

早期断奶对仔猪小肠中谷氨酸/谷氨酰胺转运载体表达的影响

王秋菊¹ 崔一喆^{1*} 王梦竹¹ 贾军峰¹ 胡海燕² 武志敏² 耿忠诚¹

(1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院,大庆 163319;2.黑龙江省杜尔伯特蒙古族自治县畜牧局,大庆 166299)

摘要: 本试验旨在研究早期断奶对仔猪小肠中谷氨酸/谷氨酰胺转运载体表达的影响。试验从40头母猪的仔猪中各选出体重相近、10日龄的杜长大三元杂交仔猪1头,共40头仔猪,随机不配对分为2组,每组20头仔猪,对照组为哺乳仔猪,随母猪喂养;试验组为断奶仔猪,隔离断奶饲养。试验期10d。饲养结束,每组随机选取12头仔猪,屠宰后取空肠和回肠组织,测定谷氨酸/谷氨酰胺转运载体蛋白和mRNA表达情况,并检测小肠组织形态和小肠氧化应激水平。结果表明:与哺乳仔猪相比,早期断奶显著提高了仔猪空肠和回肠谷氨酸/胱氨酸交换载体(xCT)和中性氨基酸转运载体2(ASCT2)蛋白和mRNA表达量($P<0.05$);皮尔森相关分析结果显示,断奶仔猪与哺乳仔猪的xCT和ASCT2蛋白表达量在空肠和回肠组织匀浆、细胞内质、细胞顶膜与空肠和回肠中对应mRNA表达量之间均呈正向线性关系,且差异显著($P<0.05$)。与哺乳仔猪相比,断奶仔猪空肠和回肠绒毛高度降低,隐窝深度增加,差异均显著($P<0.05$)。与哺乳仔猪相比,断奶仔猪空肠和回肠组织的总抗氧化能力均显著降低($P<0.05$),且空肠氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量显著提高($P<0.05$),回肠谷胱甘肽(GSH)含量显著降低($P<0.05$)。结果提示,早期断奶使仔猪小肠处于氧化应激状态,显著提高断奶仔猪小肠组织中xCT和ASCT2蛋白及mRNA表达量,以促进谷氨酸/谷氨酰胺的摄取,降低仔猪小肠的氧化应激水平。

关键词: 仔猪;小肠;谷氨酸转运载体;谷氨酰胺转运载体;抗氧化能力

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)07-3324-09

为了提高养猪业的经济效益,提高养殖效率,现代化养猪生产普遍采用早期断奶技术,且仔猪断奶日龄日趋提前^[1]。然而早期断奶时仔猪肠道没有完全发育成熟,采食量出现下降,生长受阻^[2]。如何为断奶仔猪正常生长提供全面的营养,增强断奶仔猪机体免疫力,提高仔猪生长速度,是目前养猪业所面临的重要任务。为解决这些难题,首先要了解仔猪在早期断奶期间机体营养物质的变化和营养物质的转运吸收机制。氨基酸作为重要的营养物质之一,既可氧化供能^[3],又

可作为蛋白质^[4]、核苷类以及聚胺类合成的前体物,且通过其转运载体的调控参与动物肠道营养物质代谢^[5]。其中谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺是与肠黏膜生长和代谢相关的重要氨基酸^[6],对仔猪的生长发育尤为重要。谷氨酸转运中,通过非钠离子依赖的谷氨酸/谷氨酰胺转运载体(Xc⁻)系统进行谷氨酸-胱氨酸交换,通过中性氨基酸转运载体系统(ASC)将其前体物谷氨酰胺转运,产生谷氨酸^[7]。但早期断奶条件下,仔猪小肠谷氨酸/谷氨酰胺转运载体的表达发生怎样的变化,尚未见

收稿日期:2020-03-07

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(C2015040);黑龙江省科技计划省院科技合作项目(YS19B01);黑龙江省农垦总局科技攻关课题(HNKXIV-08-03-01)

