

香菇多糖对脂多糖刺激的仔猪空肠细胞死亡信号通路相关基因表达的影响

梁天增 汪龙梅 余程 王秀英 刘玉兰 朱惠玲*

(武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北重点实验室,武汉 430023)

摘要: 本试验旨在探讨香菇多糖对脂多糖(LPS)刺激的仔猪空肠细胞死亡信号通路相关基因表达的影响。选取24头健康的28日龄“杜×长×大”断奶仔猪,平均体重为(8.12±0.19) kg,随机分为4组,每组6个重复,每个重复1头猪。试验采用2×2因子设计,主因子分别为饲粮处理(基础饲粮或基础饲粮中添加0.02%的香菇多糖)和免疫应激处理(注射生理盐水或LPS)。试验第28天,免疫应激组仔猪腹膜注射100 μg/kg体重(BW)的LPS或生理盐水。注射LPS或生理盐水4 h后,仔猪麻醉屠宰,取空肠样品待测。试验期为28 d。结果表明:1) LPS刺激导致仔猪空肠绒毛萎缩,肠上皮脱落,肠道形态受损;饲粮添加香菇多糖缓解了LPS刺激所导致的肠道形态结构损伤。2) LPS刺激显著提高了空肠程序性坏死信号通路关键基因受体互作蛋白激酶3(RIP3)mRNA的相对表达量($P<0.05$),显著降低了动力相关蛋白1(Drp1)和混合系列蛋白激酶结构域样蛋白(MLKL)mRNA的相对表达量($P<0.05$)。饲粮添加香菇多糖显著降低了空肠程序性坏死信号通路关键基因受体互作蛋白激酶1(RIP1)、Fas死亡结构域相关蛋白(FADD)mRNA的相对表达量($P<0.05$)。3) LPS刺激显著降低了空肠焦亡信号通路关键基因凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶(Caspase)-1、白细胞介素-18(IL-18)以及凋亡信号通路关键基因Caspase-9、B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)mRNA的相对表达量($P<0.05$),显著提高了空肠焦亡信号通路关键基因核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)、消皮素D(GSDMD)及凋亡信号通路关键基因Caspase-8 mRNA的相对表达量($P<0.05$)。饲粮添加香菇多糖显著降低了空肠焦亡信号通路关键基因NLRP3 mRNA的相对表达量($P<0.05$)及凋亡信号通路关键基因Caspase-9和原癌基因蛋白x1(Bcl-x1)mRNA的相对表达量($P<0.05$)。4) LPS刺激显著降低了空肠自噬信号通路关键基因自噬相关基因12(Atg12)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和Unc-51样激酶1(ULK1)mRNA的相对表达量($P<0.05$)。饲粮添加香菇多糖显著降低了空肠自噬信号通路关键基因Atg12、LC3和ULK1 mRNA的相对表达量($P<0.05$)。由此可见,饲粮添加香菇多糖是通过调控程序性坏死、焦亡和自噬信号通路关键基因,从而维持肠道完整性。

关键词: 香菇多糖;程序性坏死与焦亡;自噬与凋亡;仔猪

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)02-0915-10

肠道上皮不仅是营养物质的主要消化和吸收组织,也是机体和外界环境直接接触的部位,是机

体抵抗病原体、毒素和抗原入侵的重要物理屏障^[1]。饲养环境以及饲粮中的致病或非致病因素

收稿日期:2019-08-24

基金项目:武汉市应用基础前沿项目(2018020401011304)

作者简介:梁天增(1995—),男,河南平顶山人,硕士研究生,从事猪的营养与免疫的研究。E-mail: 2523107520@qq.com

*通信作者:朱惠玲,副教授,硕士生导师,E-mail: zhuhuilin2004@sina.com

会使机体产生大量的炎症细胞因子^[2],后者会激活炎症信号通路,使肠黏膜受损,肠道内的病原穿过肠黏膜进入机体,导致机体出现全身性感染症状,损害机体健康^[3]。因此,胃肠道健康对机体的重要性不言而喻。目前,肠道损伤的机理还不甚清楚,近年来研究发现,肠道损伤往往涉及肠黏膜细胞死亡信号。细胞死亡方式有凋亡、自噬^[4]、程序性坏死以及焦亡^[5]。细胞凋亡、自噬和焦亡都与肠道损伤密切相关^[6]。

