

谷氨酰胺对肉仔鸡肠道黏膜淋巴细胞增殖活性、氧化应激和免疫应激的调控作用

杨小军 高泽 刘凯 王益兵 覃定奎 姚军虎*

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 本试验旨在通过体外细胞培养技术培养肉仔鸡肠道淋巴细胞, 建立体外脂多糖(LPS)和双氧水(H_2O_2)应激模型, 研究不同浓度的谷氨酰胺(Gln)对肉仔鸡淋巴细胞增殖活性和抗氧化的调控作用, 为Gln营养改善肠道健康状态提供理论依据。从肉仔鸡空肠分离出淋巴细胞, 制得细胞悬液, 在Gln终浓度分别为0、10、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的200 μL 培养体系中培养24 h, 然后加入LPS刺激, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定淋巴细胞增殖情况。用0.3 mmol/L的 H_2O_2 刺激肠道黏膜模拟氧化应激环境, 收集培养的细胞上清液, 测定氧化应激和免疫应激指标。结果表明: 当添加Gln浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其对淋巴细胞增殖活性的抑制效果最为明显。当Gln浓度为50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 显著提高了肉仔鸡肠道淋巴细胞中过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性($P < 0.05$); 随着Gln浓度继续升高, 当其为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CAT和SOD活性呈下降趋势($P > 0.05$); 未添加Gln组肠道淋巴细胞丙二醛含量显著高于添加组($P < 0.05$), 各添加组间无显著差异($P > 0.05$)。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gln组肉仔鸡肠道淋巴细胞中免疫球蛋白A(IgA)含量显著高于其他各组($P < 0.05$)。由此可知, 当Gln浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其对肉仔鸡肠道淋巴细胞增殖活性的抑制效果最为明显, 并提高了IgA合成量, 有利于维持免疫系统的平衡状态; 当Gln浓度为50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 显著提高了CAT和SOD活性, 有利于维护肉仔鸡肠道的抗氧化功能。

关键词: 谷氨酰胺; 肉仔鸡; 肠道淋巴细胞; 氧化应激; 免疫应激

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)02-0274-06

胃肠道作为机体的一个重要组成部分既是食物消化吸收的主要场所, 又是大多数病原侵入机体的主要门户。近10年来, 由于全胃肠外营养(TPN)和要素饮食等方面的研究和应用, 人们发现肠道营养对肠道黏膜免疫有较大影响^[1-3]。谷氨酰胺(glutamine, Gln)是动物体内含量最丰富的氨基酸之一, 为条件性必需氨基酸, 可作为反映动物免疫功能强弱的一个有效指标^[4]。在应激条件下, 动物机体对Gln的需要量大大超过了机体合成Gln的能力, 这时体内Gln含量降低, 蛋白质

合成减少, 出现小肠黏膜萎缩与免疫功能和抗氧化功能低下等现象, Gln对维护动物肠道黏膜屏障发挥重要的作用, 并可提高动物生产性能^[5-6]。Dong等^[7]研究发现, 蛋鸡饲料添加0.8% Gln可以明显改善蛋鸡十二指肠和输卵管的发育, 并显著提高产蛋率。Gln可以为快速分裂细胞, 如肠黏膜上皮细胞和活化的淋巴细胞等提供能源, 也可在促进受损伤肠道的修复以及维持正常的局部免疫功能中发挥着其他氨基酸不可替代的作用^[8]。在短暂的生长周期中, 肉仔鸡肠道会接触大量的

收稿日期: 2010-07-29

基金项目: 陕西省自然科学基金(2010JQ3002), 动物营养学国家重点实验室项目(2004DA125184F0809), 中央高校基本科研业务费专项资金资助(QN2009020)

作者简介: 杨小军(1976—), 男, 河北唐山人, 博士, 副教授, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: yangxj@nwsuaf.edu.cn