作者简介:王秋菊(1979—),女,黑龙江海林人,副教授,博士,研究方向为动物肠道健康及营养调控。E-mail: wqj_9@163.com

*通信作者:崔一喆,副教授,硕士生导师, E-mail: cuiyizhe1979@126.com

报道。因此,本研究以饲料中不添加谷氨酸和谷氨酰胺的隔离早期断奶饲养的仔猪为研究对象,着重研究早期断奶对仔猪小肠谷氨酸/谷氨酰胺转运载体系统中的谷氨酸/胱氨酸交换载体(xCT)和中性氨基酸转运载体2(ASCT2)的影响,探讨早期断奶对仔猪小肠谷氨酸转运的影响,对了解仔猪小肠中谷氨酸转运及调控的深层机理具有重要意义,为断奶仔猪饲料中添加谷氨酸或谷氨酰胺寻求理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

仔猪小肠样品来自本实验室前期的动物饲养试验,试验分别从40头不同母猪的仔猪中各选出体重相近、10日龄的杜长大三元杂交仔猪1头,共40头仔猪,随机不配对分为2组,每组20头仔猪,对照组为哺乳仔猪,随母猪喂养;试验组为断奶仔猪,饲喂玉米-豆粕型商品饲料,进行单栏隔离饲养,试验期10 d。仔猪的饲料组成及营养水平,以及详细的饲养管理参考前期的研究^[8]。

1.2 样品采集

仔猪饲养结束,每组随机选取12头仔猪,异氟烷麻醉后屠宰,取空肠和回肠,用无菌冰生理盐水冲洗干净内容物,并在各肠段中间位置分别取1和5 cm肠段样品,1 cm肠段样品装于含4%甲醛的标本瓶中,室温保存,用于检测小肠组织形态;5 cm肠段样品装于15 mL离心管中,液氮冻存。并在液氮存在下用研钵进行组织研磨,小肠组织研磨粉装入冻存管中,于-80℃保存,用于测定谷氨酸/谷氨酰胺转运载体蛋白和mRNA表达量,

并检测小肠氧化应激水平。

1.3 指标检测

1.3.1 谷氨酸/谷氨酰胺转运载体蛋白和 mRNA 表达量检测

根据前期研究^[8]方法制备仔猪空肠和回肠的组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜样品,分别采用Western-blot和实时荧光定量-PCR(RT-PCR)方法检测xCT和ASCT2蛋白和mRNA表达量。

蛋白检测:首先使用牛血清蛋白(级分IV, Bio-Rad公司)作为蛋白标准,采用比色法,通过96孔板读板分光光度计(Fisher公司)测定组织匀浆、细胞内质和顶膜样品中蛋白质的含量;按蛋白质含量稀释样品,进行基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, Bio-Rad公司)和转膜抗体孵育(半干转膜仪, Bio-Rad公司),分别检测xCT、ASCT2和持家基因 β -肌动蛋白(β -actin)蛋白表达量。最后用Scion成像软件(Scion公司,弗雷德里克)对图像进行印迹光密度扫描测定。

各蛋白抗体及稀释浓度如下:xCT一抗为鼠抗人xCT多克隆抗体(Chemicon, Temecula公司),用6%脱脂牛奶溶解到1×三羟甲基氨基甲烷等渗缓冲盐溶液(TBS)中进行1:250稀释。ASCT2一抗为羊抗人ASCT2多克隆抗体(圣克鲁斯生物国际有限公司),1:2 000稀释; β -actin一抗为鼠抗人单克隆抗体(Bio-Rad公司),1:10 000稀释;二抗均用兔抗人免疫球蛋白G(IgG)抗体(Bio-Rad公司),1:10 000稀释。

基因检测:引物序列和产物大小见表1,由Invitrogen公司合成。

表1 引物序列和产物大小

Table 1 Primer sequences and product size

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5'—3')	产物大小 Product size/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.
谷氨酸/胱氨酸交换载体 xCT	F:CTCCATCATCATCGGCACCGTC R:TGCAGCAGCTCCTCCGCACTGA	747	NM_011990
中性氨基酸转运载体2 ASCT2	F:GAGCTGGATGAGGTTCCAAA R:GCCAGCAAGATTGTGGAGAT	478	NM_005628
β -肌动蛋白 β -actin	F:GGATGCAGAAGGAGATCACG R:ATCTGCTGGAAGGTGGACAG	150	AY550069

采用 25 μL 反应体系,体系组成参见 iQ SYBR Green Supermix RT-PCR 试剂盒 (Qiagen 公司)说明书,进行 RT-PCR 检测(实时定量 RT-PCR 仪, Bio-Rad 公司)。操作程序为:反转录程序 (50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min);蛋白质变性程序 (95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min);扩增和量化程序,重复 45 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s);熔解曲线程序 (60~99 $^{\circ}\text{C}$,以 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的速度加热,且进行荧光测量)。

