

饲料补充精氨酸对低出生重哺乳仔猪肝脏氧化还原状态和线粒体功能的影响

张浩 陈代文 余冰 何军 虞洁 毛湘冰 罗玉衡
黄志清 罗钧秋 郑萍*

(四川农业大学动物营养研究所,动物抗病营养教育部重点实验室,雅安 625014)

摘要: 本试验通过研究精氨酸(Arg)对低出生重(LBW)哺乳仔猪机体氧化还原平衡状态和线粒体功能的影响,探讨Arg改善LBW哺乳仔猪生长发育的可能机制。试验选取体况接近、产期一致和胎次相近的初产母猪所产仔猪,4日龄时,选取20头LBW[体重(1.16±0.08)kg]和10头正常出生重(NBW)[体重(2.07±0.10)kg]仔猪,按体重相近、公母比例一致的原则分为NBW组(饲喂基础饲料)、LBW组(饲喂基础饲料)和LBW+Arg组(基础饲料补充1%Arg)3个组,每组10个重复,每个重复1头猪,人工乳饲养21d。在第22天,屠宰并收集所有试验猪的血清与肝脏样品,检测生长性能、氧化还原状态与线粒体功能指标。结果表明:1)与NBW仔猪相比,LBW仔猪末重、平均日增重(ADG)和平均日干物质摄入量(ADMI)显著降低($P<0.05$),肝脏过氧化氢酶(CAT)活性和ATP含量显著下降($P<0.05$),肝脏环氧化酶(COX) I mRNA表达量显著下调($P<0.05$),肝脏视神经萎缩症蛋白1(OPA1)mRNA表达量有下调的趋势($P=0.089$);2)饲料补充Arg显著提高LBW仔猪末重、ADG和ADMI($P<0.05$),显著提高血清CAT活性和肝脏CAT、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性($P<0.05$),显著提高肝脏ATP含量($P<0.05$),显著上调肝脏GPx1和线粒体融合蛋白1(Mfn1)mRNA表达量($P<0.05$),并且有上调肝脏CAT($P=0.056$)、COXIV($P=0.063$)和OPA1($P=0.087$)mRNA表达量的趋势。以上研究表明,LBW仔猪肝脏抗氧化能力下降,线粒体功能受阻,生长发育受到抑制;而饲料补充1%Arg显著提高LBW仔猪肝脏抗氧化能力,改善线粒体功能,提高LBW仔猪生长性能。

关键词: 低出生重;哺乳仔猪;精氨酸;氧化还原状态;线粒体功能

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)02-0654-10

低出生重(low birth weight, LBW)仔猪定义为出生重低于1 kg的仔猪^[1],自然发生的LBW仔猪比例高达15%~20%^[2]。前人研究显示,窝产仔数增加导致仔猪出生重降低,同时LBW仔猪存活率也显著降低;进一步发现成活的LBW仔猪在生长过程中体重显著降低,脏器发育受阻,肌肉生长受限,育肥出栏的时间增加和肉品质降低,这造

成养猪业严重损失^[3-10]。本课题组前期研究表明,LBW降低仔猪平均日增重(ADG)和平均日干物质摄入量(ADMI),造成仔猪机体氧化还原平衡破坏,导致机体产生氧化损伤,影响仔猪正常生长^[1]。

研究报道,氧化应激与动物多种代谢疾病相关,导致动物健康受损^[11]。大量试验发现,与正常

收稿日期:2019-07-25

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31501963)

作者简介:张浩(1994—),男,陕西宝鸡人,硕士研究生,从事猪的营养研究。E-mail: 1398710565@qq.com

*通信作者:郑萍,副教授,硕士生导师,E-mail: zpind05@163.com

出生重 (normal birth weight, NBW) 仔猪比较, LBW 仔猪抗氧化系统遭到明显破坏, 氧化损伤明显增强, 表明 LBW 仔猪遭受了氧化应激^[12-15]。线粒体是动物细胞能量代谢的主要场所, 也是氧自由基产生的主要场所, 如果细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 无法被及时有效清除, 将会对细胞线粒体功能造成严重损伤^[16]。研究表明, LBW 造成仔猪线粒体结构破坏, 导致线粒体生物合成受到损伤^[1, 17]。

精氨酸 (Arg) 是哺乳仔猪生长的一种必需氨基酸^[18-19]。研究显示, 饲料补充 Arg 可以改善仔猪的生长性能, 缓解 LBW 仔猪机体的氧化应激, 增强仔猪抗氧化能力, 抑制动物细胞线粒体结构功能损伤^[19-24]。但是, 饲料补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪氧化损伤主要靶点线粒体功能的影响报道较少。因此, 本研究旨在通过探究饲料补充 Arg 改善 LBW 哺乳仔猪生长性能的作用机制, 为生产中利用 Arg 改善 LBW 哺乳仔猪健康发育提供理论依据, 同时对 LBW 仔猪配方乳的研发提供数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与试验设计

