

L-精氨酸对 IUGR 仔猪胰岛结构及功能的调控研究

孔令蕊, 王远孝, 李 伟, 董 丽, 张婧菲, 王 恬*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘 要: 本试验旨在研究 L-精氨酸(L-Arg)对子宫内发育迟缓(IUGR)仔猪胰腺生长发育的调控。试验选取 12 头 IUGR 仔猪和 6 头正常仔猪, 哺乳至 7 d 时断奶, 将 IUGR 仔猪随机分为 2 组, 分别饲喂基础人工乳(IUGR 组)、基础人工乳+0.6% Arg(IUGR+Arg 组), 正常仔猪饲喂基础人工乳(NBW 组)。饲喂至 14 d 时每组选取 4 头屠宰取样, 并对胰腺发育相关指标进行测定。结果表明: 受 IUGR 影响, 仔猪胰腺组织中胰岛素(Ins)含量、胰岛面积及 β 细胞质量均显著降低($P < 0.05$), 胰岛细胞数目、Ins 染色阳性率、Ins 阳性表达面积及 Ins 阳性表达细胞数目均极显著减少($P < 0.01$)。IUGR 猪补充 Arg 后, 胰腺绝对重量显著增加($P < 0.05$); Ins 含量、胰岛面积、胰岛细胞数目、 β 细胞质量、Ins 染色阳性率、Ins 阳性表达面积也明显增加($P < 0.01$), 且均与 NBW 猪相比差异不显著($P > 0.05$); 胰岛平均染色光密度明显增加($P < 0.01$), 且显著高于 NBW 猪($P < 0.01$)。结果提示, IUGR 损害仔猪胰腺发育, 补充 Arg 后, IUGR 仔猪胰岛结构得到改善, 胰岛 β 细胞数量增加, 胰岛素合成增多。

关键词: 宫内发育迟缓; 仔猪; L-精氨酸; 胰岛结构; 胰岛素合成

中图分类号: S828; S815.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)11-1781-09

Effects of L-Arg Supplementation on Pancreatic Islet Structure and Function in Intrauterine Growth Retardation Piglets

KONG Ling-rui, WANG Yuan-xiao, LI Wei, DONG Li, ZHANG Jing-fei, WANG Tian*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study was conducted to study the regulation effects of L-Arg on the growth and development of pancreas in intrauterine growth retardation (IUGR) piglets. Twelve IUGR piglets and six normal birth weight (NBW) piglets (Duroc \times Landrace \times Yorkshire) were selected. All piglets were weaned at 7 days of age. Then the IUGR piglets were divided into two groups: IUGR group and IUGR+Arg group, which were supplied with based artificial milk and based artificial milk supplementation with 0.6% Arg, respectively. NBW group was supplied with based artificial milk. Four piglets in each group were slaughtered and sampled at 14 days of age, and the indexes about development of pancreas were measured. The results showed as follows: Pancreatic insulin content, islet area and β -cell mass of IUGR piglets were lower than those of NBW piglets ($P < 0.05$). IUGR significantly reduced the number of islet cells, insulin-positive cell fraction, insulin-positive area and the number of insulin-positive cells ($P < 0.01$). Compared with IUGR control piglets, supplementation with Arg increased body weight and absolute pancreas weight of IUGR piglets ($P < 0.05$), and enhanced pancreatic insulin content, islet area and num-

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771569)

作者简介: 孔令蕊(1985-), 女, 山东聊城人, 博士生, 主要从事动物生长发育的营养调控研究, E-mail: konglingrui123@126.com

* 通信作者: 王 恬, 教授, 博士生导师, E-mail: tianwang@njau.edu.cn

ber of islet cells, as well as β -cell mass, insulin-positive cell fraction and insulin-positive area ($P < 0.01$), which were no significant differences with NBW piglets ($P > 0.05$). The average optical density of IUGR piglets increased by Arg supplementation ($P < 0.01$) and were much higher than that of NBW piglets ($P < 0.01$). These results indicated that IUGR impaired the development of pancreas. L-Arg improved the pancreatic islet structure of IUGR piglets, and increased β -cell mass and insulin synthesis.

Key words: IUGR; piglet; L-arginine; pancreatic islet structure; insulin synthesis

宫内发育迟缓 (Intrauterine growth retardation, IUGR) 是围生期的重要并发症之一, 它不仅降低仔猪初生重和成活率, 而且阻碍生长发育^[1], 自然条件下猪的 IUGR 发生率高达 15%~20%^[2], 给养猪生产造成巨大损失。胰腺由胰岛和腺泡组成, 是兼具内、外分泌功能的器官, 对蛋白质、脂肪及糖类的消化、代谢意义重大。其中胰岛 β 细胞分泌的胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素, 也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素。此外, 对于生长来说, 胰岛素也是不可缺少的激素之一。研究表明, IUGR 会导致猪的胰腺发育受损, 显著降低胰腺重量^[3-4], 降低血清中胰岛素水平^[5], 进而使体内葡萄糖、蛋白质及脂肪代谢紊乱, 而且阻碍生长。在大鼠和羊模型上的研究则更为深入, 已证实 IUGR 会影响胰腺的发育^[6-7], β 细胞的分化^[8-9]、增殖^[8-9] 及内分泌功能的成熟^[10-11], 从而导致胰岛 β 细胞胰岛素分泌不足, 进而引发代谢性疾病^[12-13]。近年来, 人们试图通过营养手段来调控 IUGR 出生儿的生长发育, 从而弥补胎儿期的不足。猪的体格大小、各器官的发生发展、形态结构以及功能均与人类相近, 是一种理想的模型动物, 对 IUGR 猪的营养调控外推至人类更具指导性^[14]。

