

纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠消化酶活力和肝生长轴基因表达的影响

张莹莹, 王聪*, 刘强, 张延利, 裴彩霞, 王永新, 郭刚, 霍文婕, 张拴林

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 为探讨日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠消化酶活性和肝生长轴激素受体基因表达的影响, 试验选取 30 日龄健康、体重近似的荷斯坦公犊 36 头, 随机分为 4 组, 对照组饲喂基础日粮, 纤维分解酶组(FE)、异丁酸组(IB)和混合添加组(IBFE)在基础日粮上分别添加 1.83 g 纤维分解酶(FE, 含 160 U 纤维分解酶和 4 000 U 木聚糖酶)、6.0 g 异丁酸(IB, 浓度 98.5%)和两者混合物。分别在 45 和 90 日龄从每组中抽取 3 头屠宰并采集各肠段小肠内容物、肝样品, 测定小肠消化酶活性和肝生长轴激素受体基因表达。结果表明, 45 日龄, IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$); IBFE 组十二指肠、空肠近端、空肠远端和回肠胰蛋白酶活性显著高于其他处理组($P < 0.05$); IBFE、IB 组空肠近端和空肠远端脂肪酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$); IBFE 和 IB 组 *GHR* mRNA、*IGF-IR* mRNA 表达量显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$), IBFE 组 *IR* mRNA 表达量显著高于 IB、FE 和对照组($P < 0.05$)。90 日龄, IBFE 组十二指肠和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$); IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠胰蛋白酶显著高于其他处理组($P < 0.05$); IBFE 组十二指肠、空肠近端、空肠远端和回肠脂肪酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$); IBFE、IB、FE 组 *GHR* mRNA 表达量显著高于对照组($P < 0.05$), IBFE 组 *IR* mRNA 表达量显著高于其他处理组($P < 0.05$), IBFE 和 IB 组 *IGF-IR* mRNA 表达量显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$)。结果提示, 日粮中添加纤维分解酶和异丁酸混合物对提高犊牛小肠消化酶活、肝生长轴激素受体基因表达效果最佳。

关键词: 纤维分解酶; 异丁酸; 小肠消化酶; 生长轴激素受体

中图分类号: S823.5; S816

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)09-1879-09

Effects of Fibrolytic Enzymes and Isobutyrate on Digestive Enzyme Activity of Small Intestine and Growth Axis Hormone Receptor Gene Expression of Liver in Dairy Calves

ZHANG Ying-ying, WANG Cong*, LIU Qiang, ZHANG Yan-li, PEI Cai-xia, WANG Yong-xin, GUO Gang, HUO Wen-jie, ZHANG Shuan-lin

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taiyu 030801, China)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effects of fibrolytic enzymes, isobutyrate or their mixture on digestive enzyme activity of small intestine and growth axis hormone receptor gene expression of liver in dairy calves. Thirty-six Holstein male calves of 30 days of age with similar weight were randomly divided into 4 groups. Calves in control group were fed basal ration. Calves in treatments were supplemented fibrolytic enzymes (FE, 1.83 g per calf per day), isobutyrate (IB, 98.5% of isobutyrate, 6 g per calf per day) and their mixtures (IBFE, FE + IB), respectively. At 45 and 90 days of age, 3 calves from each group were randomly selected and slaughtered. Samples of small intestine contents and liver were collected in the morning before feeding

收稿日期: 2015-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272471); 山西省高校"131"领军人才项目(2013); 山西农业大学学术带头人项目(2012)

作者简介: 张莹莹(1990-), 女, 黑龙江绥化人, 硕士生, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: 1143795965@qq.com

* 通信作者: 王聪, 教授, 博士, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: liuqiang710829@126.com

on 45 and 90 days of age for determining intestinal digestive enzyme activity, *GHR*, *IGF-IR* and *IR* mRNA expression in liver. The results showed that on 45 days of age, amylase activities of proximal jejunum digesta, distal jejunum digesta and ileum digesta in IBFE group were significantly higher than FE and control groups ($P < 0.05$). Trypsin activity of duodenum digesta, proximal jejunum digesta, distal jejunum digesta and ileum digesta in IBFE group were significantly higher than other groups ($P < 0.05$). Lipase activities of proximal jejunum digesta and distal jejunum digesta in IBFE and IB groups were significantly higher than control group ($P < 0.05$). The mRNA expression of *GHR* and *IGF-IR* in liver in IBFE and IB groups were significantly higher than that of FE and control groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of *IR* in liver in IBFE group was significantly higher than other groups ($P < 0.05$). On 90 days of age, amylase activities of duodenum digesta and ileum digesta in IBFE group were significantly higher than that of FE and control groups ($P < 0.05$). Trypsin activities of proximal jejunum digesta, distal jejunum digesta and ileum digesta in IBFE group were significantly higher than other groups ($P < 0.05$). Lipase activities of duodenum digesta, proximal jejunum digesta, distal jejunum digesta and ileum digesta in IBFE group were significantly higher than that of FE and control groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of *GHR* in liver in IBFE, IB and FE groups were significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). The mRNA expression of *IR* in liver in IBFE group was significantly higher than other groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of *IGF-IR* of liver in IBFE and IB groups were significantly higher than that of FE and control groups ($P < 0.05$). Intestinal digestive enzyme activity, mRNA expression of *GHR*, *IGF-IR* and *IR* in liver were improved by the supplementation of the mixture of fibrolytic enzymes and isobutyrate in calves.