目的基因与持家基因相对表达量比值的计算公式如下:

$$R = 2^{-Ct^{(\text{目的基因}-\text{持家基因})}}$$

式中: R 为目的基因的相对表达比值; Ct 表示阈值的循环数。

1.3.2 空肠和回肠黏膜形态学测定

将仔猪空肠和回肠样品经福尔马林液浸泡固定,经石蜡包埋,染色制成切片。制好的切片用 Leica DMR 型光学显微镜 5.0 \times 放大率测量每头仔猪空肠和回肠的绒毛高度、隐窝深度和平滑肌厚度。计算绒毛高度/隐窝深度和黏膜厚度(绒毛高度+隐窝深度)。

1.3.3 空肠和回肠组织氧化还原水平测定

空肠和回肠中总谷胱甘肽 (GSHt) 和氧化型谷

胱甘肽 (GSSG) 含量根据试剂盒 (Bio-Rad 公司)说明,采用比色法,通过 96 孔板读板分光光度计 (Fisher 公司) 进行测定。小肠还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量通过以下公式计算获得:

$$\text{GSH} = \text{GSHt} - 2 \times \text{GSSG}$$

小肠总抗氧化能力根据试剂盒 (TA02, Oxford 公司)说明,采用比色法,通过 96 孔板读板分光光度计进行测定。

1.4 统计分析

采用 SAS 13.0 软件中 one-way ANOVA 进行 t 检验分析。试验数据以平均值 \pm 标准误或混合平均标准误表示。 $P < 0.05$ 视为差异显著。

2 结果

2.1 早期断奶对仔猪小肠黏膜发育的影响

由表 2 和表 3 可知,与哺乳仔猪相比,断奶仔猪的空肠和回肠绒毛高度分别显著降低了 55% 和 47% ($P < 0.05$);同时隐窝深度分别显著增加了 146% 和 99% ($P < 0.05$);另外,断奶仔猪空肠和回肠的黏膜厚度,相对于哺乳仔猪,亦分别显著减少了 13% 和 14% ($P < 0.05$);而无论是空肠还是回肠,断奶仔猪平滑肌厚度与哺乳仔猪相比均无显著变化 ($P > 0.05$)。

表 2 仔猪空肠黏膜形态学变化

Table 2 Mucosal morphology change in jejunum of piglets ($n = 12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	P 值 P -value
绒毛高度 Villus height/ μm	501.93	226.82*	3.19	0.027
隐窝深度 Crypt depth/ μm	132.46	326.00*	3.73	0.018
绒毛高度/隐窝深度 V/C	3.79	0.70*	0.04	<0.001
黏膜厚度 Mucosa thickness/ μm	634.39	552.82*	6.20	0.042
平滑肌厚度 Smooth muscle thickness/ μm	191.21	184.72	2.28	0.098

* 表示与哺乳组相比差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

* mean significantly difference compared with suckling group ($P < 0.05$). The same as below.

表 3 仔猪回肠黏膜形态学变化

Table 3 Mucosal morphology change in ileum of piglets ($n = 12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	P 值 P -value
绒毛高度 Villus height/ μm	457.18	243.42*	7.87	0.011
隐窝深度 Crypt depth/ μm	133.49	265.41*	6.25	0.026
绒毛高度/隐窝深度 V/C	3.44	0.92*	0.09	0.013
黏膜厚度 Mucosa thickness/ μm	590.67	508.83*	10.64	0.038
平滑肌厚度 Smooth muscle thickness/ μm	188.95	196.21	2.97	0.059

2.2 早期断奶对仔猪小肠 xCT 蛋白及 mRNA 表达量的影响

2.2.1 早期断奶对仔猪小肠 xCT 蛋白表达量的影响

采用 Western blot 分析方法,成功地从仔猪小肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中检测到 xCT 蛋白,并分析其含量。结果在小肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中检测到的 xCT 蛋白分子质量均为 40 ku。仔猪小肠 xCT 蛋白表达量差异结果如图 1 和图 2 所示。与哺乳仔猪相比,断奶仔猪空肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 xCT 蛋白表达量分别显著提高了 11%、20% 和 20% ($P < 0.05$, 图 1);断奶仔猪回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 xCT 蛋白表达量分别显著提高了 11%、17% 和 22% ($P < 0.05$, 图 2)。

