

谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠粘膜蛋白质、DNA 含量和组织形态的影响

张军民, 高振川

(中国农业科学院畜牧研究所/农业部动物营养重点开放实验室,北京 100094)

摘要: 选用日龄和体重相近的大长北仔猪 40 头,公母各半,21 日龄断奶后随机分为试验组和对照组。按等氮等能的原则配制日粮,试验组日粮添加 1.2% 的谷氨酰胺。分别在 35 日龄和 49 日龄每组屠宰 5 头性别相同的仔猪,以研究日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪小肠粘膜组织形态的影响。试验结果表明,日粮添加谷氨酰胺可显著增加试验组仔猪空肠 DNA 含量,但对回肠 DNA 和肠道蛋白质无显著影响;可显著增加试验组仔猪 35 日龄粘膜厚度和 49 日龄空肠绒毛高度,对十二指肠绒毛高度和粘膜厚度无显著影响。电镜观察结果表明,日粮添加谷氨酰胺可以改善 35 日龄仔猪空肠中段微绒毛的形态和结构,减少小肠上皮细胞的损伤。因此,日粮添加谷氨酰胺可防止空肠绒毛萎缩,对维持肠道的结构和功能具有重要作用。

关键词: 谷氨酰胺; 早期断奶仔猪; 小肠粘膜组织形态

Effect of Glutamine Supplementation on Intestinal Mucosal Protein, DNA and Mucosal Morphology of Early-weaned Piglets

ZHANG Junmin, GAO Zhenchuan

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences / The Key Laboratory of Animal Nutrition, Ministry of Agriculture, Beijing 100094)

Abstract: Forty piglets weaned at the 21 d of age were randomly allocated to two groups. The treatment group fed diet contained 1.2% glutamine. The diets were calculated to be isonitrogenous and isoenergetic. Five replicates were designed in each treatment and four piglets in each replicate. Five piglets from each dietary treatment were killed at the 35 d and 49 d of age. The results showed that dietary glutamine supplementation increased jejunal DNA content of piglets in treatment group at the 35 d and 49 d of age. There was no significant change of ileum DNA content and intestinal protein content between treatment and control. Dietary glutamine supplementation increased markedly mucosal thickness of piglets in treatment group at the 35 d of age. The intestinal villus heights were significantly higher in treatment than in control. The results of electron micrograph showed that dietary glutamine supplementation prevented deterioration of intestinal epithelium, and maintained normal intestinal microvillus structure. The results suggested that glutamine prevented villus atrophy, and had protective effect on intestinal structure.

Key words: Glutamine; Early-weaned piglet; Intestinal mucosal morphology

许多研究表明,谷氨酰胺(glutamine, GLN)是肠道上皮细胞代谢的主要能量底物,也是肠上皮间淋巴组织增殖的必要营养物质^[1,2]。当仔猪的母源 GLN 供给终止时,可能影响断奶仔猪肠道结构和功

能。玉米-豆粕日粮中添加 GLN,在断奶后可防止空肠绒毛萎缩^[3]。本试验拟研究添加 GLN 对早期断奶仔猪肠道粘膜蛋白质、DNA 含量和肠绒毛微观结构的影响。

收稿日期:2000-10-23

作者简介:张军民(1972-),男,河南焦作人,助研,博士,主要从事动物营养生理生化方面的研究。Tel:010-62895371; Fax:010-62895351; E-mail:zhjmxms@sina.com

1 材料与方法

1.1 试验动物

选取 3~5 胎、产仔数 8~10 头的经产大长北母猪所产日龄和体重相近的仔猪 40 头, 21 日龄断奶, 每组 20 头, 公母各半。随机分为对照组和试验组。

1.2 试验日粮

表 1 日粮组成和营养水平

Table 1 Composition and nutritional value

原料 Ingredient(%)	试验组 Treat ment	对照组 Control	营养水平 Nutrient level	试验组 Treat ment	对照组 Control
黄玉米 Yellow corn	51.85	51.35	消化能 DE(kcal/kg)	3400	3400
豆粕 Soybean meal	25	25	粗蛋白质 CP(%)	20.74	20.55
膨化大豆 Extruded soybean	12.5	12.5	钙 Ca(%)	0.85	0.86
乳清粉 Whey	4	4	磷 P(%)	0.73	0.72
豆油 Soybean oil	1.25	1.25	赖氨酸 Lys(%)	1.26	1.25
赖氨酸 Lysine	0.58	0.48	蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys(%)	0.53	0.56
石粉 Limestone	0.85	0.85			
磷酸二氢钙 Dicalcium phosphate	1.40	1.40			
大豆分离蛋白 Segregated soybean	-	1.8			
谷氨酰胺 Glutamine	1.2	-			
食盐 Salt	0.25	0.25			
50%氯化胆碱 50% Choline chloride	0.12	0.12			
维生素和微量元素预混料 ¹⁾ Vitamin and mineral pre mix	1	1			