* 通讯作者: 姚军虎, 教授, 博士生导师, E-mail: yaojunhu2004@sohu.com

致病性抗原,肠道黏膜免疫系统生理功能很难在短时期内发育完善而多会在肉仔鸡生长前期出现肠道炎症性疾病。本试验用2种不同应激原刺激肉仔鸡肠道黏膜淋巴细胞,建立体外肠道黏膜氧化应激和免疫应激模型,旨在通过在肠道黏膜淋巴细胞水平上研究Gln对应激原刺激后的肠道淋巴细胞抗氧化及抗免疫应激的调控作用,为Gln营养改善肉仔鸡肠道健康状态提供更为直接的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

二氧化碳培养箱(Thermo)、酶标仪(BioTek, Power Wave XS2)、超净台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司)、倒置相差显微镜(Nikon, Eclipse E200)、离心机(Sigma)。

脂多糖(LPS)、Gln、胶原酶-I、氨苄青霉素、硫酸链霉素均购自Sigma公司;淋巴细胞分离液购自上海瀚洋生物制品公司;小牛血清购自浙江杭州四季青公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Amresco公司;RPMI 1640培养液购自Gibco公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量检测试剂盒均购自南京建成生物技术有限公司;免疫球蛋白A(IgA)含量检测试剂盒购自美国Bethyl公司。

1.2 淋巴细胞的分离

取健康状况良好的21日龄爱拔益加(Arbor Acres, AA)肉仔鸡,处死后置75%酒精中消毒10 min,打开腹腔,截取3~5 cm空肠组织,置于磷酸盐缓冲液(PBS)中,彻底清除肠内容物,去除肠系膜、血管和结缔组织,纵向剪开肠道,用PBS冲洗空肠组织4~5次。将清洗干净的空肠组织转入干净的玻璃培养皿中,平面铺开,加入0.01%胶原酶-I 1 mL,置5% CO₂ 37℃培养箱中消化30 min。加入含有10%小牛血清的RPMI 1640培养液1 mL终止消化。取5 mL离心管加淋巴细胞分离液2 mL,然后将收集的酶消化液缓缓加入淋巴分离液中,2 000 r/min离心15 min,收集淋巴细胞层。吸取淋巴细胞层转移至5 mL离心管中,加入RPMI 1640培养液冲洗3遍,每次洗涤后均于1 500 r/min离心15 min。沉淀用RPMI 1640培养液重悬,台盼蓝染色后计数,调整细胞浓度至1 ×

10⁶个/mL,方法参照Yang等^[9]。

1.3 MTT法检测不同Gln浓度对LPS诱导的B淋巴细胞转化率的影响

预先将Gln稀释成一定的浓度梯度(0、10、50、100、200 μg/mL),然后将细胞悬液加入96孔培养板中,加入不同浓度的Gln 20 μL,用RPMI 1640完全培养液将每孔调整到200 μL,则在此培养体系中Gln的终浓度分别为0、10、50、100、200 μg/mL。置5% CO₂ 37℃培养箱中培养24 h后,加入LPS(终浓度为15 μg/mL),然后继续培养48 h。培养结束前6 h,每孔加入10 μL MTT(初始浓度为5 mg/mL),继续培养。培养结束后,每孔加入100 μL 10% SDS-0.04 mol/L HCl溶液,继续培养2 h,使紫色结晶完全溶解,用酶联免疫检测仪在570 nm波长下测定OD值。

1.4 测定Gln对氧化应激和免疫应激的调控作用

分离肉仔鸡肠道黏膜淋巴细胞,用0.3 mmol/L双氧水(H₂O₂)刺激30 min,模拟氧化应激环境,筛选肠道黏膜氧化应激的敏感指标。收集培养的细胞上清液,测定各种氧化应激指标和免疫应激指标。分光光度法检测SOD、GSH-Px和CAT活性及MDA含量,具体检测方法依据相应试剂盒进行。IgA含量的检测参照Bethyl试剂盒进行。

1.5 数据统计

试验数据采用Excel和SPSS 13.0软件ANOVA程序进行统计分析,Duncan氏法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 淋巴细胞分离效果