试验选取胎次接近、产期一致的初产母猪所产仔猪, 参考 Zheng 等^[1]的选择标准, 首先标记出 40 头 0.8~1.0 kg 的新生 LBW 仔猪和 20 头 1.5~1.7 kg 的新生 NBW 仔猪, 前 3 d 充分采食初乳; 4 日龄时, 选取 20 头 LBW 仔猪 [体重为 (1.16 ± 0.08) kg] 和 10 头 NBW 仔猪 [体重为 (2.07 ± 0.10) kg], 按体重相近、公母比例一致的原则分为 NBW 组 (饲喂基础饲料)、LBW 组 (饲喂基础饲料) 和 LBW+Arg 组 (基础饲料补充 1% Arg) 3 个处理, 每组 10 个重复, 每个重复 1 头猪。人工乳饲养 21 d。

1.2 试验材料

L-Arg 和 *L*-丙氨酸 (*L*-Ala) 均由上海易蒙斯公司提供, 纯度为 99%。

1.3 试验饲料

试验所用饲料为人工配方乳, 基础饲料组成及营养水平见表 1。LBW+Arg 组在基础饲料基础上补充 1% 的 *L*-Arg, 此添加量根据本课题组前期研究^[1]确定, 通过补充 *L*-Ala 和葡萄糖与基础饲料进行等能等氮处理。饲喂前按照代乳粉:水 = 1 : 4

的比例加入 40 °C 温开水中充分溶解, 奶瓶饲喂, 吃饱为准。

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	
全脂奶粉 Whole milk powder (34%)	58.00
乳清浓缩蛋白 Whey protein concentrate	26.00
酪蛋白 Casein	2.00
葡萄糖 Glucose	1.18
椰子油 Coconut oil	10.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.10
维生素预混料 Vitamin premix ¹⁾	0.10
矿物质预混料 Mineral premix ²⁾	0.10
<i>L</i> -赖氨酸盐酸盐 <i>L</i> -Lys · HCl (78%)	0.26
<i>DL</i> -蛋氨酸 <i>DL</i> -Met (98.5%)	0.11
<i>L</i> -苏氨酸 <i>L</i> -Thr (98%)	0.10
<i>L</i> -丙氨酸 <i>L</i> -Ala (99%)	2.05
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ³⁾	
干物质 DM	96.91
消化能 DE/(MJ/kg)	21.05
粗蛋白质 CP	27.34
粗脂肪 EE	25.72
乳糖 Lactose	35.94
钙 Ca	0.96
有效磷 AP	0.59
可消化赖氨酸 Digestible Lys	2.05
可消化蛋氨酸 Digestible Met	0.78
可消化苏氨酸 Digestible Thr	1.21
可消化色氨酸 Digestible Trp	0.49
可消化精氨酸 Digestible Arg	0.80

1) 维生素预混料为每千克饲料提供 The vitamin premix provided the following per kg of the diet: VA 0.94 mg, VD₃ 0.01 mg, VE 20 mg, VK₃ 1 mg, VB₁ 1.5 mg, VB₂ 0.1 mg, 生物素 biotin 2 mg, VB₆ 2 mg, VB₁₂ 0.04 mg, 烟酸 niacin 20 mg, *D*-泛酸 *D*-pantothenic acid 15 mg, 叶酸 folic acid 1.5 mg。

2) 矿物质预混料为每千克饲料提供 The mineral premix provided the following per kg of the diet: Fe (as ferrous sulfate) 100 mg, Cu (as copper sulfate) 10 mg, Mn (as ferrous sulfate) 5 mg, Zn (as zinc sulfate) 100 mg, Se (as sodium selenite) 0.3 mg, I (as potassium iodide) 0.2 mg。

3) 计算值 Calculated values。

1.4 饲养管理

试验在四川农业大学动物营养研究所教学科研基地进行,所有仔猪单笼饲养于仔猪代谢笼中。试验前对圈舍及代谢笼进行全面消毒,试验期间圈舍温度控制在 28~30 ℃。每天饲喂 7 次,时间分别为 06:00、09:00、12:00、15:00、18:00、21:00 和 24:00,每次饲喂以仔猪吃饱为准。每次饲喂记录每头猪对配方乳的摄入量,计算相应的干物质摄入量。试验期间不对猪只使用任何抗生素类药物,其余按基地要求进行操作管理。

1.5 样品采集与处理

1.5.1 血液样品采集

试验第 22 天清晨,对所有试验猪进行空腹采血,将采集的前腔静脉血缓缓注入采血管中,3 500 r/min 离心 15 min,分离血清,分装,-20 ℃ 保存待测。