Key words: fibrolytic enzymes; isobutyrate; digestive enzyme of small intestine; growth axis hormone receptor

断奶对犊牛会造成很大的应激,通过营养调控优化断奶前后犊牛的消化能力对促进犊牛生长发育和机体健康状况以及以后的生产性能具有重要意义。小肠消化酶活和肝脏生长轴激素受体基因表达能够反映营养措施调控犊牛消化能力及与生长发育潜力的效果。纤维素酶可将纤维素水解为多种寡糖和单糖供动物体利用^[1]。在日粮中添加纤维素酶可以促进日粮纤维消化,改善瘤胃发酵类型和提高挥发性脂肪酸产量^[2]。另有研究表明,在犊牛日粮中适量添加纤维素酶可以提高生长激素受体(*GHR*)和胰岛素受体(*IR*)在小肠黏膜组织中的表达^[3]。异丁酸、异戊酸和 2-甲基丁酸是含 4 或 5 个碳原子的直链挥发性脂肪酸的异构体,称异位酸。瘤胃中异位酸主要来源是真蛋白质降解后氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)经氧化脱氨基或脱羧基后的产物。瘤胃微生物将异位酸作为碳骨架来源用以合成支链氨基酸,而支链氨基酸又促进瘤胃微生物生长^[4-5]。有研究证明,日粮中添加 2-甲基丁酸可以刺激纤维分解菌和淀粉分解菌生长,提高瘤胃液消化

酶活,从而促进瘤胃发酵^[6]。此外,日粮中添加异丁酸能够促进犊牛瘤胃和小肠黏膜发育,提高瘤胃和小肠各部位 *GHR*、*IR*、*HMGCS1* mRNA 的表达量^[7]。以往研究主要注重纤维素酶或异位酸对反刍动物瘤胃发酵的影响^[8-10],本课题组也曾有研究证明纤维分解酶与异丁酸混合添加在犊牛日粮中可以显著提高瘤胃酶活力、纤维分解菌数量,促进瘤胃发酵,提高总挥发性脂肪酸产量^[11]。

本试验将探讨其对犊牛小肠消化酶活和肝中 *GHR* mRNA、*IGF-IR* mRNA 和 *IR* mRNA 表达的影响,为纤维分解酶、异丁酸对犊牛生长发育的调节作用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与试验设计

选取健康体重相近(48.5 ± 0.3) kg 的 30 日龄荷斯坦公犊 36 头,随机分为 4 组,每组 9 头。对照组饲喂基础日粮,试验组分别在基础日粮上添加纤维分解酶 1.83 g(FE)(山东思诺拜特生物科技有

限公司,包含滤纸酶活力 160 U 和木聚糖酶活力 4 000 U),异丁酸 $6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ (IB)(浓度为 98.5%),纤维分解酶 1.83 g 和异丁酸 $6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ (IBFE)同时添加。试验期为 45~90 日龄,60 日龄断奶,分别在 45 和 90 日龄从各组抽取 3 头进行屠宰。采集肠道食糜、肝、血液样品。

1.2 试验日粮及饲养管理

试验犊牛单圈饲养,断奶前每日 07:00、12:00

和 18:00 饲喂,每次 2 kg 奶,自由饮水,纤维分解酶和异丁酸在饲喂前混合于奶中。断奶后日粮包括苜蓿干草和精料(熟玉米 65%,发酵豆粕 32%,矿维 3%),每日 07:00、12:00 和 18:00 饲喂 1 kg 精料和 1.5 kg 苜蓿干草,纤维分解酶和异丁酸在饲喂前混合于精料中,自由饮水。奶、精料和苜蓿干草营养水平见表 1。

表 1 日粮组成及营养水平(%DM)