由图1可知,肉仔鸡肠道淋巴细胞分离效果好(成活率>99%),符合细胞培养要求。由图2可以看出,肠道淋巴细胞培养条件合适,能够满足后续免疫和抗氧化指标检测。

2.2 肉仔鸡肠道B淋巴细胞体外培养最适LPS浓度选择

由图3显示了由不同浓度LPS对肉仔鸡肠道B淋巴细胞的刺激指数(SI)而得到的回归曲线(回归方程为:SI = 11.671x² - 0.484x + 92.042, R² = 0.854, P < 0.05,其中x为LPS的浓度)。在本试验的各处理中,当LPS浓度为10 μg/mL时,能显著提高B淋巴细胞的刺激指数(P < 0.05)。当LPS浓度为20 μg/mL时,与LPS浓度为10 μg/mL

时相比, B 淋巴细胞刺激指数显著下降 ($P < 0.05$), 引起淋巴细胞的增殖活性下降, 但与不添加 LPS 的处理相比, 仍能显著提高 B 淋巴细胞的

刺激指数 ($P < 0.05$)。由此可知, 肉鸡肠道淋巴细胞培养的最适 LPS 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

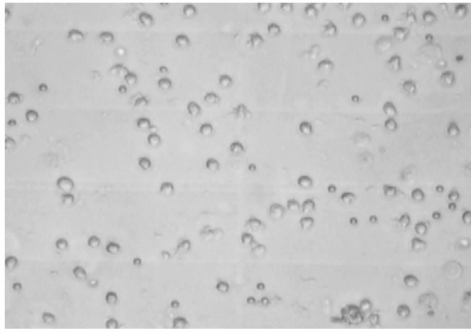


图 1 肉仔鸡肠道淋巴细胞

Fig. 1 Intestinal lymphocytes of broilers ($\times 200$)

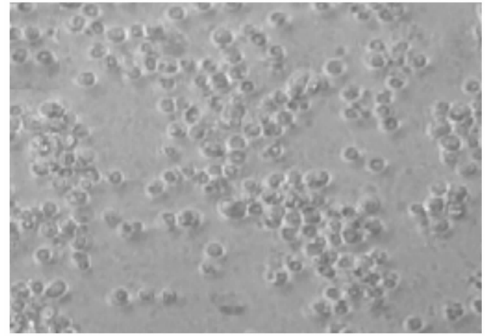


图 2 培养 24 h 后的淋巴细胞

Fig. 2 Lymphocytes cultured for 24 h ($\times 200$)

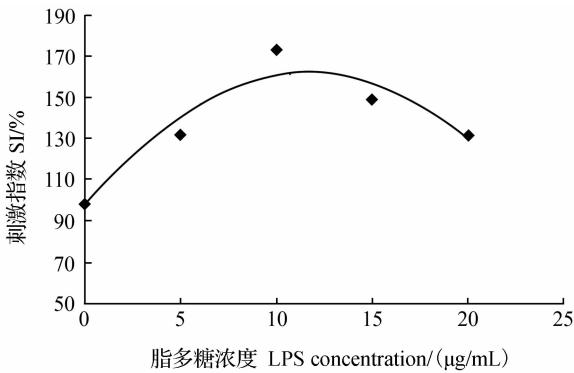


图 3 不同浓度的 LPS 对肉仔鸡肠道 B 淋巴细胞刺激指数的影响

Fig. 3 Effects of different LPS concentrations on the stimulation index of intestinal B lymphocyte of broilers

2.3 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞刺激指数的影响

图 4 显示了不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞刺激指数的影响。当刺激肉仔鸡肠道淋巴细胞的 LPS 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 即 Gln 浓度分别为 $10, 50, 100$ 和 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 均可显著降低肉鸡肠道淋巴细胞的刺激指数 ($P < 0.05$), 且不同 Gln 添加水平处理间差异显著 ($P < 0.05$), 添加 Gln 浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用效果最为显著。