营养调控肠道健康已是现代营养学研究的热点。研究发现,香菇多糖是一种从香菇菌丝中提取的高分子葡聚糖,主要成分为含有 β -(1,6)分支的 β -(1,3)-葡聚糖,还含有少量的甘露糖、岩藻糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖等^[7],具有抗肿瘤、抗癌、抗病毒、抗凝血和免疫的作用^[8]。香菇多糖已经被全球公认为药物和食品的补充剂^[9]。此外,香菇多糖可通过减少炎症细胞因子和炎症细胞浸润来缓解肠道炎症^[10]。已有研究表明,断奶仔猪饲料中添加香菇多糖可提高机体抗氧化能力,改善肠道形态,维持肠道屏障功能,降低肠道通透性及缓解仔猪腹泻^[11-12]。在多糖对细胞凋亡、自噬的研究中,灵芝多糖可通过恢复丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路以及线粒体功能的恢复,防止棕榈酸引起的猪肠道上皮细胞的凋亡和自噬^[13]。对于上皮细胞损伤及死亡,已有文献表明脂多糖(LPS)可引起上皮细胞死亡基因半胱天冬酶(Caspase)-3和Caspase-8 mRNA的表达^[14]。目前,香菇多糖对肠道损伤保护作用的机理研究较少。因此,本试验旨在用LPS刺激来建立炎症损伤模型,研究香菇多糖对断奶仔猪肠道损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

选取24头健康的28日龄“杜×长×大”三元杂交断奶仔猪,平均体重为(8.12±0.19)kg,按照体重、窝别随机分为4组,每组6个重复,每个重复1头仔猪。试验采用2×2因子设计,主因子包括:饲料处理(基础饲料或基础饲料中添加0.02%的香菇多糖)和免疫应激处理(注射生理盐水或LPS)。香菇多糖纯度为50%,由陕西森弗天然制品有限

公司提供。LPS,大肠杆菌血清型O55:B5,美国Sigma公司提供。试验期为28d。基础饲料参照NRC(2012)仔猪营养需要量配制,其组成及营养水平见表1。

表1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)		%
项目 Items	含量 Content	
原料 Ingredients		
玉米 Corn	56.00	
豆粕 Soybean meal	22.00	
麸皮 Bran	3.00	
鱼粉 Fish meal	5.50	
玉米油 Corn oil	5.00	
大豆浓缩蛋白 Concentrate soy protein	2.50	
代乳粉 Milk-replacer powder	3.00	
石粉 Limestone	0.70	
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.00	
食盐 NaCl	0.20	
L-赖氨酸 L-Lys	0.27	
酸化剂 Acidifier	0.20	
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	
防腐剂 Antiseptic	0.05	
甜味剂 Aspartame	0.03	
预混料 Premix ¹⁾	0.50	
合计 Total	100.00	
营养水平 Nutrient levels ²⁾		
消化能 DE/(MJ/kg)	14.00	
粗蛋白质 CP	20.20	
钙 Ca	0.90	
总磷 TP	0.70	
总赖氨酸 Total Lys	1.35	
总蛋氨酸+半胱氨酸 Total Met+Cys	0.72	

1) 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 12 000 IU, VD₃ 2 500 IU, VE 30 IU, VK₃ 3 mg, VB₁₂ 18 μg, 核黄素 riboflavin 4 mg, 烟酸 nicotinic acid 40 mg, 泛酸 pantothenic acid 15 mg, 氯化胆碱 choline chloride 400 mg, 叶酸 folic acid 700 μg, VB₁ 1.5 mg, VB₆ 3 mg, 生物素 biotin 100 μg, Zn 80 mg, Mn 20 mg, Fe 83 mg, Cu 25 mg, I 0.48 mg, Se 0.36 mg。

2) 消化能、总赖氨酸和总蛋氨酸+半胱氨酸为计算值,其余为实测值。DE, total Lys and total Met+Cys were calculated values, while the others were measured values.

1.2 样品采集

在试验第28天,免疫应激组仔猪腹膜注射LPS(100 μg/kg 体重),其余组注射等量生理盐

水,4 h 后屠宰,取空肠中段样品,生理盐水冲洗,剪取 2 cm 组织置于 4% 多聚甲醛固定,用于肠黏膜形态学的观察。另取空肠中段 10 cm,排净食糜,生理盐水清洗,刮取肠黏膜置于液氮中冻存,随后转移至 -80 °C 冰箱保存。

1.3 检测指标

1.3.1 肠黏膜形态学观察

将固定的空肠组织常规石蜡包埋、切片和苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肠黏膜形态学变化。具体方法参照陈逢^[15]。

1.3.2 mRNA 表达分析

mRNA 的表达量采用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 法测定,具体方法参照陈逢^[15]。根据 NCBI 数据库所提供的猪的基因组序列为模板,利用 Primer Premier 6.0 软件设计引物,引物由武汉擎科生物技术有限公司合成,引物序列详见表 2。

