

叶酸对初产母猪繁殖性能和宫内发育迟缓仔猪肾脏功能基因表达的影响

刘静波 姚英 余冰 陈代文*

(四川农业大学动物营养研究所,雅安 625014)

摘要: 本试验旨在研究叶酸对初产母猪繁殖性能和宫内发育迟缓(IUGR)仔猪肾脏 DNA 甲基转移酶-1(DNMT-1)、p53 基因、Bcl-2、Bax 和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)基因表达的影响。选用 24 头初产母猪,配种后将母猪随机分为对照组(C,1.3 mg/kg 叶酸)和试验组(F,30.0 mg/kg 叶酸),每组 12 个重复,每个重复 1 头母猪,记录母猪分娩 24 h 内的繁殖性能指标以及 21 日龄断奶时的仔猪断奶重;采集母猪妊娠 60 d 时血清,以及正常出生体重(NBW)和 IUGR 新生仔猪血清和肾脏,用放射免疫分析法测定血清叶酸浓度;用荧光定量 PCR(RT-PCR)方法研究 DNMT-1、p53 基因、Bcl-2、Bax 和 IGF-1 在肾脏中的表达差异。结果表明:母体添加 30.0 mg/kg 叶酸极显著提高初产母猪和新生仔猪血清叶酸含量($P < 0.01$),但对初产母猪繁殖性能无显著影响($P > 0.05$)。IUGR + C 组 DNMT-1 表达量显著低于 NBW 组($P < 0.05$);IUGR + C 组 p53 表达量极显著高于 NBW 组和 IUGR + F 组($P < 0.01$);IUGR + C 组 Bcl-2 表达量极显著低于 NBW 组和 IUGR + F 组($P < 0.01$);IUGR + F 组 DNMT-1、p53 和 Bcl-2 表达量与 NBW 组差异不显著($P > 0.05$);IUGR 组 Bax 表达量显著高于 NBW 组($P < 0.05$);IUGR 组 IGF-1 表达量显著低于 NBW 组($P < 0.05$);IUGR 组和 NBW 组的 Bax 和 IGF-1 表达量组内差异都不显著($P > 0.05$)。以上结果揭示出:补充叶酸对初产母猪繁殖性能无显著影响,极显著提高初产母猪和新生仔猪血清叶酸含量。通过母体补充叶酸可缓解 IUGR 对 DNMT-1、p53 和 Bcl-2 基因表达的影响。

关键词: 叶酸;初产母猪;繁殖性能;基因表达;宫内发育迟缓

中图分类号: S828;S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2010)02-0278-07

叶酸作为重要的 B 族维生素,可通过降低胚胎死亡率来改善母猪繁殖性能^[1-2]。宫内发育迟缓(IUGR)是指哺乳动物胚胎或器官在妊娠期内的生长发育受损,在猪上通常将初生重 < 1.1 kg 的个体定义为 IUGR,而正常个体体重(NBW) > 1.4 kg^[3]。IUGR 个体存活率、养分利用率、能量代谢、胴体组成和长期健康均受显著影响^[3]。妊娠期养分摄入对后天生产性能产生长期影响,说明基因表达发生了相对稳定持久的改变^[4]。DNA 甲基化可通过对染色体的共价修饰改变基因表达,且哺乳动物 DNA 甲基化模式主要在子宫内形成^[5]。DNA 甲基化酶-1(DNMT-1)对于维持正确的甲基化模式和胚胎发育来说必不可少^[6]。前期研究表明,IUGR 显著影响肝脏、肾脏 DNMT-1 基因表达量,且可通过改变 p53 基因启动子甲基化模式调控其 mRNA 水平^[7]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋

白 Bax 在细胞凋亡过程中发挥着重要调节作用,其 mRNA 表达量在 IUGR 个体上发生显著改变^[7-8]。除此之外,Gobe 等^[9]发现肾脏 Bcl-2 基因表达量与胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达量显著相关。叶酸通过调节一碳单位代谢可影响基因甲基化模式和 mRNA 表达量^[10]。表观遗传学研究显示:妊娠期蛋白质摄入不足诱导的 IUGR 可显著改变后代个体肝脏基因甲基化模式及 mRNA 水平;通过母体补充叶酸可在一定程度上缓解上述效应,但具有基因特异性^[11]。以上研究结果表明:母体补充叶酸可缓解胚胎妊娠期由于养分摄入不足对基因表达造成的影响。因而本研究通过母体补充叶酸,考察其对初产母猪繁殖性能和宫内发育迟缓仔猪肾脏基因表达的影响,为通过营养途径缓解初产母猪妊娠期营养不良对仔猪后天生长发育影响的基础研究提供理论依据。

收稿日期:2009-10-22

基金项目:教育部创新团队猪抗病营养分子机制研究项目(IRTO555-5)

作者简介:刘静波(1985-),男,四川德阳人,硕士,主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: ljb20030834@163.com

* 通讯作者:陈代文,博士,教授,博士生导师,E-mail: chendwz@sicau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验动物及处理

试验选取体况基本一致的大约克初产母猪 24 头。母猪第 3 个情期的“静立反射”开始后第 12 小时和第 24 小时由同一操作熟练的技术人员实施人工授精 2 次,精液来源一致。配种后母猪随机分到 2 组中,每组 12 个重复,每个重复 1 头猪。试验从母猪配种开始直到仔猪 21 日龄断奶。

1.2 试验设计

试验采用单因子试验设计,将初产母猪分为 2 组,

妊娠期对照组饲喂基础饲料(叶酸含量 1.3 mg/kg),试验组在基础饲料中添加叶酸(叶酸含量 30.0 mg/kg),其中基础饲料参照 NRC(1998)母猪营养需要配制,饲料组成及营养水平见表 1。进入哺乳期母猪均采食同种饲料。根据妊娠期母猪采食日粮不同以及新生仔猪的体重差异,将仔猪分为 NEW + C 组、NEW + F 组、IUGR + C 组和 IUGR + F 组,所有新生仔猪均采食同种乳猪料。

表 1 饲料组成及营养水平(风干基础)
Table 1 Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis, %)

项目 Items	叶酸含量 Folic acid content (mg/kg) ¹⁾	
	1.3	30.0
原料 Ingredients		
玉米 Corn	72.0	72.0
豆粕 Soybean meal (44% CP)	22.0	22.0
鱼粉 Fish meal	2.0	2.0
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.4	1.4
石粉 Limestone	1.6	1.6
食盐 NaCl	0.4	0.4
氯化胆碱 Choline chloride	0.1	0.1
维生素预混料 Vitamin premix ²⁾	0.3	0.3
矿物质预混料 Mineral premix ³⁾	0.2	0.2
合计 Total	100.0	100.0
营养水平 Nutrient levels		
消化能 DE (MJ/kg)	13.8	13.8
粗蛋白质 CP	17.2	17.2
赖氨酸 Lys	0.9	0.9
磷 P	0.7	0.7
钙 Ca	1.2	1.2

¹⁾ 叶酸含量为计算值。Folic acid content was estimated value.

²⁾ 维生素预混料为每千克饲料提供 The vitamin premix provides following per kg of diet: VA 12 800 IU; VD₃ 2 600 IU; VE 44 IU; VK₃ 4 mg; 硫胺素 thiamin 2.4 mg; 核黄素 riboflavin 8.8 mg; VB₆ 3.2 mg; VB₁₂ 0.028 mg; 烟酸 niacin 32 mg; 泛酸 pantothenic acid 24 mg; 生物素 biotin 0.5 mg。

³⁾ 每千克矿物质预混料中含有 Provided per kg of mineral premix: Fe (as ferrous sulfate) 160 mg; Cu (as cupric sulfate) 30 mg; Zn (as zinc sulfate) 160 mg; Mn (as manganous sulfate) 30 mg; Se (as sodium selenite) 0.5 mg; I (as potassium iodide) 0.6 mg。

1.3 饲养管理

妊娠期母猪在限位栏内饲养,每日分别在 08:00 和 16:00 分 2 次饲喂,前期(配种~妊娠 84 d)和后期(妊娠 85 d~分娩)采食量分别为 2 和 3 kg/d,全期自由饮水。哺乳期母猪和新生仔猪自由采食。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 母猪繁殖性能指标测定

