]</sup>。从这一点上看,二者的作用具有同一性。

### 3.2 甘草次酸对仔猪小肠黏膜结构的影响

小肠绒毛是小肠黏膜上皮和固有层向肠腔隆起结构,由吸收细胞、杯状细胞和内分泌细胞组成,具有吸收和分泌功能<sup>[9]</sup>。GA组仔猪空肠、回肠绒毛长度显著增加,也就增加了小肠的吸收面积,同时表明GA减轻了仔猪断奶后上皮绒毛的萎缩,体现了GA的抗应激和抗溃疡作用。

小肠隐窝是绒毛根部上皮凹陷深入固有层形成的管状腺(肠腺),其中的干细胞能够不断增殖、分化、向上迁移,以补充绒毛顶端脱落的吸收细胞和杯状细胞。GA组仔猪回肠隐窝深度增加,可以增强其分泌和消化机能;同时,隐窝中干细胞增加,也为修复绒毛提供了物质基础。GA组仔猪空肠隐窝深度没有显著增加,而绒毛高度显著提高,可能是其中的隐窝干细胞增殖、分化、移行功能增强的结果。

### 3.3 甘草次酸对仔猪小肠黏膜上皮细胞蛋白质含量的影响

GA组仔猪小肠质量/长度增加,黏膜上皮结构改善,而小肠上皮细胞蛋白质含量没有显著变化。表明GA可能不是通过增加上皮细胞蛋白质合成途径来影响仔猪小肠发育。GA增加了仔猪内源性精氨酸的合成(另文报道),因此可能通过精氨酸和一氧化氮途径影响仔猪的小肠发育<sup>[10-11]</sup>。GA对小肠上皮细胞一氧化氮合成酶表达和功能的影响需要进一步研究。

### 3.4 甘草次酸对仔猪空肠鸟氨酸脱羧酶活性的影响

ODC是小肠上皮细胞内多胺合成的关键调节酶和限速酶,在调节细胞成熟和修复方面起重要作用。空肠为小肠中最主要的组成部分,且空肠和回肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性相似<sup>[3]</sup>。因此,试验主要分析了空肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性。

GA增强了仔猪小肠上皮细胞鸟氨酸脱羧酶的活性,可以增加细胞内多胺(主要是腐胺)的合成,从而刺激了细胞的增殖、分化。GA的此种作用可能是其促进仔猪小肠发育、黏膜上皮修复和抗溃疡作用的分子基础。

早期断奶仔猪的胃肠道面临着许多的应激因素,如食物的改变、微生物的侵袭等,常导致小肠上皮绒毛萎缩,消化吸收功能下降而发生腹泻。中兽医学认为,“脾胃为后天之本”,“脾主运化”,“脾为之卫”,“诸病由脾胃生”,“邪之所凑,其气必虚”。脾的功能旺盛是保证机体健康的重要因素。而与中兽医“脾”相关的组织器官主要是消化系统<sup>[12]</sup>。GA与其

它具有健脾益气作用中药的有效成分均可以作用于小肠上皮细胞及隐窝干细胞靶点,通过鸟氨酸脱羧酶和多胺机制引起细胞增殖,促进小肠黏膜修复,可能是其“益气健脾”作用机理之一。在新生仔猪,ODC活性受体肾上腺皮质激素调节。因此,GA的此种作用可能是通过增强氢化可的松的效应来实现的。

### 3.5 甘草次酸对仔猪肝脏发育的影响

在新生仔猪,肝脏是优先发育的器官之一<sup>[8]</sup>。肝为仔猪体内最大的消化腺,具有许多重要的生理功能。肝细胞分泌的胆汁,作为消化液参与脂类的消化和吸收;肝细胞参与糖、脂类、激素、药物的代谢及肠道吸收的有害物质的生物转化;肝细胞合成多种蛋白质,直接分泌进入血液;肝清除从胃肠道进入血液的微生物等<sup>[7]</sup>。GA组仔猪肝脏指数显著提高,表明GA促进了仔猪肝脏发育。其机制可能与以下几方面有关:一是内分泌的调节,GA引起血液胰高血糖素水平降低(另文报道),可以促进肝脏糖原生成增加;二是GA引起内源性精氨酸合成增加,因为肝脏存在鸟氨酸循环,可能对肝脏发育具有促进作用;三是GA影响肝脏组织细胞对氢化可的松的代谢,刺激了细胞增殖。其确切的作用机理还需要进一步研究。