Arg 作为哺乳仔猪的一种必需氨基酸^[15], 不仅是蛋白质合成的重要原料, 而且是合成一氧化氮 (NO) 的唯一底物; 其代谢产生的鸟氨酸是合成多胺类物质 (如精胺、精胺) 的前体, 而多胺是调节细胞生长和增殖的重要物质^[15]。Arg 还可直接或通过其代谢产物间接促进胰岛素和生长激素的释放^[16-19], 而胰岛素和生长激素均可促进 IGF-I 的释放^[20], 从而调节动物的生长。近年来, 关于仔猪精氨酸营养的研究日益增多, 并取得了较大的进展。S. W. Kim 等报道, 补充 0.2% 和 0.4% 的 Arg 可明显地促进 7~21 d 哺乳仔猪生长^[16]。姚康等^[21] 发现, 添加 0.6% 的 Arg 对 7 日龄哺乳仔猪生长和代谢有明显促进作用。推测对 IUGR 哺乳仔猪补充适量的 Arg, 也可能促进其生长和器官发育。目前关于在哺乳期补

充 Arg 调控仔猪胰腺发育的研究尚未见报道。

本试验以 IUGR 新生仔猪为研究对象, 通过观察其生长发育状况、胰腺组织形态及胰岛素免疫组化量化分析, 评估 IUGR 新生仔猪胰腺的发育及功能变化; 并通过添加外源性 L-Arg, 研究其对 IUGR 仔猪生长发育状况、胰岛素储备及 β 细胞发育的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与分组

试验选用自然状态下产生的 IUGR 猪 (杜长大三元杂交猪) 作为研究对象, 以初生重低于平均初生重 2 个标准差 (SD) 的新生仔猪作为 IUGR 仔猪, 初生重在 1 个 SD 内的新生仔猪作为正常仔猪^[22]。试验共选取 12 头初生重为 (0.926 ± 0.105) kg 的 IUGR 仔猪和 6 头初生重为 (1.672 ± 0.134) kg 的正常仔猪, 随母猪哺乳至 7 d 时断奶, 然后将 IUGR 仔猪随机分为 2 组: IUGR 组和 IUGR+Arg 组, 分别饲喂基础人工乳和基础人工乳+0.6% Arg, 正常仔猪为 1 组 (NBW 组), 饲喂基础人工乳。2 种代乳粉等能等氮, 具体组成及营养水平见表 1。

1.2 饲养管理

所有仔猪饲养在分娩舍保温箱内, 将代乳粉 (DM 87.8%) 与温水按 1:4 (W/V) 混合, 制成人工乳, 用奶瓶以 $75 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ 灌喂仔猪 (Bottle feeding)^[23], 每隔 4 h 哺喂 1 次。所有仔猪自由饮水, 日常管理、免疫接种、疾病预防及消毒按常规方法进行。

1.3 样品采集

试验猪于 14 d 时进行称重, 各组分别选取 4 头仔猪, 麻醉后颈静脉放血致死, 迅速剖开腹腔, 分离出胰腺, 剥除多余的脂肪和结缔组织, 用吸水纸吸取表面的血液和体液后立即称量。在胰腺尾部 (该部位胰岛较多) 取部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于组织形态学分析; 剩余部分于液氮中速冻, 之后于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存, 用于生化指标分析。

表 1 人工代乳粉的组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrients content of milk replacer powders %

项目	基础	L-精氨酸
Item	Basal	L-Arg
原料 Ingredient		
乳清蛋白浓缩物		
Whey protein concentrate(34% CP)	60.00	60.00
乳脂粉 Milk fat powder(11% CP)	26.00	26.00
α -酪蛋白 α -Casein	6.20	6.20
乳糖 Lactose	3.60	3.60
葡萄糖 Glucose	0.42	1.05
乳酸钙 Calcium lactate(13% Ca)	1.00	1.00
CaHPO ₄ (22% P)	1.00	1.00
复合维生素 ¹ Vitamin mixture	0.10	0.10
复合矿物质 ² Mineral mixture	0.20	0.20
L-丙氨酸 L-Alanine	1.23	0.00
L-精氨酸 L-Arginine	0.00	0.60
卵磷脂 Soy lecithin	0.00	0.00
L-蛋氨酸 L-Methionine	0.10	0.10
L-赖氨酸盐酸盐 L-Lysine-HCl	0.10	0.10
杆菌肽锌 Bacitracin Zinc	0.05	0.05
营养水平 Nutrient level ³		
粗蛋白 Crude Protein	25.94	25.92
总能/(MJ·kg ⁻¹) Gross energy	17.77	17.78
消化能/(MJ·kg ⁻¹) Digestible energy	14.38	14.38
钙 Calcium	0.90	0.91
总磷 Total phosphorus	0.68	0.69
有效磷 Available phosphorus	0.42	0.43
赖氨酸 Lysine	1.59	1.58
蛋氨酸 Methionine	0.53	0.54
精氨酸 Arginine	0.59	1.12