2.4 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞氧化应激的影响

由表 1 可知, 当 Gln 浓度为 50 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 显著提高了肉仔鸡肠道淋巴细胞中 CAT 和

SOD 活性 ($P < 0.05$); 随着 Gln 浓度继续升高, 当其为 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CAT 和 SOD 活性呈下降趋势 ($P > 0.05$)。不同浓度的 Gln 均未对 GSH-Px 活性产生显著影响 ($P > 0.05$)。未添加 Gln 组肠道淋巴细胞过氧化产物 MDA 含量显著高于添加组 ($P < 0.05$), 各添加组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

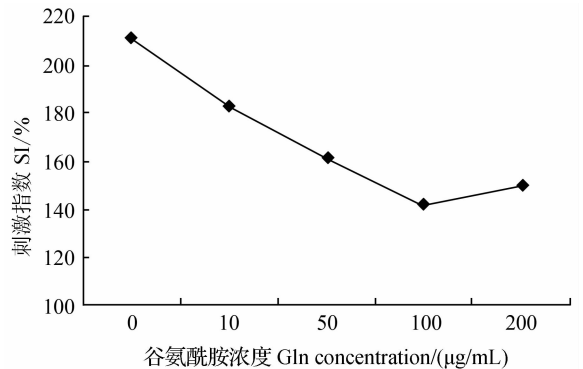


图 4 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞刺激指数的影响

Fig. 4 Effects of different Gln concentrations on the stimulation index of intestinal lymphocyte of broilers

2.5 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞免疫球蛋白的影响

由表 2 可知, 当 Gln 浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肉仔鸡肠道淋巴细胞 IgA 含量显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道氧化应激指标的影响

Table 1 Effects of different Gln concentrations on the parameters of intestinal oxidation stress of broilers

项目 Items	过氧化氢酶 CAT	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	丙二醛 MDA	超氧化物歧化酶 SOD	
谷氨酰胺浓度 Gln concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0.597 ^b	0.218	0.024 ^a	0.228 ^b
	10	0.617 ^b	0.223	0.013 ^b	0.288 ^{ab}
	50	0.718 ^a	0.230	0.013 ^b	0.315 ^a
	100	0.750 ^a	0.225	0.013 ^b	0.318 ^a
	200	0.697 ^{ab}	0.220	0.013 ^b	0.288 ^{ab}
SEM		0.089	0.078	0.096	0.099
P 值 P-value	直线 Linear	0.014	0.120	0.031	0.043
	二次曲线 Quadratic	0.010	0.090	0.042	0.018

同一列平均值具有不同肩标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Means in the same column without the same letter superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

表 2 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞 IgA 含量的影响

Table 2 Effects of different Gln concentrations on IgA content in intestinal lymphocytes of broilers

项目 Items	谷氨酰胺浓度 Gln concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)					SEM	P 值 P-value	
	0	10	50	100	200		直线 Linear	二次曲线 Quadratic
免疫球蛋白 A IgA	0.233 ^b	0.243 ^b	0.244 ^b	0.457 ^a	0.233 ^b	0.054	0.024	0.019

同一行平均值具有不同肩标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Means in the same row without the same letter superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞免疫功能的影响

Fasina 等^[10]报道, 饲粮添加 Gln 可明显改善感染沙门氏菌肉仔鸡的体增重, 但改善肉仔鸡沙门氏菌定植情况的最适添加量还没有确定。谷氨酸 (Glu) 是血液含量最多的氨基酸, 是肠道细胞的理想能量来源, 可有效促进黏膜生长。但有关机制并不清楚, 研究发现加入 1 mmol/L Glu 可促进小鼠肠上皮细胞生长, 并研究发现其作用是经细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路介导的, 抑制细胞凋亡, 维持小肠稳态^[11]。当刺激肉仔鸡肠道淋巴细胞的 LPS 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 即 Gln 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 淋巴细胞的刺激指数降到最低, 对其抑制作用效果最为显著, 提示 Gln 能够有效缓解因免疫应激而导致的肉仔鸡肠道炎症的发生, 此研究结果与崔巍等^[12]研究结果相似。造成此现象的原因可能是低浓度的 Gln 能刺激一氧化氮