## 4 结 论

GA促进了仔猪小肠和肝脏的发育,改善了小肠黏膜上皮结构。提高上皮细胞鸟氨酸脱羧酶活性可能是GA影响仔猪小肠发育的分子机制之一。

### 参考文献:

- [1] 谢 辉. 18 $\beta$ -甘草次酸的研究进展[J]. 中成药, 2002,24(9):712-713.
- [2] 张子理. 益气健脾中药小肠隐窝干细胞分子药理研究[D]. 广州:广州中医药大学,2002:85-90.
- [3] WU G, FLYNN N E, KNABE D A. Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 279: E395-E402.
- [4] 顾宪红,张宏福,余锐萍,等. 断奶日龄对仔猪肠粘膜形态的影响[J]. 畜牧兽医学报,2001,32(4):306-313.
- [5] 胡 兰. 动物生物化学实验教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,2006:69.
- [6] 李恩中,宁黔冀,李超堃,等. 高效液相色谱法测定肝

- 组织鸟氨酸脱羧酶活性[J]. 新乡医学院学报, 2003, 20(6):395-397.
- [7] XU R J, WANG F, ZHANG S H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors [J]. *Live-stock Production Science*, 2000, 66: 95-107.
- [8] 李登赴, 刘 丽. 新生仔猪肝脏胰腺和胃发育的初步研究[J]. 贵州畜牧兽医, 2003, 27(6):2-3.
- [9] 曾园山, 陈宁欣. 组织学与胚胎学[M]. 北京: 科学出版社, 2004:120-136.
- [10] WU G, KNABE D A. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269: R621-R629.
- [11] GOOKIN J L, RHOADS J M, ARGENZIO R A. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283: G157-G168.
- [12] 胡元亮. 中兽医学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006:65.

## 关于参加“第二届全国人畜共患病学术研讨会”的邀请函

相关企业和单位:

中国畜牧兽医学会、中华预防医学会和中国微生物学会拟定于 2008 年 10 月下旬在江苏泰州联合召开“第二届全国人畜共患病学术研讨会”。本次会议是涉及人畜共患病领域的三家国家级学会第二次联合召开学术研讨会,目的是增加卫生和畜牧兽医专业人员跨学科、跨行业的学术交流,共同研讨人畜共患病防治的策略和手段,促进人畜共患病的防治工作。

本次会议将汇聚国内从事人畜共患病科研和防治工作的知名院士、专家学者以及工作在各级疾病预防控制中心、卫生监督中心、动物疫病预防控制中心、出入境检验检疫局的专业人员。此外,会议还将邀请卫生部、农业部、国家质检总局等政府部门领导以及世界卫生组织等有关国际组织的官员参加会议。

本次会议欢迎国内外企业在会上介绍新产品、新技术和新成果。主办方将为参加会议企业提供优良展览设施和与广大专业人员交流沟通的机会。会议将设 4 个赞助等级,分别为赞助 10 万元人民币、5 万元人民币、2 万元人民币、1 万元人民币。具体情况和回报办法请与会务组联系。

### 一、赞助付款方式及截止时间

协议签署后十天内,赞助单位应将款项全部汇到中国畜牧兽医学会帐户(户名:中国畜牧兽医学会;帐号:041601040003564;开户行:农行北京朝阳支行营业部)。

赞助截止 2008 年 9 月 30 日,逾期将无法满足部分回报条件。

同级赞助单位按“先来先用”原则安排招待晚宴、展览等事宜;大会刊物广告版面将采用“先来先用”原则分配。

二、企业如有特殊要求,可与会务组协商。会务组对本资助条款具有解释权。

### 三、联系方式

1. 中国畜牧兽医学会

联系人:石娟 申凌

通信地址:北京朝阳区农展馆南路 9 号博雅园 1-106(100125)

电 话:010-85959010、85959006 传 真:010-85959010 E-mail:caav2007@163.com

2. 中华预防医学会

联系人:田传胜 杨鹏

通信地址:北京市西城区鼓楼西大街 154 号中华预防医学会学术会务部(100009)

电 话:010-84039882、64012329 传 真:010-84039882、64012329 E-mail:cpma\_xsb@163.com

2008 年 4 月 29 日