1.5.2 肝脏组织样品采集

屠宰后,分离仔猪肝脏组织,用滤纸吸干表面,于冰上剪取肝脏组织,置于无菌冻存管中,锡箔纸包好,液氮速冻,-80 ℃ 保存待测。

1.6 测定指标与方法

1.6.1 生长性能指标

正式试验第 1 和 22 天早上,对所有试验猪空腹称重,记录体重,并在试验期间记录每头仔猪的饲喂量,换算成相应的干物质摄入量,计算其 ADMI 和 ADG,并计算相应的饲料转化率(FE)。

1.6.2 血清氧化还原指标

血清过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性和丙二醛(MDA)含量均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行检测,操作均按照试剂盒说明书严格进行。

1.6.3 肝脏氧化还原指标

测定之前将肝脏组织样品进行匀浆,制成 10% 匀浆液待测。肝脏 CAT、SOD 和 GPx 活性以及 MDA 和总蛋白(TP)含量均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行检测,操作均按照试剂盒说明书严格进行。

1.6.4 肝脏钙离子(Ca²⁺)、ATP 和线粒体通透性转换孔(mPTP)含量

肝脏组织 Ca²⁺、ATP 和 TP 含量均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行检测,操作均按照试剂盒说明书严格进行。

肝脏线粒体 mPTP 含量采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司)测定,操作均按照试剂盒说明书严格进行。

1.6.5 肝脏基因表达测定

采用实时荧光定量 PCR 法测定肝脏和空肠氧化还原相关基因 mRNA 表达量。总 RNA 提取按照试剂盒(Trizol Reagent, TaKaRa, 日本)说明进行, RNA 质量检测使用核酸蛋白检测仪(Beckman DU-800, CA, 美国)检测 260 和 280 nm 吸光度, A_{260/A280} 值在 1.8~2.0 为合格。cDNA 合成按照逆转录试剂盒(Prime Script™ reagent kit, TaKaRa, 日本),反应结束后-20 ℃ 保存。引物均由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 2。样品的实时荧光定量 PCR 扩增,反应体系为 10 μL: 5 μL SYBR Premix Ex Taq™ II (2×), 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 3 μL 双蒸水, 1 μL cDNA 模板。采用两步法 PCR 扩增标准程序:模板预变性, 95 ℃, 30 s; 扩增, 95 ℃, 5 s, 适宜的退火温度, 30 s, 共 42 个循环; 熔解曲线, 55~95 ℃, 温度以 0.5 ℃/s 速率提升。组织中各基因的相对表达量以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。每个样品在同一板上做 2 个平行,然后以它们的平均值用于数据统计分析。

1.7 数据统计分析

试验数据首先采用 Excel 2016 进行整理,再采用 SPSS 22.0 软件中的一般线性模型(GLM)进行单因素方差分析(one-way ANOVA),结合 Duncan 氏法进行多重比较,分析各组间的差异显著性,所有试验结果数据均以“平均值±标准误”表示, P<0.05 表示差异显著, 0.05≤P<0.10 表示有变化趋势。

2 结果

2.1 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪生长性能的影响

如表 3 所示,与 NBW 组仔猪相比, LBW 组仔猪末重、ADG 和 ADMI 显著降低(P<0.05); 饲粮补充 Arg 显著提高 LBW 哺乳仔猪末重、ADG 和 ADMI(P<0.05)。

2.2 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪血清抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响