¹⁾ 维生素和微量元素预混料为每公斤日粮提供 Pre mix provides per kilogram of complete diet: Cu 6 mg, I 0.3 mg, Fe 100 mg, Mn 10 mg, Se 0.3 mg, Zn 100 mg, Neomycin 90 mg, Hualuo vita min pre mix-1 200 mg

1.3 样品测定

1.3.1 组织器官取样 在 35、49 日龄时每组选择 5 头性别相同的仔猪屠宰, 取小肠后, 按组织学把小肠分为十二指肠、空肠和回肠, 在十二指肠、空肠取组织样, 用生理盐水冲洗干净后, 于戊二醛中固定, 其余各肠段分别系上两端, 液氮冷冻, 冰箱 -70℃ 保存。肠段的划分和组织样的取样部位: 十二指肠为胃和胆管在小肠开口处之间的部分, 在距胃贲门 5cm 处取组织样; 空肠为十二指肠和回肠间的部分, 于空肠的 1/2 处取组织样; 回肠为回盲瓣膜和结肠间的部分。

1.3.2 小肠组织形态学观测 取经戊二醛固定样品, 用苏木精-伊红染色, 制作切片。每个样品观察 4 个非连续性 6μm 的切片, 用 Leica Q500 MC 型图像分析仪(Colour video camera TK-1280E)作定量分析。每张切片测定 10 个绒毛高度和粘膜厚度, 取其平均数作为测定数据; 取经戊二醛固定的 35 日龄仔猪空肠中段样品用缓冲液冲洗, 1% 锇酸后固定, 然后再用缓冲液冲洗, 乙醇脱水、乙酸异戊脂转换、喷金。用日立 S-450 型扫描电镜和 H-500 型透射电镜

根据等氮等能原则配制日粮, 试验组添加 1.2% 的 GLN(日本味之素公司生产, 纯度为 99%), 每头每天按公斤体重摄入 GLN 约 0.5g。对照组用含蛋白 82% 的大豆分离蛋白平衡氮, 并根据原料氨基酸测定值, 用赖氨酸平衡两组日粮。基础日粮和营养成分见表 1。

观察。

1.3.3 小肠蛋白质和 DNA 的测定 取十二指肠、空肠和回肠用 4℃ 生理盐水冲洗干净后, 刮取粘膜称重, 组织匀浆器匀浆, 福林-酚试剂法测定匀浆液中蛋白质含量, 荧光探针啡啶溴红法测定 DNA 含量。

1.4 统计分析

试验数据采用 SAS 软件进行 Student' T 检验, 本文中数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 日粮添加 GLN 对早期断奶仔猪肠道蛋白质和 DNA 的影响

由表 2 可知, 日粮添加谷氨酰胺试验组仔猪在 35 日龄时十二指肠蛋白质有所升高, 但与对照组相比差异并不显著, 而空肠和回肠蛋白质试验组仔猪与对照组相比无显著差异。49 日龄两组间肠道蛋白质也无明显差异。添加谷氨酰胺后 35 日龄和 49 日龄试验组仔猪空肠 DNA 显著高于对照组, 而回肠 DNA 含量试验组与对照组无明显差异(表 3)。

表 2 日粮添加 GLN 对早期断奶仔猪 35 日龄和 49 日龄肠道蛋白质含量的影响¹⁾(mg/ g)

Table 2 Effect of dietary glutamine supplementation on intestinal protein content of early weaned piglets at the 35 d and 49 d of age

	35 d		49 d	
	对照组 Control	试验组 Treatment	对照组 Control	试验组 Treatment
	十二指肠 Duodenum			
蛋白质/ 粘膜重 Protein/ M. W	34.35 ± 6.08	39.55 ± 12.83	52.73 ± 15.20	67.17 ± 25.49
蛋白质/ 肠重 Protein/ I. W	15.98 ± 2.73	18.25 ± 7.08	22.80 ± 6.69	33.08 ± 10.76
	空肠 Jejunum			
蛋白质/ 粘膜重 Protein/ M. W	47.32 ± 3.44	38.33 ± 5.69	61.25 ± 7.98	52.46 ± 3.22
蛋白质/ 肠重 Protein/ I. W	20.30 ± 1.78	18.27 ± 2.98	32.53 ± 5.18	26.77 ± 4.93
	回肠 Ileum			
蛋白质/ 粘膜重 Protein/ M. W	59.03 ± 19.06	48.43 ± 12.63	61.35 ± 14.19	62.47 ± 17.50
蛋白质/ 肠重 Protein/ I. W	26.72 ± 6.83	22.18 ± 6.24	28.98 ± 2.88	33.50 ± 5.88