以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*) 为内参基因,目的基因[受体互作蛋白激酶 1(*RIP1*)、受体互作蛋白激酶 3(*RIP3*)、混合系列蛋白激酶结构域样蛋白(*MLKL*)、Fas 死亡结构域相关蛋白(*FADD*)、磷酸甘油酸变位酶 5(*PGAM5*)、凋亡相关点状蛋白(*ASC*)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(*NLRP3*)、消皮素 D(*GSDMD*)、白细胞介素-18(*IL-18*)、自噬相关基因 12(*Atg12*)、自噬相关基因 16-L1(*Atg16L1*)、微管相关蛋白 1 轻链 3(*LC3*)、Unc-51 样激酶 1(*ULK1*)、*mTOR*、多聚泛素结合蛋白 p62(*SQSTM1*)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(*Bax*)、原癌基因蛋白 xl(*Bcl-xl*)、自杀相关因子配体(*Fasl*)、动力相关蛋白 1(*Drp1*)、*Caspase-1*、*Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-9*] 的 mRNA 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[16] 计算。

表 2 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5'—3')	扩增长度 Amplification length/bp	参考序列 Reference sequence
受体互作蛋白激酶 1 <i>RIP1</i>	F: ACATCCTGTACGGCAACTCT R: CGGGTCCAGGTGTTTATCC	175	XM_005665538.2
受体互作蛋白激酶 3 <i>RIP3</i>	F: CTTGTTGTCTGTCCGTGAGC R: GAGGAGTTGGGCTGTTGA	238	XM_001927424.3
混合系列蛋白激酶结构域样蛋白 <i>MLKL</i>	F: TCTCGCTGCTGCTTCA R: CTCGCTTGTCTTCCTCTG	105	XM_013998184.1
Fas 死亡结构域相关蛋白 <i>FADD</i>	F: AAGTGTCTGACGCCAAG R: CCTCCTGCTGTTCTTCC	101	XM_013987237.1
磷酸甘油酸变位酶 5 <i>PGAM5</i>	F: TCTTCATCTGCCACGCCAAT R: GGTGATGCTGCCGTTGTTG	104	XM_013992365.1
半胱天冬酶-8 <i>Caspase-8</i>	F: AGACAGACTCAGAACAGACAGA R: TGGCACAGTGATTGGATATAACC	166	NM_001031779.2
凋亡相关点状蛋白 <i>ASC</i>	F: CTTGTGCTGCGTGACATC R: TGCCTGGTACTGCTCTTC	237	AB873106.1
半胱天冬酶-1 <i>Caspase-1</i>	F: GAAGGAGAAGAGGAGGCTGTT R: AGATTGTGAACCTGTGGAGAGT	263	NM_214162.1
核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 <i>NLRP3</i>	F: TCCACACTTCTGACTTCTAAC R: CCTGCTTCCACCACTACT	241	NM_001256770.2
消皮素 D <i>GSDMD</i>	F: GACGCCATGCACCTTGAA R: TGACCTCCACCTCCTTCTG	127	XM_021090506.1
白细胞介素-18 <i>IL-18</i>	F: AGTAACCATCTCTGTGCAGTGT R: TCTTATCATCATGTCCAGGAAC	155	AF191088.1
3-磷酸甘油醛脱氢酶 <i>GAPDH</i>	F: CGTCCCTGAGACACGATGGT R: GCCTTGACTGTGCCGTGGAAT	194	AF017079.1

续表 2

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5'—3')	扩增长度 Amplification length/bp	参考序列 Reference sequence
自噬相关基因 12 <i>Atg12</i>	F:GCCTTCCTAGCGACTCTCA R:CGGCAGGTTCTTCTGTTCC	231	NM_001190282.1
自噬相关基因 16-L1 <i>Atg16L1</i>	F:CGAACAGGATGATGACATTGAAG R:GGAGCAGGAACGGAAGAGA	123	XM_021074592.1
微管相关蛋白 1 轻链 3 <i>LC3</i>	F:CGGAATCTCATCAGACATAGACAA R:GTAGGATAGCGTAGGCGAATAAG	218	EU979279.1
Unc-51 样激酶 1 <i>ULK1</i>	F:AGCATCGGCACCATCGT R:AGCGTCTGTCTTCTCGTAG	101	XM_021072525.1
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	F:TGCGTCAAGAAGGAGAAGGAA R:AGGCTGCTCGGATGATGTC	121	XM_003127584.6
多聚泛素结合蛋白 p62 <i>SQSTM1</i>	F:GATGGCGATGTCGTATGTGAA R:CTTGCTGTGCTCCTTGTAAG	244	XM_005654936.2
B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 <i>Bax</i>	F:CTACCAAGAAGTTGAGCGAGTG R:CCAGTTGAAGTTGCCGTCAG	158	XM_003127290.5
原癌基因蛋白 x1 <i>Bcl-xl</i>	F:GCAACCCATCCTGGCACCT R:TCAAACCTCATCGCCCGCCT	136	NM_214285.1
自杀相关因子配体 <i>FasI</i>	F:TCCTCTTCTCTTGCCATAGA R:CGAAGCCATCCGAGTCTG	148	BH168716.1
半胱天冬酶-3 <i>Caspase-3</i>	F:ACCCAAACTTTTCATAATTCA R:ACCAGGTGCTGTAGAATATGC	145	NM_214131.1
动力相关蛋白 1 <i>Drp1</i>	F:TGTGGGCTGCAGGTCATTA R:TTGCGCTGGGACATTTTAGC	144	XM_003127290.5
半胱天冬酶-9 <i>Caspase-9</i>	F:AACTTCTGCCATGAGTCGGG R:CCAAAGCCTGGACCATTTCG	142	XM_003127618