如表 4 所示,饲粮补充 Arg 显著提高 LBW 哺乳仔猪血清 CAT 活性(P<0.05)。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	退火温度 Anneal temperature/°C	GenBank 登录号 GenBank ID
β -肌动蛋白 β -actin	F: CCTGCGGCATCCACGAAAC R: TGTCGGCGATGCTTGGGTA	55.8	XM_003124280.3
过氧化氢酶 CAT	F: TGTACCCGCTATTCTGGGGA R: TCACACAGGCGTTTCTCTC	55.8	NM_214301.2
超氧化物歧化酶 SOD	F: GAGACCTGGGCAATGTGACT R: CTGCCAAGTCATCTGGTTT	65.0	E06791.1
谷胱甘肽过氧化酶 1 GPx1	F: GCTCGGTGTATGCCTTCTCT R: AGCGACGCTACGTTCTCAAT	59.7	AF532927.1
核因子 E2 相关因子 2 Nrf2	F: GAAAGCCCAGTCTTCATTGC R: TTGGAACCGTGCTAGTCTCA	59.7	XM_003133500.5
醌氧化还原酶 1 NQO1	F: GTATCCTGCCGAGACTGCTC R: TAGCAGGGACTCCAAACCAC	59.7	NM_001159613.1
血红素氧合酶-1 HO-1	F: GCTGAGAATGCCGAGTTCAT R: TGTAGACCGGGTTCTCCTTG	55.8	NM_001004027.1
过氧化物酶体增植物激活受体 γ 共激活因子-1 α PGC-1 α	F: CCCGAAACAGTAGCAGAGACAAG R: CTGGGGTCAGAGGAAGAGATAAAG	59.7	NM_213963
线粒体转录因子 A TFAM	F: GGTCCATCACAGGTAAAGCTGAA R: ATAAGATCGTTTCGCCAACTTC	55.8	NM_001130211.1
细胞核呼吸因子 1 NRF1	F: GCCAGTGAGATGAAGAGAAACG R: CTACAGCAGGGACCAAAGTTCAC	59.7	AK237171.1
环氧化酶 I Cox I	F: ATTATCCTGACGCATACACAGCA R: GCAGATACTTCTCGTTTTGATGC	59.7	AJ950517.1
环氧化酶 IV Cox IV	F: CCAAGTGGGACTACGACAAGAAC R: CCTGCTCGTTTATTAGCACTGG	59.7	AK233334.1
环氧化酶 V Cox V	F: ATCTGGAGGTGGTGTTCCTACTG R: GTTGGTGATGGAGGGGACTAAA	59.7	AY786556.1
细胞色素 C CytC	F: AGTTGGCCACCGCCTTATTT R: CCAACAGAAACATTCCATCAGCC	55.8	NM_001129970
ATP 合成酶 ATPS	F: TGTCCTCCTCCCTATCACACATT R: TAGTGTTATGACGTTGGCTTGA	59.7	AK230503
线粒体分裂蛋白 1 Fis1	F: AGTAGTGAGGATTGCGAGGC R: TACTTGCTTCGCACCAGACA	59.7	XM_021086263.1
线粒体动力相关蛋白 1 Drp1	F: GCAGCCATTTCAAAACCTGT R: TTTGAGGGGTAGGGGGATTTT	59.7	NM_017426.4
视神经萎缩症蛋白 1 OPA1	F: TGCCTGACATTGTGTGGGAG R: AACCAATTTGTGACCTGTGGTG	59.7	XM_021070065.1
线粒体融合蛋白 1 Mfn1	F: GAAAGCACAAAGCACAGGGG R: CTTTTCTCTGCTGCTGCCAC	59.7	XM_021068494.1
线粒体融合蛋白 2 Mfn2	F: CCTCTGTTCAGTTGTGCCA R: CATGCACAGCAACTCCTAGC	59.7	XM_021095364.1

表3 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪生长性能的影响

Table 3 Effects of dietary Arg on growth performance of LBW suckling piglets ($n=10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
出生重 Birth body weight/kg	1.59±0.04 ^a	0.92±0.05 ^b	0.91±0.05 ^b	<0.001
初重 Initial body weight/kg	2.07±0.03 ^a	1.17±0.03 ^b	1.16±0.03 ^b	<0.001
末重 Final body weight/kg	8.65±0.28 ^a	5.50±0.09 ^c	6.24±0.15 ^b	<0.001
平均日增重 ADG/g	314±12 ^a	207±3 ^c	242±6 ^b	<0.001
平均日干物质摄入量 ADMI/g	229±9 ^a	144±3 ^c	174±5 ^b	<0.001
饲料转化率 FE	1.37±0.04	1.44±0.03	1.39±0.01	0.364

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

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

表4 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪血清抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响

Table 4 Effects of dietary Arg on serum antioxidant enzyme activity and MDA content of LBW suckling piglets ($n=10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	1.23±0.11	1.32±0.12	0.97±0.14	0.172
过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	12.48±1.11 ^b	11.83±1.03 ^b	16.28±0.91 ^a	0.027
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mL)	62.08±1.61 ^b	64.49±2.47 ^{ab}	70.66±2.78 ^a	0.038
谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/(U/mL)	171.84±6.33	163.62±15.66	194.33±17.03	0.257

2.3 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响

如表 5 所示,与 NBW 组仔猪相比, LBW 组仔

猪肝脏 CAT 活性显著降低($P<0.05$);饲粮补充 Arg 显著提高 LBW 仔猪肝脏 CAT、SOD 和 GPx 活性($P<0.05$)。

表5 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响

Table 5 Effects of dietary Arg on liver antioxidant enzyme activity and MDA content of LBW suckling piglets ($n=10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	1.19±0.19	1.27±0.15	1.29±0.22	0.913
过氧化氢酶 CAT/(U/mg prot)	142.76±12.44 ^b	98.89±3.52 ^c	178.06±16.09 ^a	0.001
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	99.77±5.82 ^b	103.29±2.61 ^b	124.46±5.45 ^a	0.006
谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/(U/mg prot)	366.75±20.98 ^b	349.71±34.15 ^b	465.45±39.81 ^a	0.040