¹. 复合维生素组成(mg·kg⁻¹代乳粉): 维生素 E 醋酸酯 16; 维生素 A 0.76; 维生素 D₃ 0.055; 维生素 K₃ 0.50; 维生素 B₁ 1.5; 维生素 B₂ 4.0; 维生素 B₃ 12; 维生素 B₆ 2.0; 维生素 B₁₂ 0.02; 烟酸 20; 氯化胆碱 600; 叶酸 0.30; 生物素 0.08。². 复合矿物质组成(mg·kg⁻¹代乳粉): Cu ([C₂H₅NO₂]₂Cu 源) 10; Fe ([C₂H₄O₂N]₂Fe 源) 100; Zn ([C₅H₁₁NO₂S]₂Zn 源) 100; Mn ([C₂H₄N₂O₂]₂Mn 源) 5.0; I (KI 源) 0.2; Se (Na₂SeO₃ 源) 0.30。³. 除 DE 为计算值外,其它营养指标均为测定值。氨基酸测定采用 HPLC 法

¹. Provide the following (mg·kg⁻¹ powder diet): Vitamin E-acetate 16; Vitamin A 0.76; Vitamin B₃ 0.055; Vitamin K₃ 0.50; Vitamin B₁ 1.5; Vitamin B₂ 4.0; Vitamin B₃ 12; Vitamin B₆ 2.0; Vitamin B₁₂ 0.02; Niacin 20; Choline chloride 600; Folic acid 0.30; Biotin 0.08. ². Provide the following (mg·kg⁻¹ powder diet): Cu (as [C₂H₅NO₂]₂Cu) 10; Fe (as [C₂H₄O₂N]₂Fe) 100; Zn (as [C₅H₁₁NO₂S]₂Zn) 100; Mn (as [C₂H₄N₂O₂]₂Mn) 5.0; I (as KI) 0.2; Se (as Na₂SeO₃) 0.30. ³. The data of nutrient levels are measured values except DE values. The amino acid content is detected by HPLC

1.4 测定指标及方法

1.4.1 胰腺重量 试验结束时(14 d)对仔猪进行空腹称重,分离胰腺组织,用分析天平称取胰腺重量,并计算相对重量(胰重/体重×100%)。

1.4.2 胰腺组织中胰岛素(Ins)含量测定 制备 20%胰腺组织匀浆液取上清,采用放射免疫分析法测定胰腺组织中胰岛素含量(北京北方生物技术研究),采用考马斯亮兰法测定蛋白质含量(南京建成生物工程研究所)。

1.4.3 胰腺组织形态学检查 将固定完全的胰腺组织用石蜡包埋,连续切片(5 μm)。常规 HE 染色,荧光显微镜下每张切片随机选取 10 个高倍视野观察胰腺形态并拍照,然后用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件检测胰岛面积和胰岛细胞数目。

1.4.4 胰岛素免疫组织化学检测 采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(Streptavidin biotin-peroxidase complex, SABC)法对胰岛素表达情况进行观察。取胰腺组织切片(5 μm)裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烤片后进行胰岛素免疫组织化学染色,苏木精复染细胞核。小鼠抗人胰岛素单克隆抗体稀释度为 1:100。一抗、SABC 试剂盒(即用型,包括封闭液、二抗和 SABC 试剂)及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。每张切片随机选取 10 个高倍视野进行拍照,然后用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算胰岛素阳性表达面积、胰腺总面积、积分光密度(Integral optical density, IOD),并计数单个胰岛中胰岛素阳性表达细胞数目,然后按下列公式计算相关指标^[8]:

β 细胞质量(β cell mass, BCM) = 胰岛素阳性表达面积/胰腺总面积×胰腺重量;

胰岛素染色阳性率(Insulin-positive cell fraction, β cell fraction, BCF) = 胰岛素阳性表达面积/胰腺总面积;

胰岛平均染色光密度(Average optical density, AOD) = 积分光密度(Integral optical density, IOD)总和/胰腺总面积;

胰岛素阳性表达细胞密度(Insulin-positive cell density, PCD) = 胰岛素阳性表达细胞数/胰岛素阳性表达细胞面积。

1.5 统计分析

试验数据用 Microsoft office Excel 2010 软件进行初步整理,然后用 SPSS18.0 软件进行统计分析。各组之间采用单因子方差分析(One-Way