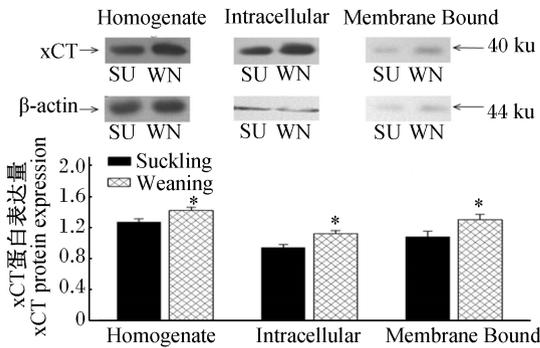


图 1 仔猪空肠中 xCT 蛋白表达量

Fig.1 xCT protein expression in jejunum of piglets

2.2.2 早期断奶对仔猪小肠 xCT mRNA 表达量的影响

由表 4 可知,断奶仔猪空肠中 xCT mRNA 表达量较哺乳仔猪显著提高了 99% ($P < 0.05$);断奶仔猪回肠中 xCT mRNA 表达量较哺乳仔猪显著提高了 82% ($P < 0.05$)。

断奶仔猪与哺乳仔猪小肠 xCT 蛋白表达量与 mRNA 表达量之间的皮尔森相关分析结果如表 5 所示。断奶仔猪与哺乳仔猪空肠和回肠组织匀

浆、细胞内质、细胞顶膜的 xCT 蛋白表达量与其对应肠段中 xCT mRNA 表达量之间均呈正向线性关系 ($P < 0.05$);空肠和回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 xCT 蛋白表达量之间也呈正向线性关系,且差异显著 ($P < 0.05$)。

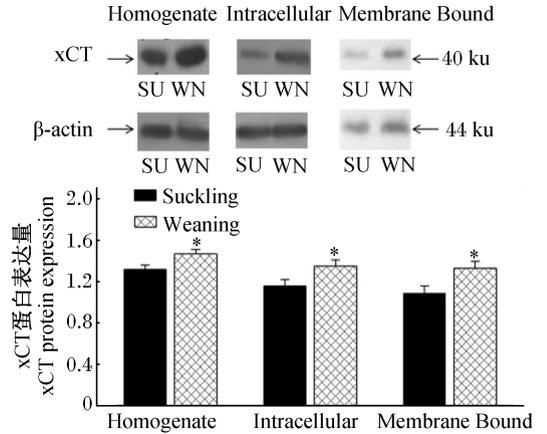


图 2 仔猪回肠中 xCT 蛋白表达量

Fig.2 xCT protein expression in ileum of piglets

2.3 早期断奶对仔猪小肠 ASCT2 蛋白及 mRNA 表达量的影响

2.3.1 早期断奶对仔猪小肠 ASCT2 蛋白表达量的影响

如图 3 所示,在空肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中分别检测到分子质量为 57 ku 的 ASCT2 蛋白,与哺乳仔猪相比较,ASCT2 蛋白在断奶仔猪空肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中的表达量分别显著提高了 25%、26% 和 35% ($P < 0.05$)。如图 4 所示,在回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中也检测到分子质量为 57 ku 的 ASCT2 蛋白,与哺乳仔猪相比较,在断奶仔猪回肠组织匀浆和细胞顶膜中 ASCT2 蛋白表达量分别显著提高了 50% 和 33% ($P < 0.05$),但在回肠细胞内质中 ASCT2 蛋白表达量没有显著变化 ($P > 0.05$)。

2.3.2 早期断奶对仔猪小肠 ASCT2 mRNA 表达量的影响

由表 6 可知,断奶仔猪空肠组织中 ASCT2 mRNA 表达量较哺乳仔猪显著增加了 454% ($P < 0.05$);回肠空肠组织中 ASCT2 mRNA 表达量较哺乳仔猪显著提高了 136% ($P < 0.05$)。

表 4 仔猪小肠 *xCT* mRNA 表达量Table 4 *xCT* mRNA expression in small intestine of piglets ($n=12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
空肠 Jejunum	0.001 7	0.003 4*	0.000 5	0.021
回肠 Ileum	0.003 8	0.006 8*	0.000 6	0.016