分娩 24 h 内,分别记录各组母猪的窝产仔数、窝产活仔数、死胎数并称量仔猪初生重;21 日龄断奶时称量仔猪断奶重。

1.4.2 样品收集及血清叶酸浓度测定

母猪妊娠 60 d 时前腔静脉采血 10 mL, 仔猪出生后颈静脉采血 5 mL, 取血清于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测, 血清叶酸含量采用放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 测定, 采用试剂盒 (MP Biomedicals, Germany, SimulTRAC-SNB Folate Radioassay Kit) 于 SN-695B 型智能放免 γ 计量仪 (上海核所日环光电仪器有限公司) 上进行。各组分别选取 8 头 NBW (1.4~1.5 kg) 和 IUGR (0.8~0.9 kg) 仔猪, 麻醉后迅速取出肾脏于液氮中速冻并转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待提取肾脏总 RNA。

1.4.3 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

按试剂盒 (Trizol Reagent, Invitrogen) 操作说明提取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的肾脏总 RNA。用无 RNase 的 DNase 酶处理, 消除总 RNA 中痕量 DNA 的污染, 用琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性。用核酸蛋白质检测仪 (Beckman DU-800, CA, USA) 于约 260 nm 波长处检测 RNA 的水平和纯度。采用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 反转录反应体系: $2\text{ }\mu\text{L}$ $5\times$ Prime ScriptTM Buffer, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Prime ScriptTM RT Enzyme Mix, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Oligo dT Primer ($50\text{ }\mu\text{mol/L}$), $0.5\text{ }\mu\text{L}$

Random hexamer primers ($100\text{ }\mu\text{mol/L}$), $4\text{ }\mu\text{L}$ 总 RNA, $2.5\text{ }\mu\text{L}$ RNase-free ddH₂O。反转录反应参数: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min; $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 s。反应结束后立即进行 PCR 反应或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.4 Real time PCR 反应

实时荧光定量 PCR, SYBR Green PCR Mix (TaKaRa, Shiga, Japan), 采用 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体系: TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM ($2\times$), $12.5\text{ }\mu\text{L}$; 上、下游引物各 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$; cDNA 模板, $2\text{ }\mu\text{L}$; ddH₂O, $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。用 iQ5TM 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, CA, USA) 分析扩增溶解情况。利用 NCBI 在线资源、Primer5、Oligo6.0 进行引物设计, 由 TaKaRa 公司合成, 引物序列见表 2。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸, 30 s; 共 40 个循环。溶解曲线用于确定扩增产物的特异性, 溶解曲线反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0 s; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0 s (温度变化速率为 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C/s}$)。用琼脂糖凝胶电泳检查产物大小; DNA 序列分析测定产物同一性。每个样品重复 3 次。H₂A 为管家基因, 因 H₂A 基因表达稳定, 可用作内标对不同样品相对转录水平进行定量分析。

表 2 各基因引物序列

Table 2 Primer sequences used for different genes

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	产物大小 Product size (bp)	基因库编号 GenBank accession number
DNA 甲基化酶-1 DNMT-1	F: AGGTGAGGACATGCAGCTTT R: AACTTGTTGTCTCCGTTGG	213	BF198895
p53	F: CACTGGATGGCGAGTATTTTCAC R: CTTAGACTTCAGGTGGCTGGA	152	AF098067
Bcl-2	F: CTGGTGGTTGACTTTCTCTCCT R: TAGGGGTTTCCGCTTCTGAT	124	NM214285
Bax	F: GGTGCGCTTTTCTACTTTG R: CGATCTCGAAGGAAGTCCAG	111	AJ606301.1
胰岛素样生长因子-1 IGF-1	F: CTGAGGAGGCTGGAGATGTACT R: CCTGAACCTCCTCTACTTGTGTTC	136	DQ121132
H ₂ A	F: TGGATGTCCTTGGGCATG R: AGATCCGGCGCTACCAGA	226	BP459633