2.4 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏氧化还原相关基因表达的影响

如表 6 所示,饲粮补充 Arg 显著上调 LBW 仔猪肝脏 GPx1 mRNA 表达量($P<0.05$),有上调 LBW 仔猪肝脏 CAT mRNA 表达量的趋势($P=0.056$)。

2.5 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏 Ca²⁺、mPTP 和 ATP 含量的影响

如表 7 所示,与 NBW 组相比, LBW 组仔猪肝脏 ATP 含量显著降低($P<0.05$);饲粮补充 Arg 显著提高 LBW 仔猪肝脏 ATP 含量($P<0.05$)。

2.6 饲粮补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏线粒体功能相关基因表达的影响

如表 8 所示,与 NBW 组相比, LBW 组仔猪肝

脏环氧化酶(*COX*) I mRNA 表达量显著下调($P < 0.05$), 肝脏视神经萎缩症蛋白 1(*OPA1*) mRNA 表达量呈下调趋势($P = 0.089$); 饲料补充 Arg 显

著上调 LBW 仔猪肝脏线粒体融合蛋白 1(*Mfn1*) mRNA 表达量($P < 0.05$), 并且有上调 *COXIV* ($P = 0.063$) 和 *OPA1* ($P = 0.087$) mRNA 表达量的趋势。

表 6 饲料补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏氧化还原相关基因表达的影响

Table 6 Effects of dietary Arg on liver redox related gene expression of LBW suckling piglets ($n = 10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
过氧化氢酶 <i>CAT</i>	1.00±0.09	0.88±0.07	1.16±0.12	0.153
超氧化物歧化酶 <i>SOD</i>	1.00±0.07	0.92±0.09	1.17±0.13	0.351
谷胱甘肽过氧化物酶 1 <i>GPx1</i>	1.00±0.10 ^{ab}	0.74±0.08 ^b	1.11±0.17 ^a	0.107
核因子 E2 相关因子 2 <i>Nrf2</i>	1.00±0.08	0.96±0.09	1.09±0.15	0.687
醌氧化还原酶 1 <i>NQO1</i>	1.00±0.10	0.91±0.10	1.06±0.18	0.702
血红素氧合酶-1 <i>HO-1</i>	1.00±0.12	0.96±0.11	1.03±0.14	0.915

表 7 饲料补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏 Ca^{2+} 、mPTP 和 ATP 含量的影响

Table 7 Effects of dietary Arg on contents of Ca^{2+} , mPTP and ATP in liver of LBW suckling piglets ($n = 10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
钙离子 Ca^{2+} /(mmol/g prot)	0.20±0.01	0.20±0.00	0.20±0.01	0.964
线粒体通透性转换孔 mPTP/(ng/g prot)	106.78±7.78	112.19±1.24	105.15±2.13	0.670
三磷酸腺苷 ATP/(μ mol/g prot)	291.59±11.36 ^a	213.55±10.93 ^b	269.60±5.42 ^a	<0.001

表 8 饲料补充 Arg 对 LBW 哺乳仔猪肝脏线粒体功能相关基因表达的影响

Table 8 Effects of dietary Arg on mitochondrial function related gene expression in liver of LBW suckling piglets ($n = 10$)

项目 Items	组别 Groups			P 值 P-value
	NBW	LBW	LBW+Arg	
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α <i>PGC-1α</i>	1.00±0.10	0.96±0.12	0.93±0.10	0.895
线粒体转录因子 A <i>TFAM</i>	1.00±0.06	0.94±0.11	1.03±0.11	0.793
细胞核呼吸因子 1 <i>NRF1</i>	1.00±0.10	0.84±0.05	1.01±0.11	0.344
环氧化酶 I <i>Cox I</i>	1.00±0.09 ^a	0.70±0.09 ^b	0.84±0.05 ^{ab}	0.046
环氧化酶 IV <i>CoxIV</i>	1.00±0.08	0.78±0.05	0.98±0.07	0.071
环氧化酶 V <i>Cox V</i>	1.18±0.14	1.00±0.09	1.24±0.10	0.348
细胞色素 C <i>CytC</i>	1.00±0.12	0.76±0.11	1.04±0.19	0.331
ATP 合成酶 <i>ATPS</i>	1.00±0.08	0.96±0.11	1.07±0.13	0.752
线粒体分裂蛋白 1 <i>Fis1</i>	1.00±0.12	0.89±0.13	1.03±0.15	0.755
线粒体动力相关蛋白 1 <i>Drp1</i>	1.00±0.17	1.09±0.15	0.98±0.11	0.877
视神经萎缩症蛋白 1 <i>OPA1</i>	1.00±0.17	0.88±0.18	1.32±0.12	0.212
线粒体融合蛋白 1 <i>Mfn1</i>	1.00±0.16 ^b	0.81±0.13 ^b	1.54±0.23 ^a	0.034
线粒体融合蛋白 2 <i>Mfn2</i>	1.00±0.12	0.89±0.23	1.18±0.26	0.684