¹⁾ M. W 表示粘膜重; I. W 表示小肠重 M. W means mucosa weight, I. W means intestine weight

表 3 日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道 DNA 的影响 (mg/ g)

Table 3 Effect of glutamine supplementation on intestinal DNA content of early weaned piglets

日龄 Day	对照组 Control	试验组 Treatment
	空肠 Jejunum	
35 d	92.68 ± 22.18	152.60 ± 50.58 *
49 d	43.74 ± 12.06	73.88 ± 2.75 **
	回肠 Ileum	
35 d	154.60 ± 38.72	158.16 ± 38.34
49 d	196.63 ± 78.13	251.88 ± 116.74

* 表示差异显著($P < 0.05$), ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。下同
* Significance level at 0.05, ** Significance level at 0.01. The same as below

2.2 日粮添加 GLN 对肠粘膜组织形态的影响

由表 4 可知,日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪十二指肠绒毛高度和粘膜厚度无论在 35 日龄还

是在 49 日龄都无显著影响,试验组略低于对照组。而对空肠却有显著影响,35 日龄时试验组仔猪绒毛高度和粘膜厚度都高于对照组,且粘膜厚度与对照组仔猪相比差异极显著($P < 0.01$),49 日龄时试验组仔猪空肠绒毛高度和粘膜厚度都显著高于对照组仔猪($P < 0.05$)。

2.3 日粮添加谷氨酰胺对仔猪空肠微绒毛结构电镜观察

扫描电镜观察结果(图 1、图 2)表明,对照组仔猪肠道上皮细胞明显部分脱落;日粮添加谷氨酰胺后试验组仔猪空肠上皮细胞损伤和脱落明显减少,透射电镜观察结果表明,对照组仔猪空肠中段微绒毛长度短,其分布紊乱不整齐,长短不均,而试验组仔猪空肠中段微绒毛长度比对照组有所提高,且数量明显增多,密度浓集,分布也较均匀(图 3、图 4)。

表 4 日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪十二指肠粘膜和空肠粘膜形态的影响(μm)

Table 4 Effect of glutamine supplementation on duodenum morphology and jejunum morphology of early weaned piglets

	十二指肠 Duodenum		空肠 Jejunum	
	对照组 Control	试验组 Treatment	对照组 Control	试验组 Treatment
35 d				
绒毛高度 Villus height	207.03 ± 25.66	195.21 ± 23.41	178.40 ± 26.62	210.43 ± 26.38
粘膜厚度 Mucosa thickness	458.59 ± 39.41	534.96 ± 65.84	344.78 ± 34.52	421.06 ± 30.93 **
49 d				
绒毛高度 Villus height	230.40 ± 42.09	194.92 ± 33.61	168.82 ± 13.60	231.64 ± 38.26 *
粘膜厚度 Mucosa thickness	532.71 ± 81.83	480.14 ± 71.82	414.83 ± 14.99	467.93 ± 41.18 *

3 讨论

3.1 日粮添加谷氨酰胺对仔猪肠道蛋白质和 DNA 的影响

许多研究表明,GLN 是嘧啶、嘌呤核苷酸、核

酸、氨基糖合成的重要前体物;也是快速生长和分化细胞如淋巴细胞、肠粘膜上皮细胞等的重要能量底物^[2]。同时,GLN 是蛋白质代谢的重要调节因子,如促进细胞内蛋白质等生物大分子合成,减少骨骼肌中蛋白质的分解。Hwang 的研究证明含谷氨酰

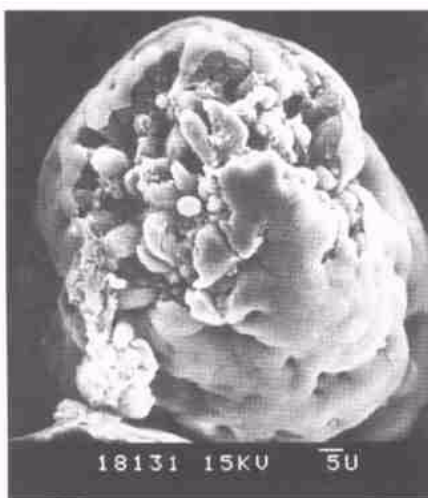


图 1 对照组 35 日龄仔猪肠绒毛扫描电镜观察(×600)