1.5 数据处理与分析

目的基因 DNMT-1、p53、Bcl-2、Bax、IGF-1 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值方法计算^[12], 血清叶酸浓度及基因相对表达量用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和多重比较。结果以平均值 \pm 标准差表示。以 $P < 0.05$ 为显著标准, $P < 0.01$ 为极显著标准。

2 结果

2.1 补充叶酸对初产母猪繁殖性能的影响

由表 3 可知: 添加 30.0 mg/kg 叶酸使各组初产母猪平均窝产仔数、平均窝产活仔数、仔猪平均出生体重和 21 日龄平均断奶体重分别增加 5.71%、7.14%、1.48% 和 2.58%, 但无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 3 补充叶酸对初产母猪繁殖性能的影响

Table 3 Effects of folic acid supplementation on reproductive performance of gilts

项目 Items	叶酸含量 Folic acid content (mg/kg)	
	1.3	30.0
平均窝产仔数 Average litter size (<i>n</i>)	10.5 ± 2.7	11.1 ± 2.1
平均窝产活仔数 Average alive litter size (<i>n</i>)	9.8 ± 2.4	10.5 ± 1.9
平均出生体重 Average birth weight (kg)	1.35 ± 0.18	1.37 ± 0.12
平均断奶体重 Average weanling weight (kg)	6.21 ± 0.22	6.37 ± 0.21

同行数据肩注不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母为差异极显著 ($P < 0.01$); 含相同字母者或无字母表示差异未达显著水平 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$), while with same letter or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.2 补充叶酸对初产母猪和新生仔猪血清叶酸含量影响

由表 4 可知: 添加 30.0 mg/kg 叶酸使初产母猪血清叶酸含量较对照组提高了 64.58%, 差异达

到极显著水平 ($P < 0.01$); 添加 30.0 mg/kg 叶酸使新生仔猪的血清叶酸含量较对照组有极显著提高 ($P < 0.01$), 组内 NBW 和 IUGR 仔猪血清叶酸含量无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 4 叶酸补充对血清叶酸含量影响

Table 4 Effects of folic acid supplementation on folic acid concentration in serum (nmol/L)

项目 Items	叶酸含量 Folic acid content (mg/kg)	
	1.3	30.0
母猪 Gilts (<i>n</i> = 12)	113.73 ± 8.96 ^B	187.18 ± 6.21 ^A
仔猪 Piglets	正常个体体重 NBW (<i>n</i> = 8)	19.24 ± 1.26 ^B
	宫内发育迟缓 IUGR (<i>n</i> = 8)	18.23 ± 1.65 ^B

同列数据中, 正常个体体重和宫内发育迟缓仔猪之间未标有字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。In the same column, values with no letter superscripts between NBW and IUGR piglets mean no significant difference ($P > 0.05$)。

2.3 补充叶酸对新生仔猪相关基因表达的影响

由图 1 可知: IUGR + C 组 DNMT-1 基因相对表达量显著低于 NBW + C 组、NBW + F 组 ($P < 0.05$), IUGR + F 组、NBW + C 组、NBW + F 组的组间差异不显著 ($P > 0.05$); IUGR + C 组 p53 基因相对表达量极显著高于 NBW + C 组、NBW + F 组和 IUGR + F 组 ($P < 0.01$), IUGR + F 组、NBW + C 组、NBW + F 组的组间差异不显著 ($P > 0.05$); IUGR + C 组 Bcl-2 基因相对表达量极显著低于 NBW + C 组和 NBW + F 组 ($P < 0.01$), 显著低于 IUGR + F 组 ($P < 0.05$), IUGR + F 组、NBW + C 组、NBW + F 组的组间差异不显著 ($P > 0.05$); IUGR 组 Bax 基因相对表达量显著高于 NBW 组 ($P < 0.05$); IUGR 组 IGF-1 基因相对表达量显著低于 NBW 组 ($P < 0.05$)。