3 讨论

LBW 仔猪定义为出生重低于 1 kg 的仔猪^[1]。大量研究表明, 出生重是决定仔猪出生后生长性

能的重要因素^[1,3,25]。本试验发现, LBW 仔猪在试验期内体重、ADG 与 ADMI 均显著低于 NBW 仔猪, 这与前人研究结果一致, 表明 LBW 造成仔猪生长发育受阻。Arg 是母猪母乳的第一限制性

氨基酸^[26]。Wang等^[15]研究显示,饲料补充0.6% Arg显著提高LBW仔猪的生长性能。本研究显示,饲料补充1% Arg显著提高LBW仔猪ADG、ADMI及末重,这与本课题组前期研究结果^[1]一致,说明饲料补充1% Arg能够通过提高LBW哺乳仔猪采食量,促进LBW仔猪生长。而本试验显示,Arg补充对LBW哺乳仔猪FE无显著影响,说明Arg不是通过改善饲料转化而是通过提高采食量,促进LBW仔猪生长的。

正常生理条件下,动物机体处于动态的氧化还原平衡状态,当机体受到刺激后,ROS过量产生,导致机体氧化还原平衡遭到破坏。陈才勇等^[13]研究发现,新生的LBW仔猪肝脏存在过氧化,自由基含量较多,且脂质过氧化明显。核因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路是动物机体内缓解氧化损伤的重要防御机制;Nrf2的激活可诱导其与核内抗氧化反应元件(ARE)结合,转录其下游多保护性蛋白的转录表达^[27-29]。本试验发现,与NBW仔猪比较,LBW仔猪血清GPx活性有降低趋势,这与前人研究结果基本一致,表明LBW仔猪机体氧化抗氧化系统受损。Arg是机体的自由基清除剂^[30]。Zheng等^[1]研究显示,饲料补充1% Arg显著降低LBW哺乳仔猪血清蛋白质羰基含量,提高血清SOD和GPx的活性;进一步在空肠内也得到了相似的结论,表明适量补充Arg显著降低仔猪氧化损伤。Ramprasath等^[23]在Arg介导的缓解左心室氧化应激的试验中发现,Arg促进Nrf2及其下游基因血红素氧合酶-1(HO-1)和醌氧化还原酶1(NQO1)基因表达。本试验结果显示,饲料补充1% Arg显著提高LBW仔猪血清CAT活性和肝脏CAT、SOD和GPx活性,并显著上调肝脏抗氧化酶GPx1基因表达;这与前人在LBW仔猪上的研究结果一致,表明饲料补充1% Arg通过调节Nrf2信号通路和提高抗氧化酶活性显著促进LBW哺乳仔猪机体抗氧化功能。

机体氧化还原平衡被打破后,产生的ROS改变膜蛋白结构和酶活性,当细胞内ROS无法被及时有效清除,将会对细胞线粒体功能造成严重损伤^[31]。线粒体呼吸链的功能是进行生物氧化,并与ATP合成酶(ATPS)相偶联,最终完成氧化磷酸化,产生ATP^[32]。细胞色素C(CytC)、COX V、COX IV和ATPS均是呼吸链传递过程中重要的酶,其表达量的下调说明线粒体的电子传递功能

下降^[33-34]。本研究发现,与NBW仔猪相比,LBW仔猪肝脏COX I mRNA表达量显著降低。线粒体融合与分裂平衡对维持线粒体数量与形态功能有重要意义。线粒体分裂过程参与细胞凋亡过程,主要由线粒体动力相关蛋白1(Drp1)和线粒体分裂蛋白1(Fis1)2种蛋白共同完成;而线粒体融合过程有利于膜电位快速传递等作用,主要由OPA1、Mfn1和线粒体融合蛋白2(Mfn2)共同完成其功能^[35-36]。本研究发现,与NBW仔猪相比,LBW仔猪肝脏OPA1 mRNA表达量有降低的趋势。以上结果表明,LBW仔猪肝脏线粒体功能有所损伤。Mandal等^[20]研究显示,Arg缺乏会导致线粒体的损伤,Arg去除后,脯氨酸、谷氨酸和甘氨酸等其他氨基酸作用无法恢复细胞正常生长,这表明Arg的作用是其他氨基酸无法替代的。本研究发现,饲料补充Arg显著提高LBW仔猪肝脏Mfn1 mRNA表达量,并且有提高肝脏COX IV和OPA1 mRNA表达量的趋势。以上研究表明,在LBW仔猪饲料中补充Arg能显著改善其线粒体功能。线粒体是动物细胞内能量代谢、产生ATP的主要场所,被称为“能量工厂”^[37]。前人研究显示,Arg有利于心肌细胞ATP水平的维持^[30]。本研究结果显示,与NBW仔猪相比,LBW仔猪肝脏ATP含量显著降低,而饲料补充Arg能够显著提高LBW仔猪肝脏ATP含量,这进一步证明了Arg对LBW仔猪线粒体功能的改善作用。