表 5 仔猪空肠和回肠 *xCT* 蛋白与 mRNA 表达量的相关性Table 5 Correlation of *xCT* protein and mRNA expression in jejunum and ileum of piglets ($n=24$)

项目 Items	空肠中 <i>xCT</i> mRNA 表达量 <i>xCT</i> mRNA expression in jejunum		回肠中 <i>xCT</i> mRNA 表达量 <i>xCT</i> mRNA expression in ileum	
	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	相关系数 <i>r</i>	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
组织匀浆中 <i>xCT</i> 蛋白表达量 <i>xCT</i> protein expression in homogenate	0.62*	0.005	0.27*	0.004
细胞内质中 <i>xCT</i> 蛋白表达量 <i>xCT</i> protein expression in intracellular	0.41*	0.007	0.60*	0.036
细胞顶膜中 <i>xCT</i> 蛋白表达量 <i>xCT</i> protein expression in membrane bound	0.40*	0.025	0.18*	0.031

* 表示显著相关。表 7 同。

* mean significant correlation. The same as Table 7.

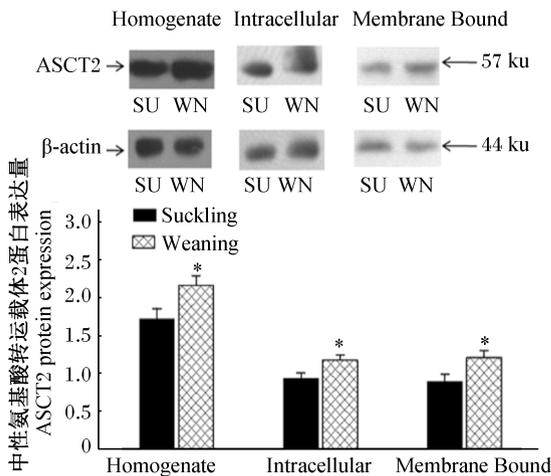


图 3 仔猪空肠 ASCT2 蛋白表达量

Fig.3 ASCT2 protein expression in jejunum of piglets

断奶仔猪与哺乳仔猪小肠 ASCT2 蛋白表达量与 mRNA 表达量之间的皮尔森相关分析结果如表 7 所示。断奶仔猪与哺乳仔猪空肠和回肠组织匀浆、细胞内质、细胞顶膜的 ASCT2 蛋白表达量

与其对应肠段中 ASCT2 mRNA 表达量之间均呈正向线性关系 ($P<0.05$)；空肠和回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 ASCT2 蛋白表达量之间也呈正向线性关系，且差异显著 ($P<0.05$)。

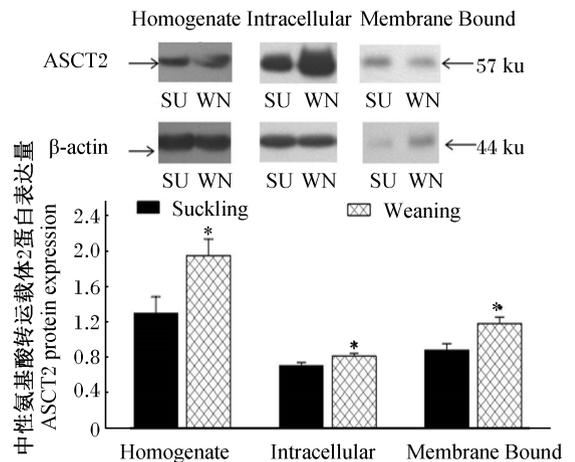


图 4 仔猪回肠 ASCT2 蛋白表达量

Fig.4 ASCT2 protein expression in ileum of piglets

表 6 仔猪小肠 ASCT2 mRNA 表达量

Table 6 ASCT2 mRNA expression in small intestine of piglets ($n=12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	P 值 P-value
空肠 Jejunum	0.001 3	0.007 2*	0.001 5	<0.001
回肠 Ileum	0.001 1	0.002 6*	0.000 2	0.036

表 7 仔猪空肠和回肠 ASCT2 蛋白与 mRNA 表达量的相关性

Table 7 Correlation of ASCT2 protein and mRNA expression in jejunum and ileum of piglets ($n=24$)