Fig. 1 SEM of intestinal villus of piglet at the 35 d of age in control group(×600)



图 2 试验组 35 日龄仔猪肠绒毛扫描电镜观察(×600)

Fig. 2 SEM of intestinal villus of piglet at the 35 d of age in treatment group(×600)

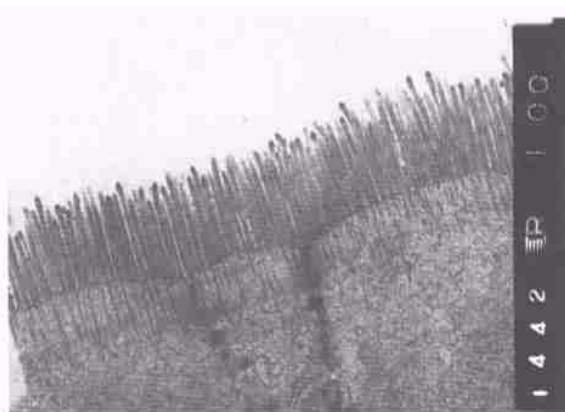


图 3 试验组仔猪 35 日龄肠微绒毛透射电镜观察(×6000)

Fig. 3 EM of intestinal microvillus of piglets at the 35 d of age in treatment group(×6000)

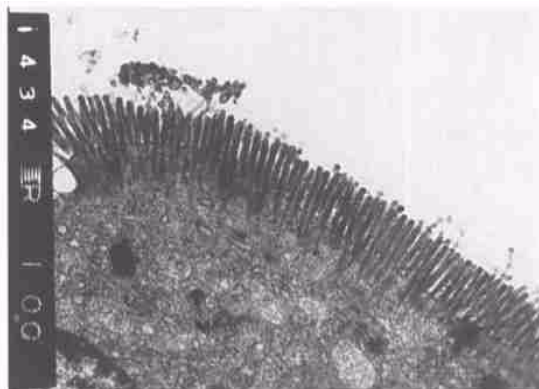


图 4 对照组仔猪 35 日龄肠微绒毛透射电镜观察(×6000)

Fig. 4 EM of intestinal microvillus of piglets at the 35 d of age in control group(×6000)

胺的肠外营养可增加人空肠粘膜重和 DNA 的含量^[4], Grant 的研究也表明供给谷氨酰胺的肠外营养增加肠道氮含量^[5], 刘民航等报道在烧伤后大鼠的饲料中补充 2% 和 5% 的谷氨酰胺与对照组和补充甘氨酸组相比, 小肠粘膜的蛋白质、DNA 均明显提高^[6]。Ayonrinde 等用含 4% 谷氨酰胺或 4% 甘氨酸强化传统的谷物基础断奶仔猪日粮, 在断奶后第 5 天屠宰所有的猪, 发现饲喂谷氨酰胺的仔猪其结肠和回肠 DNA 含量和粘膜蛋白质含量增加^[7]。Gate 等在绵羊上的试验结果表明, 绝大多数谷氨酰胺参与组成了蛋白质、RNA 和 DNA^[8]。本试验结果表明, 日粮添加谷氨酰胺可显著增加试验组仔猪空肠粘膜的 DNA 含量, 而对回肠粘膜 DNA 含量无显著影响。在本试验中未发现日粮添加谷氨酰胺对肠道蛋白质含量有显著影响, 这与以前的研究并不完全相同, 但这也许与本试验中仔猪的生理状况接近正常有关。

3.2 日粮添加谷氨酰胺对仔猪肠粘膜形态的影响

Wu 等报道了在玉米-豆粕的日粮中添加 1% 的谷氨酰胺可在断奶后第 7 天防止空肠绒毛萎缩。Ayonrinde 等在断奶后第 5 天发现饲喂含外源谷氨酰胺日粮的仔猪有更高的血浆谷氨酰胺浓度, 谷氨酰胺还可缓解绒毛萎缩^[7]。Khan 等研究表明, 谷氨酰胺能促进隐窝细胞增生, 促进肠腔内粘液凝滞体的分泌, 因为谷氨酰胺是糖蛋白的重要组成部分之一, 而糖蛋白是构成肠腔粘液的主要成分, 其试验结果表明, 丙氨酰谷氨酰胺在肠外营养中可增加大鼠肠腔粘液凝滞体和降低肠道的通透性, 而谷氨酰胺同样也可以降低大鼠肠道的通透性^[9]。Klimberg 的研究表明, 人腹腔放疗后口服谷氨酰胺可加快小