4 结 论

LBW仔猪肝脏抗氧化能力下降,线粒体功能受阻,生长发育受到抑制;而饲料补充1% Arg显著提高LBW仔猪肝脏抗氧化能力,改善线粒体功能,提高LBW仔猪生长性能。

参考文献:

- [1] ZHENG P, SONG Y, TIAN Y H, et al. Dietary arginine supplementation affects intestinal function by enhancing antioxidant capacity of a nitric oxide-independent pathway in low-birth-weight piglets [J]. The Journal of Nutrition, 2018, 148(11): 1751-1759.
- [2] 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): 2316-2337.
- [3] REHFELDT C, TUCHSCHERER A, HARTUNG M,

- et al. A second look at the influence of birth weight on carcass and meat quality in pigs [J]. *Meat Science*, 2008, 78(3): 170-175.
- [4] GONDRET F, LEFAUCHEUR L, LOUVEAU I, et al. Influence of piglet birth weight on postnatal growth performance, tissue lipogenic capacity and muscle histological traits at market weight [J]. *Livestock Production Science*, 2005, 93(2): 137-146.
- [5] REHFELDT C, KUHN G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(Suppl): E113-E123.
- [6] RUEDA-CLAUSEN C F, MORTON J S, DAVIDGE S T. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood [J]. *Cardiovascular Research*, 2009, 81(4): 713-722.
- [7] GONDRET F, LEFAUCHEUR L, JUIN H, et al. Low birth weight is associated with enlarged muscle fiber area and impaired meat tenderness of the longissimus muscle in pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(1): 93-103.
- [8] POWELL S E, ABERLE E D. Effects of birth weight on growth and carcass composition of swine [J]. *Journal of Animal Science*, 1980, 50(5): 860-868.
- [9] CAMPBELL R G, DUNKIN A C. The effect of birth weight on the estimated milk intake, growth and body composition of sow-reared piglets [J]. *Animal Science*, 1982, 35(2): 193-197.
- [10] 胡亮. 营养干预对宫内发育迟缓仔猪生长性能、肠道发育和免疫功能的影响 [D]. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [11] PRYOR W A. Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols [M]. Totowa: The Humana Press, 2002.
- [12] WANG W, EGROOTE J, VAN GINNEKEN C, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes [J]. *FASEB Journal*, 2016, 30(2): 863-873.
- [13] 陈才勇. 新生仔猪脂类代谢和肝脏发育的动态变化及胎儿宫内发育迟缓对其的影响 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [14] 何进田, 董丽, 白凯文, 等. 三丁酸甘油酯对宫内发育迟缓哺乳仔猪肝脏抗氧化和线粒体功能的影响 [J]. *食品科学*, 2016, 37(3): 191-196.
- [15] WANG Y X, ZHANG L L, ZHOU G L, et al. Dietary L-arginine supplementation improves the intestinal development through increasing mucosal Akt and mammalian target of rapamycin signals in intra-uterine growth retarded piglets [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108(8): 1371-1381.
- [16] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 2006, 1757(5/6): 509-517.
- [17] LIU J B, YU B, MAO X B, et al. Effects of intrauterine growth retardation and maternal folic acid supplementation on hepatic mitochondrial function and gene expression in piglets [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2012, 66(5): 357-371.
- [18] WU G Y, KNABE D A. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk [J]. *The Journal of Nutrition*, 1994, 124(3): 415-424.
- [19] FLYNN N E, KNABE D A, MALLICK B K, et al. Postnatal changes of plasma amino acids in suckling pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(9): 2369-2375.
- [20] MANDAL A, DAS S, ROY S, et al. Deprivation of L-arginine induces oxidative stress mediated apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes: contribution of the polyamine pathway [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(1): e0004373.
- [21] KIM S W, MCPHERSON R L, WU G Y. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 625-630.
- [22] WU G Y, MEININGER C J, KNABE D A, et al. Arginine nutrition in development, health and disease [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2000, 3(1): 59-66.
- [23] RAMPRASATH T, KUMAR P H, PUHARI S S M, et al. L-arginine ameliorates cardiac left ventricular oxidative stress by upregulating *eNOS* and *Nrf2* target genes in alloxan-induced hyperglycemic rats [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 428(3): 389-394.
- [24] BLACHIER F, SELAMNIA M, ROBERT V, et al. Metabolism of L-arginine through polyamine and nitric oxide synthase pathways in proliferative or differentiated human colon carcinoma cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1995, 1268(3): 255-262.
- [25] MILLIGAN B N, FRASER D, KRAMER D L. Within-litter birth weight variation in the domestic pig and