项目 Items	空肠中 ASCT2 mRNA 表达量 ASCT2 mRNA expression in jejunum		回肠中 ASCT2 mRNA 表达量 ASCT2 mRNA expression in ileum	
	相关系数 <i>r</i>	P 值 P-value	相关系数 <i>r</i>	P 值 P-value
组织匀浆中 ASCT2 蛋白表达量 ASCT2 protein expression in homogenate	0.41*	0.021	0.54*	0.026
细胞内质中 ASCT2 蛋白表达量 ASCT2 protein expression in intracellular	0.62*	0.018	0.54*	0.029
细胞顶膜中 ASCT2 蛋白表达量 ASCT2 protein expression in membrane bound	0.46*	0.012	0.53*	0.035

2.4 早期断奶对仔猪小肠抗氧化应激水平的影响

哺乳和断奶仔猪空肠中 GSHt、GSH、GSSG 含量和总抗氧化能力结果见表 8。与哺乳仔猪相比,断奶仔猪空肠 GSHt 含量差异不显著 ($P>0.05$);空肠 GSH 含量较哺乳仔猪显著降低了 34% ($P<$

0.05);空肠 GSSG 含量比哺乳仔猪显著提高了 83% ($P<0.05$)。与哺乳仔猪相比,断奶仔猪空肠 GSH/GSSG 显著降低了 66% ($P<0.05$)。断奶仔猪与哺乳仔猪相比,空肠中总抗氧化能力没有显著变化 ($P>0.05$)。

表 8 仔猪空肠中 GSHt、GSH 和 GSSG 含量

Table 8 Contents of GSHt, GSH and GSSG in jejunum of piglets ($n=12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	P 值 P-value
总谷胱甘肽 GSHt/(nmol/mg prot)	2.78	2.80	0.12	0.917
还原型谷胱甘肽 GSH/(nmol/mg prot)	2.02	1.34*	0.12	0.037
氧化型谷胱甘肽 GSSG/(nmol/mg prot)	0.38	0.73*	0.06	0.045
还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSG	53.16	18.36*	5.47	0.029
总抗氧化能力 TAC/(mmol/mg prot)	32.54	26.84	2.41	0.125

哺乳和断奶仔猪回肠中 GSHt、GSH、GSSG 含量和总抗氧化能力结果见表 9。与哺乳仔猪相比较,回肠中 GSHt 和 GSH 含量分别显著降低了 31% 和 35% ($P<0.05$);但回肠 GSSG 含量没有统计学差异 ($P>0.05$);回肠中总抗氧化能力显著下降了 27% ($P<0.05$)。

3 讨论

哺乳动物肠黏膜最重要的作用是在对饲料营养物质进行必要消化和吸收的同时,对肠内微生物和毒素具有屏障作用^[9]。尽管调节仔猪肠道黏膜屏障功能的分子机制还没有完全研究透彻,但是很明显,在饥饿和疾病的状态下,肠道屏障容易

受到损坏,导致发病率和死亡率的明显提高^[10]。Smith 等^[11]的研究显示,15~21 日龄断奶的仔猪,与 23~28 日龄断奶的仔猪相比,可以导致仔猪持

续的肠道屏障功能性紊乱。在本研究中,10 日龄早期断奶仔猪小肠绒毛更短,隐窝深度更深,说明早期断奶严重影响了仔猪肠内营养的吸收和利用。

表 9 仔猪回肠中 GSHt、GSH 和 GSSG 含量

Table 9 Contents of GSHt, GSH and GSSG in ileum of piglets ($n=12$)

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM	P 值 P-value
总谷胱甘肽 GSHt/(nmol/mg prot)	16.54	11.29 *	0.88	0.031
还原型谷胱甘肽 GSH/(nmol/mg prot)	13.32	8.63 *	1.17	0.460
氧化型谷胱甘肽 GSSG/(nmol/mg prot)	1.61	1.33	0.23	0.077
还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSG	8.27	6.49	1.04	0.126
总抗氧化能力 TAC/(mmol/mg prot)	53.82	39.54 *	3.38	0.014