1.4 统计分析

试验结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行双因素方差分析。模型主效应包括饲料处理、免疫应激处理以及二者的互作效应。有互作效应时,采用 Duncan 氏法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $0.05 \leq P < 0.10$ 表示具有显著性趋势。

2 结果与分析

2.1 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠黏膜形态的影响

由图 1 可知,对照组和香菇多糖组空肠绒毛形态完整。LPS 刺激可导致肠绒毛萎缩,肠上皮脱落(图 1-C),肠黏膜固有层出血。饲料添加香菇多糖可缓解 LPS 刺激所导致的肠道损伤,表现为肠黏膜上皮轻度脱落,黏膜固有层少量出血(图 1-D)。

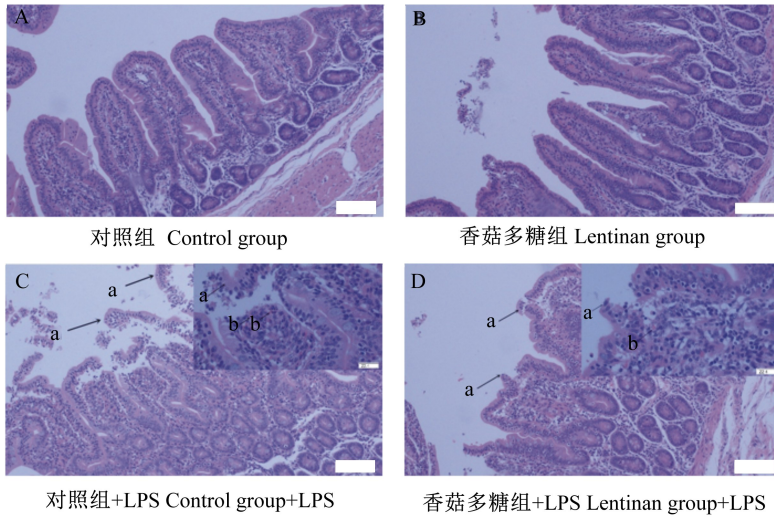
2.2 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠程序性坏死、凋亡、自噬以及焦亡信号通路关键基因相对表达量的影响

由表 3 可知,LPS 刺激显著提高了 *RIP3* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$),显著降低了 *Drp1* 和 *MLKL* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖显著降低了 *RIP1* 和 *FADD* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖和 LPS 刺激对空肠程序性坏死关键基因 mRNA 的相对表达量无显著互作效应($P > 0.05$)。

由表 4 可知,LPS 刺激显著提高了 *NLRP3* 和 *GSDMD* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$),显著降低了 *ASC*、*Caspase-1* 和 *IL-18* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖显著降低了 *NLRP3* mRNA 的相对表达量($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖和 LPS 刺激对空肠 *NLRP3* mRNA 的相

对表达量存在显著互作效应 ($P < 0.05$), 即在 LPS 刺激下, 饲料添加香菇多糖缓解了 LPS 刺激所导

致的 *NLRP3* mRNA 相对表达量的增加。



C、D 图右上图为 400 \times 。箭头 a 表示肠上皮脱落, 箭头 b 表示肠黏膜固有层出血。

The top right pictures of C and D were 400 \times . Arrow a indicated exfoliation of intestinal epithelium, arrow b indicated hemorrhage of lamina propria in intestinal mucosa.

图 1 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠黏膜形态的影响

Fig.1 Effects of dietary lentinan supplementation on jejunum mucosa morphology of piglets challenged with LPS (100 \times)

表 3 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠程序性坏死信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 3 Effects of dietary lentinan supplementation on mRNA relative expressions of jejunal necroptosis signaling pathway key genes of piglets challenged with LPS

项目 Items	生理盐水 Saline		脂多糖 LPS		SEM	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value		
	对照 Control	香菇多糖 Lentinan	对照 Control	香菇多糖 Lentinan		饲料 Diet	脂多糖 LPS	交互 Interaction
受体互作蛋白激酶 1 <i>RIP1</i>	1.00	0.86	1.16	0.96	0.07	0.022	0.070	0.688
受体互作蛋白激酶 3 <i>RIP3</i>	1.00	1.07	2.00	2.34	0.16	0.220	<0.001	0.412
混合系列蛋白激酶结构域样蛋白 <i>MLKL</i>	1.00	1.04	0.71	0.80	0.10	0.528	0.014	0.810
Fas 死亡结构域相关蛋白 <i>FADD</i>	1.00	0.91	1.02	0.85	0.06	0.040	0.756	0.493
磷酸甘油酸变位酶 5 <i>PGAM5</i>	1.00	1.04	1.00	0.90	0.07	0.672	0.279	0.290
动力相关蛋白 1 <i>Drp1</i>	1.00	1.08	0.68	0.65	0.13	0.850	0.012	0.719