- its relation to pre-weaning survival, weight gain, and variation in weaning weights[J]. *Livestock Production Science*, 2002, 76(1/2):181-191.
- [26] DE VOS M, CHE L, HUYGELEN V, et al. Nutritional interventions to prevent and rear low-birthweight piglets[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2014, 98(4):609-619.
- [27] MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2004, 10(11):549-557.
- [28] NGUYEN T, NIOI P, PICKETT C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20):13291-13295.
- [29] KASPAR J W, NITURE S K, JAISWAL A K. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 47(9):1304-1309.
- [30] 姜桢, 郭克芳, 董苏斐. 左旋精氨酸与氧自由基的相互作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2000, 16(10):503-505.
- [31] 刘树森. 线粒体呼吸链与活性氧[J]. *生命科学*, 2008, 20(4):519-527.
- [32] 孙飞, 周强军, 孙吉, 等. 线粒体呼吸链膜蛋白复合体的结构[J]. *生命科学*, 2008, 20(4):566-578.
- [33] TURRENS J F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain[J]. *Bioscience Reports*, 1997, 17(1):3-8.
- [34] MORO M A, ALMEIDA A, BOLAÑOS J P, et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39(10):1291-1304.
- [35] BERTHOLET A M, DELERUE T, MILLET A M, et al. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity[J]. *Neurobiology of Disease*, 2015, 90:3-19.
- [36] WANG X L, SU B, LEE H G, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease[J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29(28):9090-9103.
- [37] BROOKES P S, YOON Y, ROBOTHAM J L, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle[J]. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2004, 287(4):C817-C833.

Effects of Dietary *L*-Arginine on Liver Redox Status and Mitochondrial Function of Suckling Piglets with Low Birth Weight

ZHANG Hao CHEN Daiwen YU Bing HE Jun YU Jie MAO Xiangbing LUO Yuheng
HUANG Zhiqing LUO Junqiu ZHENG Ping*

(Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of Ministry of Education, Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This study investigated the effects of *L*-arginine (Arg) on liver redox balance status and mitochondrial function of suckling piglets with low birth weight (LBW) aiming to explore the possible mechanism of Arg, which improved the growth and development of LBW suckling piglets. Piglets from primary sows with similar body condition, delivery period and parity were selected, and at 4 days of age, ten normal birth weight [NBW, body weight of (2.07 ± 0.10) kg] piglets and twenty LBW [body weight of (1.16 ± 0.08) kg] piglets were selected and divided into 3 groups with 10 replicates per group and 1 pig per replicate according to the similar body weight and consistent proportion of males and females. NBW piglets were fed a basal diet (a kind of artificial milk, NBW group), and LBW piglets were fed the basal diet (LBW group) or the basal diet supplemented with 1% Arg (LBW+Arg group). The experiment lasted for 21 days. At day 22, all piglets were slaughtered, then serum and liver samples were collected and growth performance, redox status, and mitochondrial function were determined. The results showed as follows: 1) compared with NBW piglets, the final weight, average daily gain (ADG) and average daily dry matter intake (ADMI) of LBW piglets were significantly decreased ($P < 0.05$), the liver catalase (CAT) activity and ATP content were also significantly reduced ($P < 0.05$), the liver cyclooxygenase (COX) I mRNA expression level was significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the liver optic atrophy protein 1 (OPA1) mRNA expression level was tended to be down-regulated ($P = 0.089$). 2) Dietary Arg significantly improved the final weight, ADG and ADMI ($P < 0.05$), significantly enhanced serum CAT activity and liver activity of CAT, superoxide dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GPx) ($P < 0.05$), significantly increased liver ATP content ($P < 0.05$), significantly up-regulated the mRNA expression levels of liver GPx1 and mitofusin 1 (Mfn1) ($P < 0.05$), and tended to up-regulate the mRNA expression levels of liver CAT ($P = 0.056$), COXIV ($P = 0.063$) and OPA1 ($P = 0.087$). In summary, LBW piglets exhibit lower liver antioxidant capacity and blocked mitochondrial function, which leads to impaired growth and development of piglets; while 1% Arg supplementation promotes growth performance through enhancing antioxidant capacity and improving mitochondrial function in liver of LBW piglets. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(2):654-663]

Key words: low birth weight; suckling piglets; arginine; redox status; mitochondrial function