ANOVA)进行差异显著性检验,并采用最小显著差数法(LSD法)进行多重比较。结果以“平均数±标准误(Mean±SE)”表示。

2 结果

2.1 Arg对IUGR仔猪体重和胰腺重量的影响

经统计,仔猪14 d体重受IUGR影响显著降低

($P<0.05$),比NBW猪低25.13%。补充Arg后,IUGR仔猪体重明显增加($P<0.05$),且与NBW猪差异不显著($P>0.05$)。胰腺绝对重量各组之间差异不显著($P>0.05$)。IUGR对胰腺相对重量的影响不明显($P>0.05$),补充Arg后,IUGR仔猪胰腺相对重量增加23.33%($P<0.05$),且与NBW猪相比差异不显著($P>0.05$)(表2)。

表2 Arg对IUGR仔猪体重和胰腺重量的影响

Table 2 Effects of Arg on body weight and pancreas weight of IUGR piglets

指标 Item	NBW组	IUGR组	IUGR+Arg组
体重/g Body weight	4 128.68±119.79 ^a	3 091.30±402.93 ^b	3 909.38±184.21 ^a
胰腺绝对重量/g Absolute pancreas weight	4.68±0.48	4.08±0.77	5.49±0.19
胰腺相对重量/% Relative pancreas weight	0.127±0.005 ^{ab}	0.115±0.013 ^b	0.150±0.007 ^a

同一行数字肩注大写字母不同者差异极显著($P<0.01$),肩注小写字母不同者差异显著($P<0.05$),肩注相同字母或不标注者差异不显著($P>0.05$),下同

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

2.2 Arg对IUGR仔猪胰腺组织中胰岛素含量的影响

统计结果显示,胰腺组织中胰岛素含量受IUGR影响极显著降低($P<0.01$)。Arg的添加使

IUGR仔猪每克胰腺组织中胰岛素含量显著升高($P<0.05$),每克蛋白中胰岛素含量极显著升高($P<0.01$),且均与NBW组差异不显著($P>0.05$)(表3)。

表3 Arg对IUGR仔猪胰腺组织中胰岛素含量的影响

Table 3 Effects of Arg on pancreatic insulin content of IUGR piglets

胰岛素含量/(mg·g ⁻¹) Insulin content	NBW组	IUGR组	IUGR+Arg组
胰腺 Pancreas	0.131±0.002 ^A	0.096±0.011 ^{Bb}	0.123±0.006 ^{Aa}
蛋白 Protein	1.955±0.138 ^A	1.389±0.071 ^B	1.777±0.044 ^A

2.3 Arg对IUGR仔猪胰岛形态的影响

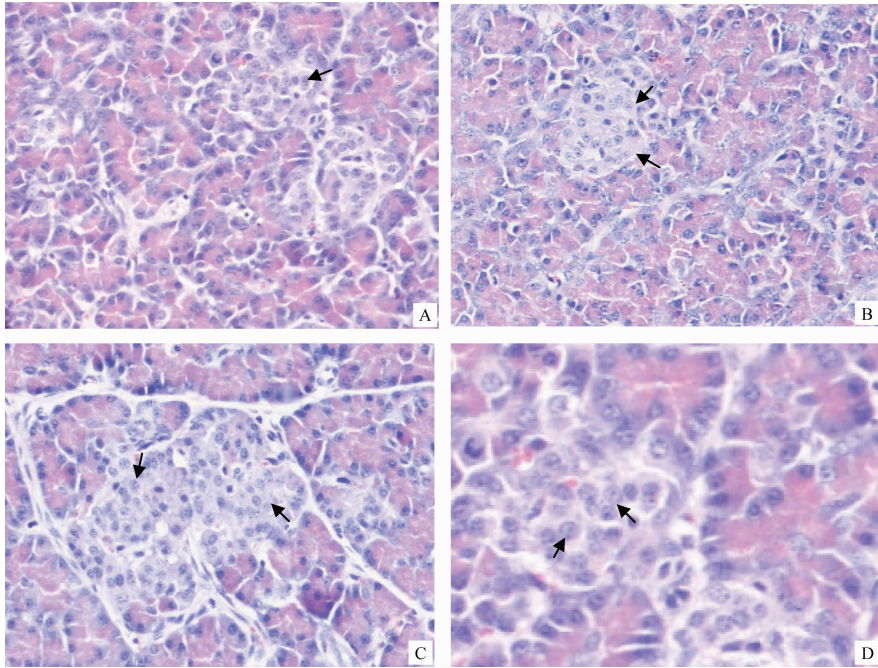
各组胰腺组织HE染色如图1所示,胰岛散在分布于腺泡之间,细胞质较少,着色较浅。经统计,IUGR猪单个胰岛的面积比NBW猪低16.95%,差异显著($P<0.05$);Arg的添加使IUGR仔猪胰岛

面积明显增大($P<0.01$),与NBW组猪差异不显著($P>0.05$)。IUGR组胰岛细胞数目比NBW组明显减少($P<0.01$),而Arg的添加使IUGR仔猪胰岛细胞数目显著增加($P<0.01$),且与NBW组猪差异不显著($P>0.05$)(表4)。

表4 Arg对IUGR仔猪胰岛形态的影响

Table 4 Effects of Arg on pancreatic islet morphology of IUGR piglets

指标 Item	NBW组	IUGR组	IUGR+Arg组
胰岛面积/ μm^2 Pancreatic islet area	4 962.57±126.42 ^{Aa}	4 121.03±197.88 ^{Bb}	5 451.76±298.72 ^A
胰岛细胞数目/个 Number of islet cells	59.10±2.00 ^A	44.33±2.99 ^B	54.50±2.28 ^A