由表 5 可知, LPS 刺激显著降低了 *Caspase-9* 和 *Bax* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$), 显著提高了 *Caspase-8* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖显著降低了 *Caspase-9* 和 *Bcl-xl* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖和 LPS 刺激对空肠 *Caspase-9* 和 *Caspase-8* mRNA 的相对表达量存在显著互作效应 ($P <$

0.05), 即在 LPS 刺激下, 饲料添加香菇多糖可降低 *Caspase-9* 和 *Caspase-8* mRNA 的表达。

由表 6 可知, LPS 刺激显著降低了 *Atg12*、*LC3*、*mTOR* 和 *ULK1* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖显著降低了 *Atg12*、*LC3* 和 *ULK1* mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)。饲料添加香菇多糖和 LPS 刺激对空肠 *LC3* mRNA 的相对

表达量存在显著互作效应($P<0.05$),即在 LPS 刺激下,饲料添加香菇多糖可降低 *LC3* mRNA 的表达。

表 4 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠焦亡信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 4 Effects of dietary lentinan supplementation on mRNA relative expressions of jejunal pyroptosis signaling pathway key genes of piglets challenged with LPS

项目 Items	生理盐水 Saline		脂多糖 LPS		SEM	P 值 P-value		
	对照 Control	香菇多糖 Lentinan	对照 Control	香菇多糖 Lentinan		饲料 Diet	脂多糖 LPS	互作 Interaction
凋亡相关斑点样蛋白 <i>ASC</i>	1.00	1.07	0.68	0.62	0.08	0.959	<0.001	0.412
半胱天冬酶 1 <i>Caspase-1</i>	1.00	1.11	0.78	0.74	0.05	0.540	<0.001	0.153
核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 <i>NLRP3</i>	1.00	0.97	1.63	1.23	0.09	0.020	<0.001	0.045
消皮素 D <i>GSDMD</i>	1.00	0.96	2.04	3.24	0.49	0.251	0.003	0.221
白细胞介素-18 <i>IL-18</i>	1.00	0.89	0.77	0.60	0.08	0.090	0.003	0.722

表 5 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠凋亡信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 5 Effects of dietary lentinan supplementation on mRNA relative expression of jejunal apoptosis signaling pathway key genes of piglets challenged with LPS

项目 Items	生理盐水 Saline		脂多糖 LPS		SEM	P 值 P-value		
	对照 Control	香菇多糖 Lentinan	对照 Control	香菇多糖 Lentinan		饲料 Diet	脂多糖 LPS	互作 Interaction
半胱天冬酶 3 <i>Caspase-3</i>	1.00	1.01	1.01	0.97	0.09	0.850	0.873	0.736
半胱天冬酶 9 <i>Caspase-9</i>	1.00	1.00	0.87	0.56	0.05	0.014	<0.001	0.011
半胱天冬酶 8 <i>Caspase-8</i>	1.00	0.87	1.09	1.08	0.07	0.347	0.047	0.042
原癌基因蛋白 xl <i>Bcl-xl</i>	1.00	0.93	1.03	0.82	0.06	0.042	0.562	0.267
B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 <i>Bax</i>	1.00	1.01	0.94	0.78	0.06	0.251	0.034	0.222
自杀相关因子配体 <i>FasI</i>	1.00	1.32	0.98	0.79	0.13	0.699	0.053	0.074

表 6 饲料添加香菇多糖对 LPS 刺激仔猪空肠自噬信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 6 Effects of dietary lentinan supplementation on mRNA relative expressions of jejunal autophagy signaling pathway key genes of piglets challenged with LPS

项目 Items	生理盐水 Saline		脂多糖 LPS		SEM	P 值 P-value		
	对照 Control	香菇多糖 Lentinan	对照 Control	香菇多糖 Lentinan		饲料 Diet	脂多糖 LPS	互作 Interaction
自噬相关基因 12 <i>Atg12</i>	1.00	0.94	0.96	0.77	0.05	0.020	0.048	0.232
自噬相关基因 16-L1 <i>Atg16-L1</i>	1.00	1.02	1.19	1.03	0.06	0.265	0.118	0.184
微管相关蛋白 1 轻链 3 <i>LC3</i>	1.00	0.84	0.72	0.71	0.03	0.007	<0.001	0.023
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	1.00	0.98	0.83	0.65	0.06	0.118	<0.001	0.193
多聚泛素结合蛋白 p62 <i>SQSTM1</i>	1.00	0.92	0.92	0.83	0.05	0.157	0.140	0.911
Unc-51 样激酶 1 <i>ULK1</i>	1.00	0.97	0.83	0.57	0.05	0.014	<0.001	0.055