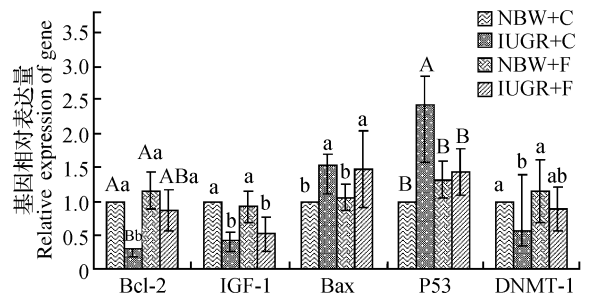


图 1 DNMT-1、p53、Bcl-2、Bax 和 IGF-1 基因 mRNA 相对表达量

Fig. 1 Relative expression of DNMT-1, p53, Bcl-2, Bax and IGF-1 gene

图中相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

In the figure, the same small letters indicated that the means were not significantly different ($P > 0.05$); different small letters indicated that the means were significantly different ($P < 0.05$); different capital letters indicated that the means were significantly different ($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 补充叶酸对初产母猪繁殖性能和血清叶酸含量的影响

本研究表明补充叶酸显著提高母体妊娠中期及新生仔猪血清叶酸浓度,但对产仔数、产活仔数、仔猪平均出生重及 21 日龄平均断奶体重无显著影响。妊娠期间母猪血清叶酸含量呈周期性变化,其中妊娠 60 d 时血清叶酸含量显著下降,而提高饲料叶酸水平可避免血清叶酸浓度在妊娠中期大幅下降^[13]。补充叶酸后仔猪血清叶酸含量显著增加,说明母体叶酸可通过子宫胎盘有效转运至胚胎,以满足其生长发育需要。研究表明妊娠母猪饲料补充叶酸可提高早期胚胎存活率^[2]。配种后补充叶酸直至母猪分娩,可增加经产母猪产仔数,但该效应只在排卵率较高(如孕马血清促性腺激素, PMSG 处理)时差异显著^[1]。以上结果说明,补充叶酸对排卵率较低的初产母猪产仔数、产活仔数、仔猪平均出生重及 21 日龄平均断奶体重无显著影响。叶酸对母猪繁殖性能的改善作用只在母猪排卵率较高时方有所体现。

3.2 叶酸补充对新生仔猪肾脏相关基因表达的影响

基因组甲基化模式主要通过 DNMT-1 来建立和维持^[14]。DNMT-1 在 DNA 甲基化过程中发挥着重要调节作用,敲除该基因会导致基因组甲基化程度降低,致使印迹基因、单等位基因表达抑制,最终导致胚胎死亡^[15]。前期研究表明 IUGR 大鼠胚胎和肾脏中 DNMT-1 基因表达量显著下调,且伴随基因组甲基化模式降低并影响其他相关基因表达量^[7]。叶酸作为一碳单位代谢的重要辅助因子,可通过调控蛋氨酸循环影响基因组甲基化模式及 DNMT-1 基因 mRNA 水平^[16]。除此之外,补充叶酸可缓解母体蛋白质摄入不足诱导的 IUGR 后代大鼠肝脏基因启动子甲基化模式和表达量的影响^[11]。在本研究中,补充叶酸可有效避免 IUGR 仔猪肾脏 DNMT-1 基因 mRNA 表达量的显著下调,与上述研究结果一致。

p53 基因作为重要转录因子在细胞凋亡及肿瘤形成方面的研究中备受关注^[17]。前期研究表明,慢性或急性应激均会上调肾脏 p53 mRNA 表达量并导致细胞凋亡^[18]。大鼠上研究报道, IUGR 导致肾脏细胞凋亡增加, p53 基因启动子甲基化程度降低并上调其 mRNA 水平。本研究中, IUGR 显著上

调 p53 基因在仔猪肾脏中的表达量^[7]。通过母体补充叶酸可下调 IUGR 仔猪肾脏 p53 mRNA 水平,但对 NBW 仔猪无显著影响,说明叶酸对 p53 基因的调节在应激条件下更加有效,当机体叶酸未处于缺乏状态时,对 p53 基因的调节效应不显著。医学上研究发现叶酸缺乏直接导致细胞中 p53 基因表达量的上调并伴随肿瘤发生率增加。