A. 正常仔猪胰岛; B. IUGR 仔猪胰岛; C. IUGR+Arg 仔猪胰岛; D. 正常仔猪胰岛细胞
 A. Pancreatic islet of NBW piglets; B. Pancreatic islet of IUGR piglets; C. Pancreatic islet of IUGR+Arg piglets;
 D. Pancreatic islet cells of NBW piglets

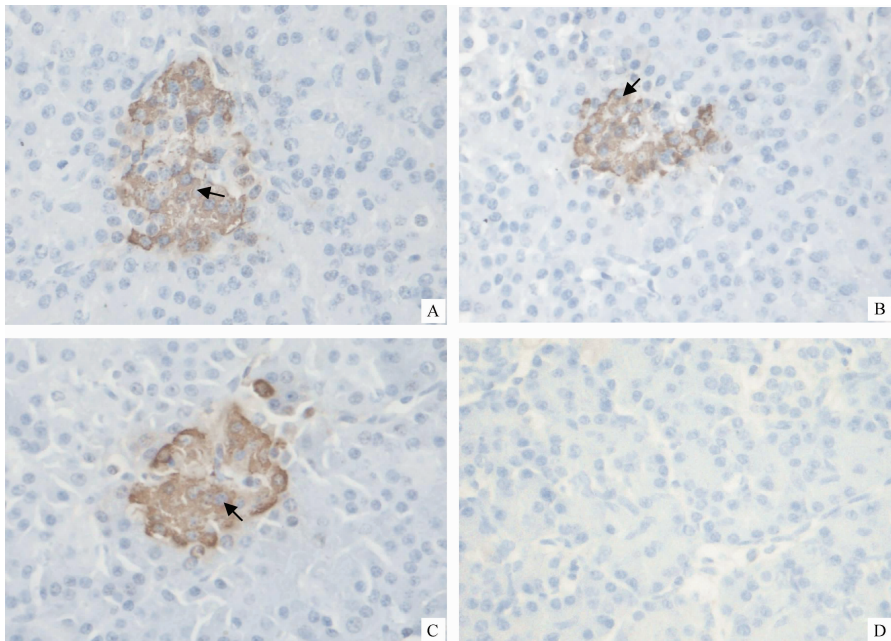
图 1 猪胰腺组织形态学检测(HE 染色) 100×

Fig. 1 Detection of pancreatic morphology of piglets(HE staining) 100×

2.4 胰岛素蛋白表达

本试验利用免疫组化方法对胰岛素蛋白表达进行了检测,胰岛素蛋白表达于β细胞的细胞浆,组织

切片中胰岛素的阳性表达为苏木素衬染蓝色细胞核背景下的细胞膜环状棕黄色染色。各组仔猪胰岛中均可见胰岛素表达,但棕黄色染色的强度不同(图2)。



A. 正常仔猪; B. IUGR 仔猪; C. IUGR+Arg 仔猪; D. 阴性对照
 A. NBW piglet; B. IUGR piglet; C. IUGR+Arg piglet; D. Negative control

图 2 猪胰岛中胰岛素阳性表达(免疫组织化学染色)200×

Fig. 2 The insulin-positive cell in pancreatic islets of piglets(immunohistochemical staining for insulin)200×

染色组织切片的半定量分析结果表明(表5), IUGR 阻碍胰岛 β 细胞发育, 使绝对 β 细胞质量显著降低($P < 0.05$), 但相对 β 细胞质量无明显变化($P > 0.05$)。胰岛素染色阳性率、胰岛素阳性表达面积以及单个胰岛中胰岛素阳性表达细胞数目极显著低于 NBW 组($P < 0.01$), 但胰岛平均染色光密度与 NBW 组差异不显著($P > 0.05$)。此外, IUGR 组胰岛素阳性表达细胞密度极显著高于 NBW 组($P < 0.01$)。添加 Arg 后, 绝对 β 细胞质量明显增

加($P < 0.01$), 且与正常组差异不显著($P > 0.05$)。胰岛素染色阳性率、胰岛素阳性表达面积比 IUGR 组分别增加了 41.79% 和 43.77% ($P < 0.01$); 单个胰岛中胰岛素阳性表达细胞数目虽有所增多, 但差异不显著($P > 0.05$)。胰岛平均染色光密度明显增加, 与 IUGR 组猪相比增加了 67.46%, 差异极显著($P < 0.01$); 与正常组差异极显著($P < 0.01$)。胰岛素阳性表达细胞密度极显著低于其他 2 组($P < 0.01$)。