3 讨论

腹腔内注射 LPS 被广泛用作内毒素诱导的急

性肠损伤研究的试验模型, LPS 刺激可引起黏膜损伤, 细菌移位, 产生强烈的肠道炎症反应^[3,17]。本试验发现, 在 LPS 刺激 4 h 后, 仔猪肠绒毛萎缩,

肠上皮脱落,肠黏膜固有层出血,这与 Wang 等^[17]和 Zhu 等^[18]的研究相似。饲料添加香菇多糖则可以缓解 LPS 刺激导致的肠道损伤,维持肠黏膜结构完整性^[19]。一般认为,香菇多糖可以通过降低炎症细胞因子的释放缓解肠道炎症,但具体作用的分子机理仍不清楚^[22]。因此,本试验研究了饲料中添加香菇多糖对仔猪肠道损伤的保护作用以及作用机理。

肠道损伤往往涉及肠黏膜细胞的死亡。程序性坏死是一种由死亡信号调控的不依赖 Caspase 的细胞死亡方式^[21]。激活程序性坏死信号通路可导致细胞膜破裂,胞质外溢,从而引发炎症及细胞损伤^[22]。与程序性坏死类似,激活焦亡信号通路也会导致细胞膜肿胀破裂形成小孔,内容物释放,白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-18 前体裂解并诱导其他炎症因子等的合成和释放,诱发局部到全身的炎症反应^[23]。Welz 等^[24]发现,程序性坏死和肠上皮细胞损伤有关。坏死性肠炎的发生往往与焦亡信号通路激活有关^[25]。因此,激活程序性坏死和焦亡信号通路往往导致肠道炎症和损伤,调节程序性坏死及焦亡信号通路关键因子可缓解细胞损伤。大量研究表明,LPS 可以激活程序性坏死信号通路^[26-27]。本试验研究发现,LPS 刺激提高了程序性坏死信号通路 RIP3 及焦亡信号通路 NLRP3 和 GSDMD mRNA 的相对表达量,激活了程序性坏死及焦亡信号通路,导致了肠道炎症和损伤;饲料中添加 0.02% 的香菇多糖降低了程序性坏死信号通路关键基因 (RIP1、FADD) 和焦亡信号通路关键基因 (NLRP3) mRNA 的相对表达量。Wang 等^[12]研究表明,香菇多糖可以缓解 LPS 刺激导致的炎症及损伤,这与本试验的研究结果一致。目前,未见香菇多糖对程序性坏死及焦亡信号通路的报道,因此,香菇多糖是通过抑制程序性坏死及焦亡信号通路缓解 LPS 刺激导致的肠道炎症及损伤。

细胞死亡方式往往是相互联系的,细胞凋亡主要由 Bcl-2 家族、Caspase 家族、抑癌基因 p53 以及癌基因如 C-myc 等控制,它是机体维持内环境稳定而采用的一种特殊细胞死亡类型,具有重要的生物学意义^[28]。凋亡和自噬存在着联系,自噬先于凋亡而发生,凋亡和自噬存在着互相拮抗的作用^[29-30]。自噬依赖于 mTOR 信号通路介导,mTOR 信号通路对自噬活化激酶 ULK 进行负调

控,是细胞组分自我降解的过程^[31-32]。Li 等^[33]研究发现,关键基因 mTOR mRNA 的相对表达量降低,自噬信号通路激活,导致肠道损伤;而抑制自噬,则可以缓解肠道损伤。大量研究证实,LPS 主要通过刺激机体产生炎症细胞因子而导致肠道受损,而本试验发现 LPS 也降低了自噬信号通路关键基因 mTOR mRNA 的相对表达量,说明 LPS 刺激导致肠道受损也与激活的自噬信号通路有关。此外,LPS 还降低了凋亡启动基因 Caspase-9 以及凋亡上游关键基因 Bax 和 Fas1 mRNA 的相对表达量,抑制了凋亡信号通路。有趣的是,在体外试验中,Jiang 等^[34]发现 LPS 可诱导肠上皮细胞凋亡。体内细胞凋亡是一个复杂的生理生化过程,启动凋亡信号需要 LPS 作用一定的时间。本试验中,仔猪注射 LPS 4 h 后,虽然导致肠道损伤,但此时并未激活凋亡信号通路。香菇多糖对自噬信号通路相关基因表达的研究尚未见报道,但大量研究表明香菇多糖可诱导肿瘤细胞凋亡。本研究表明,饲料中添加 0.02% 的香菇多糖降低自噬信号通路关键基因 Atg12、LC3、ULK1 mRNA 的相对表达量及凋亡信号通路关键基因 Caspase-9 和 Bcl-xl mRNA 的相对表达量,抑制自噬及凋亡信号通路,缓解肠道损伤,维持肠黏膜完整性。