Bcl-2 和 Bax 在细胞凋亡信号转导过程中发挥重要作用, Bax/Bcl-2 是决定细胞凋亡的关键因素^[19]。Bcl-2 作为抗凋亡蛋白,可减少线粒体释放出的细胞色素 C,缓解 Bax 蛋白的促凋亡效应^[19]。Bcl-2 和 Bax 可通过激活 caspase-3 (casp-3) 来影响染色质凝聚和 DNA 断裂,从而调控细胞凋亡^[20]。据前期研究报道, IUGR 增加细胞凋亡的同时上调 Bax、下调 Bcl-2 基因 mRNA 表达量,并增加 casp-3 活性^[7]。也有报道显示转录因子 p53 可上调 Bax、下调 Bcl-2 基因表达量^[18]。本研究发现 IUGR 上调 Bax、下调 Bcl-2 基因 mRNA 水平,与前期研究结果一致。补充叶酸后可缓解 IUGR 对 Bcl-2 基因表达的负面调控,但对 Bax 基因无显著影响。本研究证实了 p53 对 Bcl-2 基因表达的下调效应,但对 Bax 基因表达的调控规律与前期报道存在一定差异,可能是叶酸补充后对二者调控作用大小存在一定差异造成的。

生长因子 IGF-1 的表达受多种影响,包括生长阶段、疾病和营养等。禁食、限食和营养不良均会使 IGF-1 分泌量、基因表达量减少^[21]。母猪上的研究显示妊娠期能量摄入量与血清中 IGF-1 含量及组织中 mRNA 水平呈显著正相关^[22]。IUGR 仔猪主要是由妊娠期血液供给不充分所致^[3],与正常体重仔猪相比能量摄入显著减少。本研究发现 IUGR 显著下调仔猪肾脏 IGF-1 基因 mRNA 水平,补充叶酸后无改善效应。不同动物模型上得到的相同结果证实了 IGF-1 的表达很大程度上取决于能量摄入量^[23]。此外也有研究报道 Bcl-2 基因表达与 IGF-1 表达显著相关^[9],但该效应在本研究中并未有所体现,说明 IGF-1 基因 mRNA 表达量主要受能量水平和内分泌的影响。

4 结论

① 补充叶酸对初产母猪产仔数、产活仔数、仔猪出生重和 21 日龄断奶重无显著影响。

② IUGR 显著影响新生仔猪肾脏 DNMT-1、

p53、Bax、Bcl-2 和 IGF-1 基因 mRNA 相对表达量;通过对母体补充叶酸可有效缓解 IUGR 对 DNMT-1、p53 和 Bcl-2 基因 mRNA 水平的影响。

参考文献:

- [1] Matte J J, Girard C L, Brisson G J. Folic acid and reproductive performances of sows[J]. *Journal of Animal Science*, 1984, 59(4): 1 020-1 025.
- [2] Tremblay G F, Matte J J, Dufour J J, et al. Survival rate and development of fetuses during the first 30 days of gestation after folic acid addition to a swinediet[J]. *Journal of Animal Science*, 1989, 67(3): 724.
- [3] Wu G, Bazer F W, Wallace J M, et al. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(9): 2 316.
- [4] Sinclair K D, Allegrucci C, Singh R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. proceedings of the national academy of sciences[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(49): 19 351-19 356.
- [5] Wu G, Bazer F W, Cudd T A, et al. Maternal nutrition and fetal development[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(9): 2 169-2 172.
- [6] Davis C D, Uthus E O. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(10): 988-995.
- [7] Pham T D, MacLennan N K, Chiu C T, et al. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney[J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2003, 285(5): R962-R970.
- [8] Hockenbery D M, Oltvai Z N, Yin X-M, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis[J]. *Cell*, 1993, 75(2): 241-251.
- [9] Gobe G, Zhang X J, Willgoss D A, et al. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2000, 11(3): 454-467.
- [10] Bailey L B, Gregory J R. Folate metabolism and requirements[J]. *Journal of Nutrition*, 1999, 129(4): 779-782.
- [11] Lillycrop K A, Phillips E S, Jackson A A, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring[J]. *Journal of Nutrition*, 2005, 135(6): 1 382-1 386.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Matte J J, Girard C L, Brisson G J. Serum folates during the reproductive cycle of sows[J]. *Journal of Animal Science*, 1984, 59(1): 158-163.
- [14] Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals[J]. *Human Molecular Genetic*, 2000, 9(16): 2 395-2 402.
- [15] Li E, Bestor T H, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality[J]. *Cell*, 1992, 69(6): 915-926.
- [16] Koutros S, Zhang Y, Zhu Y, et al. Nutrients contributing to one-carbon metabolism and risk of non-hodgkin lymphoma subtypes[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2008, 167(3): 287-294.
- [17] Clarke A R, Purdie C A, Harrison D J, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 849-852.
- [18] Shihab F S, Andoh T F, Tanner A M, et al. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis[J]. *Kidney International*, 1999, 56(6): 2 147-2 159.
- [19] Korsmeyer S J, Shutter J R, Veis D J, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 1993, 4(6): 327-332.
- [20] Porter A G, Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death Difference*, 1999, 6(2): 99-104.
- [21] Thissen J P, Ketelslegers J M, Underwood L E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors[J]. *Endocrine Reviews*, 1994, 15(1): 80-101.
- [22] 王延忠, 郭海燕, 吴德, 等. 营养水平对初产母猪妊娠早期胚胎存活和类胰岛素生长因子-I、胰岛素、生长激素分泌的影响[J]. *动物营养学报*, 2007(7): S831-S835.
- [23] Nemet D, Connolly P H, Pontello-Pescatello A M,