表 5 Arg 对 IUGR 仔猪胰腺组织中胰岛素表达的影响

Table 5 Effects of Arg on Pancreatic Insulin expression of IUGR piglets

指标 Item	NBW 组	IUGR 组	IUGR+Arg 组
绝对 β 细胞质量/mg Absolute beta cell mass	219.69 \pm 27.75 ^{Aa}	125.53 \pm 21.86 ^{Bb}	257.25 \pm 24.09 ^A
相对 β 细胞质量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重) Relative beta cell mass	53.48 \pm 5.72	46.18 \pm 11.30	65.62 \pm 6.51
胰岛素染色阳性率/% BCF	0.048 0 \pm 0.004 0 ^A	0.027 3 \pm 0.002 5 ^B	0.046 9 \pm 0.003 9 ^A
胰岛素阳性表达面积/ μm^2 Insulin-positive area	52 375.83 \pm 4 332.92 ^A	29 145.83 \pm 2 009.82 ^B	51 831.57 \pm 4 867.10 ^A
胰岛素阳性表达细胞数目/个 Number of insulin-positive cells	38.29 \pm 2.30 ^{Aa}	28.30 \pm 1.38 ^{Bc}	32.30 \pm 1.55 ^{bc}
胰岛平均染色光密度 AOD	0.045 8 \pm 0.003 6 ^B	0.034 2 \pm 0.002 4 ^B	0.105 1 \pm 0.006 4 ^A
胰岛素阳性表达细胞密度/ $(\text{个} \cdot \mu\text{m}^{-2})$ PCD	0.015 7 \pm 0.001 1 ^B	0.020 2 \pm 0.000 8 ^A	0.012 4 \pm 0.000 6 ^C

3 讨论

3.1 IUGR 对仔猪胰腺重量、胰岛素储备及 β 细胞发育的影响

各生长发育阶段的体重、器官绝对重量和相对重量是动物的主要生物学特性指标, 其中体重可大致反映动物的总体营养状态、生理状态和健康状况; 器官绝对重量和相对重量可近似反映该脏器的功能状态和代谢情况^[24]。研究表明, IUGR 导致新生仔猪体重^[25-26]、胰腺重^[3, 27]显著降低, 且这种影响可持续存在。本试验发现, 14 d 时 IUGR 仔猪体重明显低于正常仔猪, 这与 B. F. Wolter 等的结果一致^[28], 说明 IUGR 限制哺乳仔猪的生长, 正常的营养供给仍不能使 IUGR 的不良影响完全纠正。此外, 14 d 时 IUGR 仔猪绝对胰腺重量和相对胰腺重量也都低于正常仔猪, 说明 IUGR 阻碍哺乳仔猪胰腺的发育。这可能是由于 IUGR 引起仔猪发生了适应性反应, 选择性地减少某些非重要组织器官(肝脏、胰腺、肾脏等)的营养供给, 降低其生长速度, 以

保证重要器官(脑、肺脏等)的生长发育^[29]。

本试验通过对胰腺组织切片 HE 染色进一步观察了胰岛的形态, 发现 IUGR 仔猪胰岛的面积明显小于正常仔猪, 单个胰岛的细胞数量也明显少于正常仔猪, 说明 IUGR 仔猪胰腺内分泌部发育受损, 胰岛形态发生改变。这可能是由于宫内不良营养环境刺激机体产生适应性的克隆选择或分化母细胞增殖, 从而使胰腺组织细胞数量或比例发生了改变^[30]。

妊娠末期与生后早期是胰岛 β 细胞生长发育的关键时期, 该时期营养物质供给不足或不平衡将导致胰岛 β 细胞数量及功能的持续改变^[12]。本试验发现, 14 d 时 IUGR 仔猪 β 细胞质量明显低于正常仔猪, 与胰腺重量的变化情况一致。14 d 时 IUGR 仔猪的胰岛素染色阳性率明显降低, 胰岛素阳性表达面积明显减小, 表明胰岛 β 细胞群面积减小。IUGR 仔猪单个胰岛中胰岛素阳性表达细胞数目明显减少, 说明胰岛 β 细胞数目减少。近年来发现, 胰腺 β 细胞上不但存在胰岛素受体(IR)^[31], 还有 4 种胰岛素受体

底物(IRS-1/-2/-3/-4),以及胰岛素的信号转导蛋白,如磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)及其下游的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)或蛋白激酶 B(PKB)等^[32],提示 β 细胞也是胰岛素作用的靶细胞之一,胰岛素与 β 细胞上的胰岛素受体结合,通过 β 细胞上的胰岛素信号转导通路对其本身的胰岛素分泌起到正调节的作用^[33-36]。本试验中,IUGR 仔猪胰岛 β 细胞群面积和 β 细胞数目均减少,推测胰岛素与 β 细胞上的胰岛素受体的结合会受到影响,进而降低胰岛素的分泌。此外,14 d 时 IUGR 仔猪的胰岛平均染色光密度明显减小,表明胰岛 β 细胞内胰岛素的合成与储备减少,这与 IUGR 仔猪胰腺组织中胰岛素含量显著降低的结果是一致的。由于胰岛素本身具有促进生长的作用,因而可以部分解释 IUGR 仔猪体重降低,发育缓慢的原因。胰岛素阳性表达细胞密度在一定程度上可以反映 β 细胞的增殖与凋亡情况,14 d 时 IUGR 仔猪的 PCD 明显升高,说明 IUGR 可能引起了 β 细胞的增殖变化,但是该变化趋势与报道的结果不一致^[8-9]。由于 PCD 是一个计算值,不能准确地说明 β 细胞的增殖、凋亡比例,需进一步用所检测的 β 细胞的增殖率(可采用 Ins 与 Ki67 的双重荧光免疫组织化学染色)和凋亡率(可采用 Ins 与 TUNEL 的双重荧光免疫组织化学染色)来验证。