Table 1 Ingredient and nutrient level of daily ration

项目 Item	牛奶 Milk	精料 Concentrate of calves	苜蓿干草 Dried alfalfa hay
干物质/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Dry matter	12.86	94.32	91.21
代谢能/($\text{MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$) ME		13.90	9.10
粗蛋白/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Crude protein	3.15	19.41	17.53
中性洗涤纤维/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Neutral detergent fibre		25.01	52.84
酸性洗涤纤维/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Acid detergent fibre		13.49	39.86
钙/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Calcium		0.71	1.35
磷/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Phosphorus		0.68	0.31

代谢能根据 NRC(2001)制定,为计算值,其余为实测值。每千克犊牛精料含:Fe 100 mg,Mn 60 mg,Cu 16 mg,Zn 60 mg,Co 0.2 mg,I 0.6 mg,Se 0.6 mg,VA 10 000 IU,VD 2 000 IU,VE 75 IU

ME was calculated according to NRC(2001),and was a calculated value,while the others were measured values. One kg of diet for calves contained the following:Fe 100 mg,Mn 60 mg,Cu 16 mg,Zn 60 mg,Co 0.2 mg,I 0.6 mg,Se 0.6 mg,VA 10 000 IU,VD 2 000 IU,VE 75 IU

1.3 样品采集

试验期间分别在 45 和 90 日龄各组抽取 3 头犊牛在饲喂前颈静脉采血,析出血清, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。随后将犊牛进行屠宰,分段结扎各段小肠,从结扎的两端剪断收集小肠食糜 10 mL, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。在肝上用手术刀在固定位置小心的割下 2 cm^2 大小的一块肝组织,放到盛有生理盐水的烧杯中洗涤干净,再将肝组织剪小,用锡箔纸包裹紧,放到冻存管中,用液氮罐带回实验室, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 小肠消化酶活性测定

肠道内容物解冻后,称取食糜 0.5 g,按 1:3 加入 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液在冰浴上匀浆 10 s, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $15\ 000 \times \text{g}$ 离心 5 min,取上清液,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按试剂盒(南京建成)以比色法测定各段小肠淀粉酶、胰蛋白酶和脂肪酶活性。

1.5 肝基因表达测定

利用实时荧光定量 PCR 技术测定肝生长激素受体(GHR)、胰岛素受体(IR)和类胰岛素一号增长

因子(IGF-IR)mRNA 的表达量。

1.5.1 总 RNA 的提取及反转录 RNA 提取参照 Invitrogen 公司总 RNA 提取试剂说明进行,将提取的样本用核酸蛋白测定仪 ND-1000 测定总 RNA 浓度和纯度。按照 PrimeScript[®] RT Master Mix Perfect Real Time 反转录试剂盒说明进行反转录。反转录反应体系为 $10 \text{ } \mu\text{L}$: $5 \times \text{Prime}^{\text{®}}$ RT Master Mix $2.0 \text{ } \mu\text{L}$,总 RNA 500 ng ,RNase Free dH_2O 加至总体积 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。将得到的产物 cDNA 放到 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.5.2 设计引物 根据 GenBank 公布的牛 GHR、IR、IGF-IR 基因序列(编号分别为 NM_176608、XM_002688832、AF_508807),利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。以 18S rRNA 为内参基因,由华大基因有限公司合成引物。引物序列信息见表 2。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 根据 SYBR[®] PrimeScriPt[™] RT-PCR Kit 试剂盒说明操作,PCR 反

应体系 20 μL : 10 μL SYBR Premix TaqTM II, 0.8 μL Reference Dye, 2.0 μL cDNA 模板, 6.0 μL ddH₂O。
 μL 上游引物, 0.8 μL 下游引物, 0.4 μL ROX Ref-

表 2 目的基因和内参基因引物序列及 PCR 条件

Table 2 Conditions of PCR and parameters of oligonucleotide primer pair

目的基因 Target gene	PCR 产物/bp PCR products	引物序列(5'→3') Sequence of primer	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>GHR</i>	141	F: AAATTCACCAAGTGCCGTTCC R: GGGGCATTCCTTCCATTCTT	62
<i>IR</i>	148	F: CCTGGGGTTCATGTTGTTCT R: AGGGTGGTCTGTGACTTGG	62
<i>IGF-IR</i>	159	F: CCTCATTATTCTGCTAACCAA R: AGATAGAAGAGATGCGAGGAGGATG	62
18S rRNA	117	F: CAGACAAATCACTCCACCAA R: GAAGGGCACCACCAGGAGT	62

1.6 血清激素测定

将-20℃冷冻保存的血清样品常温解冻,按照试剂盒(南京建成)说明测定血清中生长激素、胰岛素和 IGF-1 浓度。

1.7 数据处理

试验数据用 SPSS17.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行方差分析和邓肯氏(Duncan)多重比较,结果采用“平均数±标准误”表示。