(NO) 的产生。因为 NO 是巨噬细胞 ($M\phi$) 的效应分子, 能杀灭微生物和肿瘤细胞, 因此提示 Gln 能增强肉仔鸡非特异性免疫功能, 并且介导 $M\phi$ 的吞噬作用。本试验结果显示, 当 Gln 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肉仔鸡肠道淋巴细胞中 IgA 含量显著高于其他组。刘涛^[13]报道, 外源添加 Gln 后, IgA 阳性细胞数与断奶前无显著差异, 但与断奶后相比有显著提高。Gln 通过降低肠道的通透性改善了肠道的屏障功能, 减少了细菌的移位, 其通透性的改善很可能与肠黏膜的结构和功能的改善有关^[14]。Bacquer 等^[15]试验证明, Gln 通过转氨基生成 Glu 的过程参与了对肠细胞的保护作用。因此, Gln 的促黏膜屏障功能很可能是通过直接参与黏膜中氨基己糖的合成来实现的^[5]。

3.2 不同浓度的 Gln 对肉仔鸡肠道淋巴细胞氧化应激的影响

当 Gln 浓度为 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 显著提高了肉仔鸡肠道淋巴细胞中 CAT 和 SOD 活性。动

物机体内 SOD 在清除自由基、抗氧化损伤和维持细胞的结构方面都起主要作用。CAT 存在于红细胞及某些组织内的过氧化体中,它的主要作用就是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 ,使 H_2O_2 不与 O_2 在铁螯合物作用下反应生成有害的 $\cdot OH$,保护机体细胞稳定的内环境及细胞的正常生活。在本试验中,Gln 对 CAT 活性的提高表明 Gln 能拮抗 H_2O_2 的氧化损伤。Fischer da Silva 等^[16]研究发现,饲料中添加 1% Gln 可以提高处于早期阶段雏鸡小肠绒毛的密度和宽度,并增加空肠细胞的表面积。这表明,Gln 不仅可以作为肠道早期营养的调节因子,而且对于缓解肠道应激也具有十分重要的作用。

4 结 论

① 当 Gln 浓度为 100 $\mu g/mL$ 时,其对肉仔鸡肠道淋巴细胞增殖活性的抑制效果最为明显,并可提高 IgA 合成量,有利于维持免疫系统的平衡状态。

② 当 Gln 浓度为 50 和 100 $\mu g/mL$ 时,可显著提高肉仔鸡肠道淋巴细胞 CAT 和 SOD 活性,有利于维护肠道的抗氧化功能。

参考文献:

- [1] CHAMORRO S, DE BLAS C, GRANT G, et al. Effect of dietary supplementation with glutamine and a combination of glutamine-arginine on intestinal health in twenty-five-day-old weaned rabbits[J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88:170 – 180.
- [2] TIAN J Q, HAO L, CHANDRA P, et al. Dietary glutamine and oral antibiotics each improve indexes of gut barrier function in rat short bowel syndrome[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 296:G348 – G355.
- [3] JIANG Z Y, SUN L H, LIN Y C, et al. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87:4050 – 4056.
- [4] XIE Y L, MA C Y, GUAN X. Effect of free and peptide-bound glutamine supplementation and preparation [J]. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 2010, 21: 50 – 52.
- [5] LI Y, CHEN Y, ZHANG J, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats[J]. *American Journal of Surgery*, 2010, 199: 35 – 42.
- [6] DE ABREU M L T, DONZELE J L, SARAIVA A, et al. Glutamine, nucleotides and swine plasma in diets for weaned piglets [J]. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 2010, 39:520 – 525.
- [7] DONG X Y, YANG C F, TANG S Q, et al. Effect and mechanism of glutamine on productive performance and egg quality of laying hens [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, 23: 1049 – 1056.
- [8] VAN DER SCHOOR S R D, SCHIERBEEK H, BET P M, et al. Majority of dietary glutamine is utilized in first pass in preterm infants [J]. *Pediatric Research*, 2010, 67:194 – 199.
- [9] YANG X J, GUO Y M. Modulation of intestinal mucosal immunity by dietary polyunsaturated fatty acids in chickens [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2006, 17:129 – 137.
- [10] FASINA Y O, BOWERS J B, HESS J B, et al. Effect of dietary glutamine supplementation on *Salmonella* colonization in the ceca of young broiler chicks [J]. *Poultry Science*, 2010, 89:1042 – 1048.
- [11] LARSON S D, LI J, CHUNG D H, et al. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 293: G1262 – G1271.
- [12] 崔巍, 闻颖, 董亚珺, 等. 谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16:3729 – 3733.
- [13] 刘涛. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道营养与免疫功能影响机理的研究 [D]. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2002.
- [14] WHITE J S, HOPER M, PARKS R W, et al. Glutamine improves intestinal barrier function in experimental biliary obstruction [J]. *European Surgical Research*, 2005, 37:342 – 347.
- [15] BACQUER O L, LABOISSE C, DARMAUN D. Glutamine preserves protein synthesis and paracellular permeability in Caco-2 cells submitted to “luminal

- fasting” [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver, 2003, 285:G128 – G136.
- [16] FISCHER DA SILVA A V, MAIORKA A, BORGES S A, et al. Surface area of the tip of the entero-

cytes in small intestine mucosa of broilers submitted to early feed restriction and supplemented with glutamine [J]. International Journal of Poultry Sciences, 2007, 6:31 – 35.

Modulation of Glutamine in Proliferative Activity, Oxidative and Immune Stress of Intestinal Lymphocytes of Broilers

YANG Xiaojun GAO Ze LIU Kai WANG Yibing QIN Dingkui YAO Junhu*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: This experiment was conducted to culture broiler intestinal lymphocytes by the technology of *in vitro* cell culture, establish *in vitro* stress model of lipopolysaccharides (LPS) and H₂O₂, study the modulation of different levels of glutamine (Gln) on proliferative activity and antioxidation of broiler lymphocytes, and finally provide a theoretical basis for the improvement of intestinal health by Gln. Separate lymphocytes from broiler jejunum and make them into cell suspension. Culture the cells for 24 h in 200 μL solutions with 0, 10, 50, 100, 200 μg/mL Gln, respectively. Add LPS into the solutions and test cell proliferation by MTT method. Imitate the condition of oxidative stress by stimulating intestinal mucous membrane with 0.3 mmol/L H₂O₂. Collect the supernatant and test the oxidative and immune stress parameters. The results showed as follows: 1) the 100 μg/mL level of Gln had the most obvious inhibiting effect on lymphocyte proliferative activity. 2) The 50 and 100 μg/mL levels of Gln could significantly increase the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in intestinal lymphocytes of broilers ($P < 0.05$), while the activities of CAT and SOD began to decrease when the Gln level was 200 μg/mL; the malondialdehyde (MDA) content in 0 μg/mL Gln group was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), and there were no significant differences among Gln groups ($P > 0.05$). 3) The immunoglobulin A (IgA) content in intestinal lymphocytes of broilers in 100 μg/mL Gln group was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$). In conclusion, the 100 μg/mL level of Gln has the most obvious effect on suppressing proliferative activity of intestinal lymphocytes of broilers, and it increases IgA content, which is good for the maintenance of immune system balance; 50 and 100 μg/mL level of Gln can significantly increase the activities of CAT and SOD, which is good for the maintenance of antioxidant function of broiler intestine. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(2):274-279]

Key words: glutamine; broiler; intestinal lymphocytes; oxidative stress; immune stress

* Corresponding author, professor, E-mail: yaojunhu2004@sohu.com