et al. Negative energy balance plays a major role in the IGF- I response to exercise training[J]. Journal

of Applied Physiology, 2004, 96(1): 276-282.

Effects of Folic Acid Supplementation on Reproductive Performance of Gilts and Kidney Functional Gene Expression in Newborn Piglets Suffered Intrauterine Growth Restriction

LIU Jingbo YAO Ying YU Bing CHEN Daiwen*

(Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This experiment was aimed to study the effects of maternal folic acid supplementation on reproductive performance of gilts and kidney mRNA expression of DNA methyltransferase1 (DNMT-1), p53, Bax, Bcl-2 and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) of newborn piglets suffered intrauterine growth restriction (IUGR). Twenty-four gilts were randomly allocated to two groups, control group (C, folic acid 1.3 mg/kg) and folic acid supplementation (F, folic acid 30.0 mg/kg) group with 12 replicates each. Gilts' reproductive performance within 24 h after parturition and weight of weanling piglets at 21-day-old was recorded. Gilts' blood samples at the 60th day of pregnancy, and normal body weight (NBW) and IUGR newborn piglets' blood samples and kidney were collected for serum folic acid concentration test by radio immunoassay. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to determine gene expression differences of DNMT-1, p53, Bcl-2, Bax and IGF-1 in kidney. The results showed as follows: supplementation with 30.0 mg/kg folic acid significantly increased serum folic acid concentration of gilts and piglets ($P < 0.01$), but there was no significant difference in reproductive performance of gilts; real-time PCR indicated that relative mRNA expression of DNMT-1 was lower in IUGR + C group than in NBW groups ($P < 0.05$), and transcript expression level of p53 in IUGR + C group was higher than that in NBW groups and IUGR + F group ($P < 0.01$), while Bcl-2 in IUGR + C group was lower than that in NBW groups and IUGR + F group ($P < 0.01$), and there was no significant difference in expression of DNMT-1, p53 and Bcl-2 between IUGR + F and NBW groups ($P > 0.05$); the expression abundance of Bax was higher in IUGR groups than in NBW groups and the opposite pattern was noted for IGF-1 ($P < 0.05$), no significant differences of kidney Bax and IGF-1 expression was noted within IUGR and NBW groups, respectively ($P > 0.05$). Results indicated that supplementation with folic acid had no effect on gilts' reproductive performance but increased gilts and newborn piglets' serum folic acid concentration; supplementation with folic acid could prevent the negative effects of IUGR on DNMT-1, p53 and Bcl-2 gene expression. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(2): 278-284]

Key words: Folic acid; Gilts; Reproductive performance; Gene expression; Intrauterine growth restriction