4 结 论

饲料中添加 0.02% 的香菇多糖可缓解 LPS 诱导的肠道损伤,香菇多糖是通过调控程序性坏死、焦亡和自噬信号通路的关键基因的表达,来维持肠道完整性。

参考文献:

- [1] ZHU C, WU Y P, JIANG Z Y, et al. Dietary soy isoflavone attenuated growth performance and intestinal barrier functions in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(1): 288-294.
- [2] 陈少魁,刘玉兰,王海波,等.亚麻籽油对脂多糖刺激仔猪肝脏 Toll 样受体 4 和核苷酸结合寡聚化结构域信号通路关键基因表达的影响[J].动物营养学报, 2016, 28(3): 891-898.
- [3] LIU Y L, CHEN F, ODLE J, et al. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge [J]. The Journal of Nutrition, 2012, 142(11): 2017-

- 2024.
- [4] LUEDDE T, KAPLOWITZ N, SCHWABE R F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(4):765-783.e4.
- [5] 汪龙梅.香菇多糖对脂多糖刺激的断奶仔猪肠道损伤的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2018.
- [6] GÜNTHER C, MARTINI E, WITTKOPF N, et al. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necrosis and terminal ileitis [J]. *Nature*, 2011, 477(7364):335-339.
- [7] 秦令祥,崔胜文,周婧琦,等.香菇多糖的提取技术研究进展[J].食品研究与开发,2018,39(18):214-218.
- [8] XU W T, ZHANG F F, LUO Y B, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum* [J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(2):217-222.
- [9] ZHANG Y Y, LI S, WANG X H, et al. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2):196-206.
- [10] NISHITANI Y, ZHANG L, YOSHIDA M, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on *IL-8* and *TNFR1* expression in intestinal epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62441.
- [11] MAO X B, HU H Y, XIAO X C, et al. Lentinan administration relieves gut barrier dysfunction induced by rotavirus in a weaned piglet model [J]. *Food & Function*, 2019, 10(4):2094-2101.
- [12] WANG X Y, WANG W J, WANG L M, et al. Lentinan modulates intestinal microbiota and enhances barrier integrity in a piglet model challenged with lipopolysaccharide [J]. *Food & Function*, 2019, 10(1):479-489.
- [13] LIANG Z E N, YUAN Z H, GUO J J, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides prevent palmitic acid-evoked apoptosis and autophagy in intestinal porcine epithelial cell line via restoration of mitochondrial function and regulation of MAPK and AMPK/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3):478.
- [14] KUCUKGUL A, ERDOGAN S. Low concentration of oleic acid exacerbates LPS-induced cell death and inflammation in human alveolar epithelial cells [J]. *Experimental Lung Research*, 2017, 43(1):1-7.
- [15] 陈逢.鱼油通过TLR4和NOD信号通路对脂多糖诱导的仔猪肠道、肝脏损伤和肌肉蛋白质降解的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2013.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [17] WANG X Y, LIU Y L, LI S, et al. Asparagine attenuates intestinal injury, improves energy status and inhibits AMP-activated protein kinase signalling pathways in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(4):553-565.
- [18] ZHU H L, LIU Y L, CHEN S K, et al. Fish oil enhances intestinal barrier function and inhibits corticotropin-releasing hormone/corticotropin-releasing hormone receptor 1 signalling pathway in weaned pigs after lipopolysaccharide challenge [J]. *British Journal of Nutrition*, 2016, 115(11):1947-1957.
- [19] VAN NEVEL C J, DECUYPERE J A, DIERICK N, et al. The influence of *Lentinus edodes* (shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2003, 57(6):399-412.
- [20] YOSUKE N, LING Z, MASARU Y, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan: influence on *IL-8* and *TNFR1* expression in intestinal epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62441.
- [21] 李先根.细胞程序性坏死在脂多糖诱导的仔猪肝脏损伤中的作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2019.
- [22] 于辛,陈丽香,周晓辉.程序性细胞坏死及其信号通路[J].微生物与感染,2015,10(1):61-66.
- [23] 胡艳红,张凡,张楚焱,等.程序性细胞死亡形式研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(12):85-89.
- [24] WELZ P S, WULLAERT A, VLANTIS K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2011, 477(7364):330-334.
- [25] LI Z Y, JIA Y Y, FENG Y, et al. Methane alleviates sepsis-induced injury by inhibiting pyroptosis and apoptosis: *in vivo* and *in vitro* experiments [J]. *Aging*, 2019, 11(4):1226-1239.
- [26] 申兵冰.程序性坏死研究进展[J].重庆医学,2018,47(3):406-409.
- [27] VANDEN BERGHE T, LINKERMANN A, JOUAN-