3.2 Arg 对 IUGR 仔猪胰腺重量、胰岛素储备及 β 细胞发育的调控

本试验中补充 0.6% Arg 使 IUGR 仔猪体重明显增加,14 d 时趋于正常水平;绝对胰腺重量和相对胰腺重量均高于正常仔猪。这提示,外源添加适量的 Arg 可促进 IUGR 仔猪生长,改善胰腺的发育。已知胎儿期和生后早期的生长发育呈非生长激素依赖性,主要受“营养物质-胰岛素-胰岛素样生长因子(IGF)”代谢轴的调控。IGF 可促进细胞有丝分裂、增殖分化及促进合成代谢,是直接刺激靶细胞生长的重要物质。IGF 包括 IGF-I 和 IGF-II,其中 IGF-II 主要调节胚胎早期的生长,而 IGF-I 主要调节胚胎后期及生后的生长^[33]。研究表明,IUGR 儿由于营养物质供应不足,导致 IGF-I 表达下降^[34],进而阻碍其生长。而 Arg 可促进胰岛素和生长激素的释放^[16-19],后二者均可促进 IGF-I 的释放^[20],从而调节动物的生长。本实验室研究发现,给 7 日龄 IUGR 哺乳仔猪补充 Arg,14 d 时血清中胰岛素水平显著升高,而 IGF-I 水平也有所升高,均与正常

组仔猪差异不显著^[37]。推测,补充 Arg 可能是通过“营养物质-胰岛素-胰岛素样生长因子(IGF)”代谢轴来调控 IUGR 仔猪的生长和胰腺发育。

营养物质,尤其是蛋白质、氨基酸的数量和/或质量对胰岛 β 细胞的发育及正常形态、功能的维持影响甚大。研究发现,围生期营养不良严重影响 β 细胞的发育^[33,38],由于胰岛 β 细胞的发育从胎儿期持续至断奶,生后早期胰岛会经历一个重构过程,此时采取有效的营养干预措施可能会促进胰岛 β 细胞的发育,改善胰岛重构。本试验中补充 0.6% Arg 使 IUGR 仔猪胰岛面积增大,胰岛细胞数目增加,说明胰岛结构得到了改善。胡劲涛^[39]在 IUGR 大鼠模型上也发现,生后早期补充 L-Arg 可以改善胰岛的结构和内分泌功能,其机制是通过促进 Ins 的表达,上调 PDX-1 蛋白的表达来促进 β 细胞定向分化,抑制 NF- κ B 蛋白的表达,调节凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 的比例,减少胰岛细胞的凋亡等几个方面来实现的。本试验添加 0.6% Arg 使 IUGR 仔猪 Ins 染色阳性率和 Ins 阳性表达面积明显增大,表明 β 细胞群面积增大,加之 β 细胞质量亦明显增加,说明 β 细胞数量增多。又因 β 细胞也是胰岛素作用的靶细胞之一,推测 Arg 调控后胰岛素的作用效果可能会有所改善。此外,Arg 调控后 IUGR 仔猪胰腺组织中胰岛素含量和胰岛平均染色光密度明显增加,说明 β 细胞内胰岛素的合成与储备增加。以上说明,将精氨酸作为生后早期的营养干预措施,可以改善 IUGR 仔猪的胰岛结构,增加胰岛 β 细胞数量和胰岛素合成,从而弥补胎儿期的不足,有利于仔猪健康生长。

4 结 论

4.1 IUGR 导致哺乳仔猪胰腺发育受损,胰岛面积减小, β 细胞数量减少,胰岛素合成和储备下降。

4.2 补充 0.6% 的 Arg 使 7~14 日龄 IUGR 仔猪胰岛结构得到改善,胰岛 β 细胞数量增多,胰岛素合成和储备增加。

参考文献:

- [1] WU G, BAZER F W, WALLACE J M, et al. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84(9):2316-2337.
- [2] WU G, BAZER F W, CUDD T A, et al. Maternal