2 结果

2.1 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠淀粉酶活性的影响

由表 3 可见,45 日龄,IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$)。90 日龄,IBFE 组十二指肠和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$)。

表 3 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠淀粉酶活性的影响

Table 3 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on amylase activities of small intestine digesta in dairy calves

项目 Item	对照组 Control	纤维分解酶组 FE	异丁酸组 IB	混合添加组 IBFE	SE	<i>P</i>
IU · mg ⁻¹ · min ⁻¹						
十二指肠食糜 Duodenum digesta						
45 日龄 45 d	0.320 ^a	0.291 ^a	0.287 ^a	0.272 ^a	0.028	0.215
90 日龄 90 d	0.516 ^c	0.689 ^b	0.714 ^b	0.861 ^a	0.037	0.001
空肠近端食糜 Proximal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	0.25 ^d	0.28 ^c	0.37 ^b	0.50 ^a	0.029	0.008
90 日龄 90 d	1.05 ^a	1.09 ^a	0.99 ^a	1.11 ^a	0.063	0.932
空肠远端食糜 Distal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	0.51 ^c	0.58 ^{bc}	0.63 ^{ab}	0.67 ^a	0.019	0.005
90 日龄 90 d	1.25 ^a	1.33 ^a	1.31 ^a	1.36 ^a	0.020	0.317
回肠食糜 Ileum digesta						
45 日龄 45 d	0.50 ^c	0.61 ^b	0.66 ^a	0.67 ^a	0.021	0.001
90 日龄 90 d	1.35 ^b	1.38 ^b	1.46 ^{ab}	1.52 ^a	0.024	0.033

同行肩注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下表同

In the same row, values with different small letter superscripts means significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.2 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠胰蛋白酶活性的影响

由表 4 可见,45 日龄,IBFE 组十二指肠胰蛋白

酶活性显著高于其他处理组。45 和 90 日龄,IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠胰蛋白酶活性显著高于其他处理组($P < 0.05$)。

表 4 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠胰蛋白酶活性的影响

Table 4 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on trypsin activities of small intestine digesta in dairy calves

IU · mg⁻¹ · min⁻¹

项目 Item	对照组 Control	纤维分解酶组 FE	异丁酸组 IB	混合添加组 IBFE	SE	P
十二指肠食糜 Duodenum digesta						
45 日龄 45 d	5 579.08 ^c	7 018.82 ^b	7 222.95 ^b	8 160.36 ^a	281.309	0.001
90 日龄 90 d	11 995.2 ^{ab}	11 570.2 ^b	12 743.0 ^a	12 440.1 ^a	163.60	0.025
空肠近端食糜 Proximal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	3 978.17 ^d	4 746.44 ^c	5 209.58 ^b	8 241.24 ^a	488.117	0.010
90 日龄 90 d	20 065.09 ^d	21 647.18 ^c	25 715.48 ^b	28 080.52 ^a	962.949	0.000
空肠远端食糜 Distal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	4 613.19 ^c	4 723.44 ^{bc}	4 976.17 ^b	5 423.83 ^a	100.635	0.001
90 日龄 90 d	14 080.82 ^b	14 645.37 ^b	14 839.57 ^b	16 243.17 ^a	264.848	0.002
回肠食糜 Ileum digesta						
45 日龄 45 d	2 308.91 ^d	3 045.40 ^c	3 473.04 ^b	3 559.38 ^a	149.525	0.001
90 日龄 90 d	8 158.12 ^c	8 283.91 ^c	9 102.24 ^b	10 131.60 ^a	253.337	0.001

2.3 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠脂肪酶活性的影响

由表 5 可见,45 日龄,IB 和 IBFE 组空肠近端和空肠远端脂肪酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。90 日龄,IBFE 组十二指肠、空肠近端、空肠远端和回肠脂肪酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$)。

2.4 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛肝生长轴激素受体基因表达的影响

由表 6 可见,45 日龄,IBFE 和 IB 组 *GHR* mRNA、*IGF-IR* mRNA 表达量显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$),IBFE 组 *IR* mRNA 表达量显著高于 IB、FE 和对照组($P < 0.05$)。90 日龄,IBFE、IB、FE 组 *GHR* mRNA 表达量显著高于对照组($P < 0.05$),IBFE 组 *IR* mRNA 表达量显著高于其他处理组,IBFE 和 IB 组 *IGF-IR* mRNA 表达量显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$)。