- LANHOUE T S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15 (2): 135-147.
- [28] 汪洋. 程序性坏死信号通路在脂多糖诱导的仔猪肠道损伤中的作用[D]. 硕士学位论文. 武汉: 武汉轻工大学, 2019.
- [29] 王月霞, 陈敏. 自噬性细胞死亡及其与细胞凋亡、坏死关系研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(10): 1433-1436.
- [30] LIAO A J, HU R, LI Y C, et al. The study of FTY720 on inducing apoptosis and autophagy in multiple myeloma cell line U266[J]. *Journal of Hematology*, 2011, 32(32): 664-667.
- [31] 白晓, 万多, 宋晓宇. 凋亡、自噬与程序性细胞坏死的信号关联网路[J]. *解剖科学进展*, 2017, 23(4): 430-432, 435.
- [32] HE C C, KLIONSKY D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 67-93.
- [33] LI B C, YAO X, LUO Y H, et al. Inhibition of autophagy attenuated intestinal injury after intestinal I/R via mTOR signaling[J]. *Journal of Surgical Research*, 2019, 243: 363-370.
- [34] JIANG Q, LIU G, CHEN J S, et al. Crosstalk between nuclear glucose-regulated protein 78 and tumor protein 53 contributes to the lipopolysaccharide aggravated apoptosis of endoplasmic reticulum stress-responsive porcine intestinal epithelial cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48: 2441-2455.

Effects of Lentinan on Jejunal Cell Death Signaling Pathway Related Gene Expression of Piglets Challenged with Lipopolysaccharide

LIANG Tianzeng WANG Longmei YU Cheng WANG Xiuying LIU Yulan ZHU Huiling*

(Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to investigate the effects of lentinan on jejunal cell death signaling pathway related gene expression of piglets challenged with lipopolysaccharide (LPS). Twenty-four healthy 28-day-old “Duroc×Landrace×Yorkshire” weaned piglets with average body weight of (8.12 ± 0.19) kg were randomly divided into 4 groups with 6 replicates per group and 1 pig per replicate. The experiment consisted of a 2×2 factorial design, and the main factors included dietary treatment (basic diet or basic diet supplemented with 0.02% lentinan) and immunological stress treatment (injection of saline or LPS). On days 28 of the experiment, piglets in immune groups were injected with 100 μg/kg BW of LPS or saline. After 4 h LPS or saline administration, the animals were slaughtered and the jejunal samples were collected for analysis. The experiment lasted for 28 days. The results showed as follows: 1) LPS challenge caused jejunal villus atrophy, intestinal epithelial exfoliation and intestinal morphology damage of piglets; dietary lentinan supplementation alleviated intestinal morphology injury induced by LPS. 2) LPS challenge significantly increased the mRNA relative expression of necroptotic signal pathway key gene of receptor interacting protein kinase 3 (RIP3) in jejunum ($P<0.05$), and significantly decreased the mRNA relative expressions of dynamic related protein 1 (Drp1) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) ($P<0.05$). Dietary lentinan supplementation significantly decreased the mRNA relative expressions of necroptotic signaling pathway key genes of receptor interacting protein kinase 1 (RIP1) and Fas associated protein with death domain (FADD) in jejunum ($P<0.05$). 3) LPS challenge significantly decreased the mRNA relative expressions of pyroptosis signaling pathway key genes of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cysteinyl aspartate specific protease (Caspase)-1, interleukin-18 (IL-18) and apoptosis signaling pathway key genes of Caspase-9, B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein (Bax) in jejunum ($P<0.05$), and significantly increased the mRNA relative expressions of pyroptosis signaling pathway key genes of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD) and apoptosis signaling pathway key genes of Caspase-8 ($P<0.05$). Dietary lentinan supplementation significantly decreased the mRNA relative expressions of pyroptosis signaling pathway key gene of NLRP3 and apoptosis signaling pathway key genes of Caspase-9, B-cell lymphoma-x1 (Bcl-x1) in jejunum ($P<0.05$). 4) LPS challenge significantly decreased the mRNA relative expressions of autophagic signaling pathway key genes of autophagy related gene 12 (Atg12), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), mammalian target of rapamycin (mTOR) and UNC-51 like kinase 1 (ULK1) in jejunum ($P<0.05$). Dietary lentinan supplementation significantly decreased the mRNA relative expressions of autophagy signaling pathway key genes of Atg12, LC3 and ULK1 in jejunum ($P<0.05$). In conclusion, dietary lentinan supplementation maintain intestinal integrity by regulating key genes in necroptosis, pyroptosis and autophagy signaling pathways. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(2):915-924]

Key words: lentinan; necroptotic and pyroptosis; apoptosis and autophagy; piglets