- nutrition and fetal development[J]. *J Nutr*, 2004, 134(9):2169-2172.
- [3] WANG T, HUO Y J, SHI F, et al. Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs[J]. *Biol Neonate*, 2005, 88(1):66-72.
- [4] 石现瑞. 子宫内生长阻滞对新生仔猪胰腺及胃发育的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2003.
- [5] HARADA E, SHIZUYAMA M, IHARA N, et al. Impaired pancreatic endocrine and exocrine responses in growth-retarded piglets[J]. *J Vet Med*, 2003, 50(9):433-441.
- [6] STYRUD J, ERIKSSON U J, GRILL V, et al. Experimental intrauterine growth retardation in the rat causes a reduction of pancreatic B-cell mass, which persists into adulthood[J]. *Biol Neonate*, 2005, 88(2):122-128.
- [7] INOUE T, KIDO Y, ASAHARA S, et al. Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass[J]. *Biomed Res*, 2009, 30(6):325-330.
- [8] DUMORTIER O, BLONDEAU B, DUVILLIE B, et al. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(12):2495-2503.
- [9] LIMESAND S W, JENSEN J, HUTTON J C, et al. Diminished beta-cell replication contributes to reduced beta-cell mass in fetal sheep with intrauterine growth restriction[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(5):R1297-1305.
- [10] LIMESAND S W, ROZANCE P J, ZERBE G O, et al. Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3):1488-1497.
- [11] YUAN Q X, ZHOU J Y, TENG L P, et al. Intrauterine growth retardation leads to the functional change of insulin secretion in the newborn rats[J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(7):491-495.
- [12] REUSENS B, REMACLE C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(5-6):913-922.
- [13] SCHWITZGEBEL V M, SOMM E, KLEE P. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 304(1-2):78-83.
- [14] 陈才勇, 周根来, 王 恬. 以猪为动物模型对子宫内生长阻滞的研究进展[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, (1):33-36, 45.
- [15] WU G, BAZER F W, DAVIS T A, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1):153-168.
- [16] KIM S W, WU G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs[J]. *J Nutr*, 2004, 134(3):625-630.
- [17] COCHARD A, GUILHERMET R, BONNEAU M. Effects of arginine, growth hormone-releasing hormone (GHRH) and neostigmine administered singly or in paired combinations on growth hormone (GH) release in pigs[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1997, 37(5):589-598.
- [18] MATEO R D, WU G, BAZER F W, et al. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts[J]. *J Nutr*, 2007, 137(3):652-656.
- [19] MATEO R D, WU G, MOON H K, et al. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets[J]. *J Anim Sci*, 2008, 86(4):827-835.
- [20] GIOVANNUCCI E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence[J]. *J Nutr*, 2001, 131(11 Suppl):3109S-3120S.
- [21] 姚 康, 褚武英, 邓 敦, 等. 不同精氨酸添加水平对哺乳仔猪生长性能的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, (1):121-124.
- [22] BURKE C, SINCLAIR K, COWIN G, et al. Intrauterine growth restriction due to uteroplacental vascular insufficiency leads to increased hypoxia-induced cerebral apoptosis in newborn piglets[J]. *Brain Res*, 2006, 1098(1):19-25.
- [23] YAO K, YIN Y L, CHU W, et al. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs[J]. *J Nutr*, 2008, 138(5):867-872.
- [24] 孔祥峰, 尹富贵, 刘合军, 等. 早期断奶仔猪生理生化参数和脏器指数的变化[J]. *中国实验动物学报*, 2006, (4):298-302.
- [25] YAMAMOTO M, KATAOKA K. An electron microscope study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions[J]. *Arch Histol Cytol*, 1988, 51(4):315-325.
- [26] REHFELDT C, KUHN G. Consequences of birth

- weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84 (Suppl): E113-123.
- [27] XU R J, MELLOR D J, BIRTLES M J, et al. Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994, 18(2):231-240.
- [28] WOLTER B F, ELLIS M, CORRIGAN B P, et al. The effect of birth weight and feeding of supplemental milk replacer to piglets during lactation on preweaning and postweaning growth performance and carcass characteristics[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80(2):301-308.
- [29] FERNANDEZ-TWINN D S, OZANNE S E. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome [J]. *Physiol Behav*, 2006, 88(3):234-243.
- [30] LUCAS A. Programming by early nutrition: an experimental approach [J]. *J Nutr*, 1998, 128 (2Suppl): 401S-406S.
- [31] VAN SCHRAVENDIJK C F, FORIERS A, HOOGHE-PETERS E L, et al. Pancreatic hormone receptors on islet cells [J]. *Endocrinology*, 1985, 117(3):841-848.
- [32] HARBECK M C, LOUIE D C, HOWLAND J, et al. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells [J]. *Diabetes*, 1996, 45(6):711-717.
- [33] BERTIN E, GANGNERAU M N, BAILBE D, et al. Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(1 Pt 1):E11-17.
- [34] LEIBIGER B, WAHLANDER K, BERGGREN P O, et al. Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39):30153-30156.
- [35] ASPINWALL C A, LAKEY J R, KENNEDY R T. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(10):6360-6365.
- [36] ASPINWALL C A, QIAN W J, ROPER M G, et al. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca^{2+} stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta-cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29):22331-22338.
- [37] 王远孝, 张莉莉, 周根来, 等. 精氨酸对 IUGR 仔猪器官指数和血清激素水平的影响 [C]//低碳经济与高效养殖——第六次全国饲料营养学术研讨会暨动物营养学会成立三十周年大会, 2010:1.
- [38] GRADWOHL G. Development of the endocrine pancreas [J]. *Diabetes Metab*, 2006, 32(5 Pt 2):532-533.
- [39] 胡劲涛. 氧化损伤在低出生体重仔鼠发生代谢综合征过程中的作用及干预研究 [D]. 长沙:中南大学, 2008.

(编辑 郭云雁)