2.5 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛血清生长轴激素的影响

由表 7 可见,45 日龄,IBFE 和 IB 组胰岛素浓

度显著高于对照组($P < 0.05$)。90 日龄,IBFE 和 IB 组胰岛素浓度显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$)。45 和 90 日龄,IBFE 和 IB 组的生长激素、*IGF-IR* 浓度均显著高于 FE 和对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠消化酶活性的影响

小肠消化酶活性高低反映了日粮养分在小肠的消化情况,与犊牛品种、年龄、肠段部位、食糜 pH 和日粮组成密切相关^[12]。初生犊牛的前胃发育尚不完全,此时营养物质的消化主要是依赖皱胃和胰腺分泌的消化酶,但各种消化酶活性都较低,乳糖酶除外^[13],反刍动物肠道发育规律直接影响各肠段酶活性高低,随日龄增长酶活性显著提高^[14];在反刍动物日粮中添加纤维素酶对于纤维消化过程有明显促进作用,以利于动物体获得更多的碳水化合物,在一定范围内,日粮碳水化合物比例的提高是有利于 α -淀粉酶和脂肪酶活性的提高^[15]。本研究中,FE 组

表 5 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛小肠脂肪酶活性的影响

Table 5 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on lipase activities of small intestine digesta in dairy calves

IU · mg⁻¹ · min⁻¹

项目 Item	对照组 Control	纤维分解酶组 FE	异丁酸组 IB	混合添加组 IBFE	SE	P
十二指肠食糜 Duodenum digesta						
45 日龄 45 d	135.75 ^a	147.06 ^a	158.11 ^a	159.18 ^a	4.165	0.143
90 日龄 90 d	218.65 ^d	237.00 ^c	244.22 ^b	253.17 ^a	3.854	0.001
空肠近端食糜 Proximal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	122.47 ^b	133.71 ^a	133.86 ^a	136.16 ^a	1.693	0.001
90 日龄 90 d	256.89 ^c	264.14 ^b	268.04 ^{ab}	272.67 ^a	1.936	0.003
空肠远端食糜 Distal jejunum digesta						
45 日龄 45 d	136.35 ^b	138.90 ^{ab}	139.38 ^a	140.46 ^a	0.696	0.005
90 日龄 90 d	265.16 ^c	269.31 ^{bc}	275.44 ^b	284.08 ^a	2.328	0.001
回肠食糜 Ileum digesta						
45 日龄 45 d	175.27 ^a	177.71 ^a	178.70 ^a	183.53 ^a	2.868	0.828
90 日龄 90 d	250.43 ^c	251.25 ^{bc}	256.84 ^{ab}	258.69 ^a	1.333	0.035

表 6 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛肝生长轴激素受体基因表达的影响

Table 6 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on mRNA expression of *GHR*, *IR* and *IGF-IR* of liver in dairy calves

项目 Item	对照组 Control	纤维分解酶组 FE	异丁酸组 IB	混合添加组 IBFE	SE	P
生长激素受体 Growth hormone receptor						
45 日龄 45 d	0.117 ^b	0.120 ^b	0.145 ^a	0.152 ^a	0.021	0.021
90 日龄 90 d	0.404 ^b	0.433 ^a	0.444 ^a	0.453 ^a	0.004	0.036
胰岛素受体 Insulin receptor						
45 日龄 45 d	0.190 ^c	0.223 ^{bc}	0.271 ^b	0.325 ^a	0.038	0.028
90 日龄 90 d	0.198 ^b	0.292 ^b	0.310 ^b	0.351 ^a	0.028	0.043
胰岛素样生长因子受体 IGF-I receptor						
45 日龄 45 d	0.049 ^b	0.054 ^b	0.064 ^a	0.070 ^a	0.025	0.037
90 日龄 90 d	0.217 ^b	0.222 ^b	0.253 ^a	0.270 ^a	0.006	0.028

表 7 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛血清指标的影响

Table 7 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on blood parameters in dairy calves

项目 Item	对照 Control	纤维分解酶 FE	异丁酸 IB	混合添加 IBFE	SE	P
生长激素浓度/(ng · mL ⁻¹) Growth hormone						
45 日龄 45 d	2.27 ^b	2.39 ^b	2.89 ^a	2.99 ^a	0.381	0.041
90 日龄 90 d	2.32 ^b	2.47 ^b	2.90 ^a	3.01 ^a	0.641	0.019
胰岛素浓度/(μIU · mL ⁻¹) Insulin						
45 日龄 45 d	9.74 ^b	11.05 ^{ab}	13.21 ^a	13.33 ^a	0.456	0.047
90 日龄 90 d	9.52 ^b	9.60 ^b	12.59 ^a	13.06 ^a	1.106	0.035
IGF-I 浓度/(ng · mL ⁻¹) IGF-I						
45 日龄 45 d	2.34 ^b	2.80 ^b	2.87 ^a	3.23 ^a	0.194	0.034
90 日龄 90 d	2.46 ^b	2.64 ^b	2.90 ^a	3.22 ^a	0.690	0.030