肠的恢复,其扫描电镜的观察表明口服谷氨酰胺有利于维持空肠上皮的完整性^[10]。本试验结果表明,日粮添加谷氨酰胺未见对十二指肠绒毛造成明显的影响,而添加谷氨酰胺后空肠绒毛高度和粘膜厚度明显高于未添加组。扫描电镜的结果表明,日粮添加谷氨酰胺可减少空肠上皮细胞损伤。透射电镜的结果表明,谷氨酰胺能明显改善空肠中段肠微绒毛的生长发育状况。这与 Klimberg 的研究结果基本一致。笔者研究表明,GLN 是早期断奶仔猪的条件必需氨基酸,添加 1.2% 的 GLN 可减少仔猪腹泻,促进生长发育;在用生大豆造成的仔猪肠道损伤模型试验中,GLN 可促进仔猪肠道对水分的吸收,减少腹泻发生,但未见对肠道通透性有明显影响^[11]。

笔者认为,关于谷氨酰胺保护肠粘膜结构完整的机理可能是多方面的。首先,谷氨酰胺直接为肠粘膜上皮细胞的再生提供能源和氮源,肠粘膜上皮细胞对谷氨酰胺的利用超过其它任何氨基酸,应激时更为明显。其次,谷氨酰胺间接刺激了肠道营养作用的激素分泌,正常肠道的结构和功能的维持需一定的胃肠道激素的作用。第三,GSH 在谷氨酰胺的营养中也起一定作用。仔猪在断奶后,肠道的组织结构会发生明显的变化,表现为小肠上皮细胞吸附大分子能力下降,以及小肠上皮细胞合成消化酶的功能及吸收氨基酸和葡萄糖的功能丧失。本试验结果也证实谷氨酰胺可作为小肠上皮细胞的能源和合成生物大分子的底物,可以缓解仔猪早期断奶造成的应激,改善肠道的微绒毛损伤,增加肠道消化酶分泌,有利于保护肠微绒毛的良好生长,从而提高断奶仔猪对饲料养分的消化率,增强肠上皮细胞对养分和电解质的吸收能力。

References

- [1] Windmueller H G, Spaeth A E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J. Biol. Chem.* 1974, 249: 5 070 - 5 079 .
- [2] Souba W W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 1993, 4:2 - 9 .
- [3] Wu G Y, Meier S A, Knable D A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *J. Nutr.* 1996, 126:2 578 - 2 584 .
- [4] Hwang T L, O' Dwyer S T, Smith R J, Wilmore D W. Preservation of small bowel mucosa using glutamine enriched parental nutrition. *Surg. Forum.* 1986, 38 :56 - 58 .
- [5] Grant J. Use of L-glutamine in total parenteral nutrition. *J. Surg. Res.* 1988, 44(5) :506 - 513 .
- [6] Liu M H, Gao L X. The effect of oral glutamine supplementation on small intestinal function in burned rats. *Acta Nutritional Sinica*, 1995, 17(1) :17 - 21 .(in Chinese)
刘民航,高兰兴.经口补充谷氨酰胺对烧伤大鼠小肠功能的影响. *营养学报*, 1995, 17(1) :17 - 21 .
- [7] Ayonrinde A I, Williams I H, Mccauley R, Mullan B P. Glutamine stimulates intestinal hyperplasia in weaned piglets. *Manipulating Pig Production V. Australasian Pig Science Association*. Werribee, Vitoria, Australia, 1995:180 .
- [8] Gate J J, Parker D S, Lobleby G E. The metabolic fate of the amino N group of glutamine in the tissues of the gastrointestinal tract in 24 h fasted sheep. *British Journal of Nutrition*, 1999, 81 :297 - 306 .
- [9] Khan J, Yasuhiko Iiboshi. Alanyl-glutamine supplemented parenteral nutrition increases luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1999, 23(1) :24 - 31 .
- [10] Klimberg V S, Souba W W, Dolson D J. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*, 1990, 66 :62 - 68 .
- [11] Zhang J M. *Studies on the protective effect and mechanism of glutamine on intestine in early-weaned piglets*. Dissertation for Degree of Ph D. School of Graduated Student. CAAS. 2000 : 93 - 99 .(in Chinese)
张军民.谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道的保护作用及其机理研究. *中国农业科学院研究生院博士学位论文*. 2000 : 93 - 99 .