淀粉酶、胰蛋白酶和脂肪酶活性整体较对照组有增高趋势,但效果不明显。IBFE 组在 FE 组添加纤维素酶的基础上,另有异丁酸的添加。使得 IBFE 组 3 种小肠消化酶活性显著提高。异丁酸可以促进瘤胃内纤维分解菌生长,提高纤维分解菌的数量,纤维分解酶又有效地促进纤维的消化利用,使瘤胃挥发性脂肪酸产量升高,而瘤胃挥发性脂肪酸是反刍动物重要的能量来源,有研究指出日粮能量水平与消化道 α -淀粉酶含量呈正相关^[16-17]。所以,45 日龄,IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$)。90 日龄,IBFE 组十二指肠和回肠的淀粉酶活性显著高于对照组和 FE 组($P < 0.05$)。此外,瘤胃内挥发性脂肪酸的产量提高会降低瘤胃 pH^[18],一方面,下降的 pH 刺激胃动素的释放,而胃动素又可引起胃和十二指肠的收缩,促进胃蛋白酶和胰液的分泌。45 和 90 日龄,IBFE 组空肠近端、空肠远端和回肠胰蛋白酶活性显著高于其他处理组($P < 0.05$)。另一方面,pH 并不直接影响瘤胃和小肠发育,但它的变化会引起 VFA 比例变化,影响犊牛胃肠道的发育,从而影响肠道消化酶活性^[14];断奶后犊牛进食含纤维较多的固体饲料,日粮添加的纤维素分解酶和异丁酸此时就可以弥补犊牛因瘤胃发育不完全,瘤胃内微生物的数量以及消化腺分泌的纤维分解酶的不足而导致的日粮消化利用率低,提高犊牛对纤维素的利用率,促进胃肠道和胰腺的发育,由胰腺分泌的胰淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性也相应增高;反刍动物的小肠依然是营养物质消化吸收的主要场所,其中小肠上皮细胞的纹状缘含有多种消化酶直接参与营养物质的消化过程,绒毛越长、越粗、表面积越大也越利于消化吸收,有研究指出在犊牛日粮中添加纤维素酶和异戊酸可显著提高各肠段壁厚度、绒毛长度、黏膜厚度及隐窝深度^[19]。所以小肠组织形态结构与其酶活性关系更是密不可分;小肠各部位内容物 pH 不同,相应部位各种酶活性不同;其中空肠内容物 pH 呈弱碱性,最接近各种消化酶最佳活性,所以空肠消化酶活性高于十二指肠和回肠。除此之外,日粮底物浓度亦会影响消化酶活性,当日粮中淀粉、脂肪和蛋白含量增高时,小肠淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的活性同样也会增高^[20-22]。

3.2 日粮添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛肝生长激素、胰岛素和胰岛素样生长因子 1 受体 mRNA 表达的影响

GH 是垂体前叶分泌对于动物生长发育所必需

的一种多肽类激素,然而 GH 必须与靶器官上 GHR 相结合才能发挥其生物学功能^[23],其中肝 GHR 水平较高,GH 作用于肝中 GHR 产生 IGF-IR,IGF-I 又具有促进细胞生长发育、有丝分裂和代谢的重要功能^[24-25]。外周血液中的 IGF-I 主要来自肝,所以肝中 GHR mRNA 表达量在一定程度上决定了动物体的生长发育。李红梅等认为生长轴激素与蛋白、能量的新陈代谢之间是一种复杂的调节和反馈机制,并在其研究中指出降低动物营养物质的摄入能提高血液中 GH 含量,但会降低 GHR 数量和血液中 IGF-I 浓度^[26]。从本试验血清中 GH、In、IGF-I 浓度结果可知,IB 和 IBFE 组的浓度显著高于对照组,但 IB 与 IBFE 组之间差异不显著。证明异丁酸可以提高反刍动物对日粮营养物质的利用,从而增加肝生长轴激素受体基因的表达和血液中生长轴激素的浓度。而纤维素酶对此作用并不明显。另外,胰岛素也主要与肝的 IR 相结合,介导葡萄糖进入肝细胞合成糖原。所以肝 GHR、IGF-IR 和 IR 及其相关基因的表达水平与动物生长发育关系非常密切。从日粮营养角度,能量和蛋白是影响 GHR、IGF-IR 和 IR mRNA 表达量的两个关键因素^[26-27]。如前所述,日粮添加纤维素分解酶和异丁酸有效的促进日粮的消化利用,提高瘤胃挥发性脂肪酸产量^[9,11],而挥发性脂肪酸最重要的作用正是为反刍动物提供能源,其中丙酸是肝糖异生的主要前体物质,为动物体代谢提供所需的葡萄糖,另外有研究发现挥发性脂肪酸又可以促进 GH 和 IGF-I 的生成^[28-29]。从肝胰岛素受体基因表达的结果可知,IB、FE 组与对照组之间差异不显著,所以,单独添加纤维分解酶或异丁酸对于肝胰岛素受体基因表达无明显作用。而 IBFE 组却显著高于 IB、FE 和对照组,证明纤维分解酶和异丁酸对于影响犊牛肝胰岛素受体基因表达存在一定协同作用。日粮中添加纤维素酶可提高对纤维素的利用,为机体增加可发酵碳水化合物,为瘤胃微生物提供更多的可利用能量,促进 $\text{NH}_3\text{-N}$ 合成菌体蛋白。使更多进入肠道的蛋白得到充分的消化、吸收^[30]。所以纤维分解酶和异丁酸是通过调节机体对蛋白和能量的摄入从而影响肝 GHR、IGF-IR 和 IR 基因的表达。

4 结论

在犊牛日粮中分别添加纤维分解酶和异丁酸均

能不同程度提高犊牛小肠消化酶活性和肝中 *GHR*、*IGF-IR* 和 *IR* mRNA 的表达量,但单独添加异丁酸效果要优于单独添加纤维分解酶,而综合所有试验结果,混合添加纤维分解酶和异丁酸效果最佳。

参考文献(References):

- [1] SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues; biodegradation and bioconversion by fungi[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(2):185-194.
- [2] GIRALDO L A, TEJIDO M L, RANILLA M J, et al. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters[J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(8):1962-1970.
- [3] 马 乐, 毕小龙, 刘 强, 等. 纤维分解酶与异丁酸对断奶前后犊牛小肠黏膜基因表达的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(S1):82-86.
MA L, BI X L, LIU Q, et al. Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on gene expressions of small intestinal mucosa of calves before and after weaning[J]. *Chinese Journal of Animal and Husbandry*, 2015, 51(S1):82-86. (in Chinese)
- [4] ALLISON M J, BRYANT M P, KATZ I, et al. Metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci II. Biosynthesis of higher branched-chain fatty acids and aldehydes[J]. *J Bacteriol*, 1962, 83(5):1084-1093.
- [5] YANG C M. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85(5):1183-1190.
- [6] 李鹤琼, 刘 强, 王 聪, 等. 2-甲基丁酸对断奶前后犊牛瘤胃发酵、酶活及纤维分解菌菌群的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(12):2218-2226.
LI H Q, LIU Q, WANG C, et al. Effects of 2-methylbutyrate supplementation on rumen fermentation, enzyme activities and cellulolytic bacteria in pre-and post-weaning dairy calves[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(12):2218-2226. (in Chinese)
- [7] 梁 艳, 刘 强, 王 聪, 等. 异丁酸对犊牛瘤胃及小肠黏膜基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(8):2483-2492.
LIANG Y, LIU Q, WANG C, et al. Effects of isobutyrate on gene expressions of ruminal and small intestinal mucosa of calves[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8):2483-2492. (in Chinese)
- [8] 张贵花, 王 聪, 刘 强, 等. 纤维分解酶处理玉米秸秆对肉牛瘤胃发酵和养分消化代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(9):2091-2100.
ZHANG G H, WANG C, LIU Q, et al. Effects of corn straw fermented by cellulase on rumen fermentation, nutrient digestion and metabolism in beef cattle[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(9):2091-2100. (in Chinese)
- [9] 刘 强, 黄应祥, 王 聪, 等. 异丁酸对西门塔尔牛瘤胃发酵及尿嘌呤衍生物的影响[J]. 动物营养学报, 2006, 18(3):160-165.
LIU Q, HUANG Y X, WANG C, et al. Effects of isobutyrate on rumen fermentation and purine derivatives of urine in simmental steer. [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, 18(3):160-165. (in Chinese)
- [10] GOROSITO A R, RUSSELL J B, VAN SOEST P J. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant cell wall *in vitro*[J]. *J Dairy Sci*, 1985, 68(4):840-847.
- [11] 许倩倩, 侯 明, 王 聪, 等. 纤维分解酶与异丁酸对犊牛瘤胃液酶活力和纤维分解菌菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(9):2841-2848.
XU Q Q, HOU M, WANG C, et al. Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on enzyme activities and cellulolytic bacteria flora in rumen fluid in calves[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(9):2841-2848. (in Chinese)
- [12] 佟莉蓉. 0-6 月龄犊牛胰腺和小肠主要消化酶发育规律的研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2001.
TONG L R. Study on development of the main digestive in pancreas and small intestine enzymes in calves [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2001. (in Chinese)
- [13] 仁瑞清, 高艳霞, 曹玉凤, 等. 不同饲喂模式对犊牛小肠及胰腺内消化酶活性的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(3):72-76.
REN R Q, GAO Y X, CAO Y F, et al. Effects of different feed patterns on enzyme activity in the small intestine and pancreas of pre-weaning calves[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2013, 49(3):72-76.
- [14] 张英杰, 刘月琴, 孙洪新, 等. 羔羊小肠 pH 主要消化酶发育规律的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(2):149-152.
ZHANG Y J, LIU Y Q, SUN H X, et al. Study on the development of digesta pH and main digestive enzymes of small Intestine in lamb[J]. *Acta Veterinaria*

- et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(2):149-152. (in Chinese)
- [15] 杜 莎. 日粮碳水化合物平衡指数对山羊消化道酶活性和养分瘤胃降解率的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- DU S. Effects of dietary carbohydrate balance index on digestible enzyme activities in gastrointestinal tract and rumen nutrient degradability of goats[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2008. (in Chinese)
- [16] 李朝云. 壳聚糖与纤维素酶对瘤胃发酵, 甲烷产生及微生物区系的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- LI C Y. Effects of chitosan and exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation, methane production and microorganism populations[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2014. (in Chinese)
- [17] WANG X B, TANIGUCHI K, OBITSU T. Response of pancreatic exocrine secretion in sheep fed different type and amount of hay[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2000, 13(8):1044-1049.
- [18] ASCHENBACH J R, PENNER G B, STUMPF F, et al. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(4):1092-1107.
- [19] 毕小龙. 纤维分解酶, 异丁酸及其混合物对犊牛小肠发育的影响[D]. 太谷:山西农业大学, 2014.
- BI X L. Effects of fibrolytic enzymes, isobutyrate or their combination on development of small intestine in dairy calves[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [20] HARMON D L. Dietary influences on carbohydrases and small intestinal starch hydrolysis capacity in ruminants[J]. *J Nutr*, 1992, 122(1):203-210.
- [21] MONTAGNE L, CREVIEU-GABRIEL I, TOULLEC R, et al. Influence of dietary protein level and source on the course of protein digestion along the small intestine of the veal calf[J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86(3):934-943.
- [22] KHAN M A, WEARY D M, VON KEYSERLINGK M A G. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk [J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(7):3547-3553.
- [23] WELLS J A. Binding in the growth hormone receptor complex[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(1):1-6.
- [24] LEWIS A J, WESTER T J, BURRIN D G, et al. Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 278(4):R838-R844.
- [25] 王 蕊, 黄 昆. 胰岛素受体家族的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(12):1102-1109.
- WANG R, HUANG K. Structure and function of insulin receptor family proteins[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(12):1102-1109. (in Chinese)
- [26] 李红梅, 王 哲, 夏 成, 等. 干奶期奶牛不同能量摄入对其肝脏胰岛素受体 mRNA 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(6):617-620.
- LI H M, WANG Z, XIA C, et al. Effect of energy intake level on the expression of IR mRNA in the liver of periparturient cows [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, 37(6):617-620. (in Chinese)
- [27] BREIER B H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis[J]. *Domest Anim Endocrin*, 1999, 17(2):209-218.
- [28] ZHAO G Y, SUN Y B. Effects of volatile fatty acids on *IGF-I*, *IGFBP-3*, *GH*, insulin and glucagon in plasma, and *IGF-I* and *IGFBP-3* in different tissues of growing sheep nourished by total intragastric infusions[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2010, 23(3):366-371.
- [29] MA S, ZHAO G. Effects of acetic, propionic and butyric acids given intraruminally at different molar proportions or individually on rumen papillae growth and *IGF-I* and *IGFBP-3* in plasma, liver and rumen tissue in growing sheep nourished by total intragastric infusions[J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(16):2468-2473.
- [30] 程茂基, 卢德勋, 王洪荣, 等. 不同来源肽对培养液中瘤胃细菌蛋白产量的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1):1-5.
- CHENG M J, LU D X, WANG H R, et al. Studies on the effect of different peptides on ruminal bacterial protein yield in the culture[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35(1):1-5. (in Chinese)