Xc⁻系统是非钠依赖的谷氨酸/胱氨酸交换系统,它将谷氨酸和胱氨酸按 1:1 比率通过细胞膜进行交换,将胱氨酸摄取进细胞内,将细胞内多余的谷氨酸置换到细胞外^[12]。Xc⁻系统有重链亚基 4F2hc 和轻链亚基 xCT,其中 xCT 是 Xc⁻系统中的主要载体,它主要是转运细胞内的谷氨酸和细胞外的胱氨酸^[13]。Xc⁻系统转运在大脑、神经元及突触中研究较多^[14-16],而在肠道等非神经器官中研究较少。Burdo 等^[17]首次从猴子的十二指肠和肾脏中检测到 xCT 蛋白,且 xCT 载体位于细胞顶膜上以介导谷氨酸/胱氨酸的转运。Bridges 等^[18]研究发现,xCT 载体在大脑中通过转运谷氨酸/胱氨酸,维持细胞内谷氨酸/胱氨酸的水平,降低氧化应激以维持细胞的健康。McBean^[19]研究表明,Xc⁻介导的谷氨酸转运由氧化应激引起,氧化应激可刺激 xCT 的转运,提供更多的底物氨基酸来合成谷胱甘肽,抵抗机体内的氧化水平。本研究发现了仔猪小肠中 xCT 亚基,且断奶时仔猪小肠 xCT 蛋白表达量显著提高,说明 xCT 为了降低仔猪小肠的氧化应激水平而提高了表达量,以此增加对小肠中谷氨酸/胱氨酸的转运,与以上其他组织中研究结果一致。

ASCT2 是钠离子依赖的转运载体,在谷氨酸和谷氨酰胺的循环中起重要作用。Epler 等^[20]研究发现,降低上皮细胞外环境的 pH 可以促进细胞对谷氨酰胺的吸收,将谷氨酰胺吸收入血液,同时伴有 ASCT2 mRNA 的表达量升高。本试验结果显示,早期断奶提高了 ASCT2 在小肠组织各部分的蛋白和 mRNA 表达量。断奶仔猪小肠组织中,影

响谷氨酰胺转运的因素有很多种。ASCT2 除转运谷氨酰胺以外,还可以转运天冬酰胺、L-半胱氨酸等^[21];其中半胱氨酸对谷氨酰胺的转运有竞争抑制作用。本试验断奶仔猪饲料配方中,半胱氨酸水平恰好符合断奶仔猪(5~10 kg,0.41%)的营养需求,未添加额外的半胱氨酸,半胱氨酸与谷氨酰胺是否竞争 ASCT2,尚不明确,仍需进一步研究。

在猪等哺乳动物的乳汁中,含有较高含量的 GSH、甘氨酸和谷氨酰胺^[22]。大多数哺乳动物中,谷氨酸是肠-肾轴合成内源性 GSH 的主要底物,这个合成途径弥补了由于断奶造成的 GSH 严重缺乏的影响。目前认为 GSH 是体内主要的抗氧化剂^[23],阻止活性氧自由基对机体的损伤。氧化应激水平提高时,GSH 就会向氧化型谷胱甘肽(GSSG)转变,导致 GSSG 堆积和许多病理疾病的出现^[24]。一般以 GSH+2GSSG 的含量表示细胞内 GSH 总量^[25],以 GSH/GSSG 表示细胞氧化还原状态^[26]。本试验结果显示,早期断奶使仔猪空肠组织中 GSH 含量下降,GSSG 含量显著提高;但回肠组织中 GSSG 含量没有显著升高。这说明早期断奶仔猪空肠处于严重的氧化应激状态,而回肠的氧化应激水平降低,可能与肠道位置及机体自身抗氧化应激调节有关,如 GSH 在防止细胞免受各种过氧化损伤方面具有重要作用,如果谷胱甘肽合成的转运载体含量增多,则合成的谷氨酸/谷氨酰胺增多,则机抗氧化能力提高,氧化水平就会降低。

同时合成 GSH、蛋白-S-S-半胱氨酸(PSSC)中,其底物氨基酸的吸收对于 GSH 与 PSSC 合成,

维持氧化还原状态是十分重要的。本试验中断奶仔猪小肠中胱氨酸/谷氨酸交换器 xCT 和 ASCT2 蛋白表达量均显著升高,通过在肠细胞中摄取合成 GSH 所需的氨基酸,在肠细胞中积累胱氨酸/半胱氨酸,作为抗氧化剂或半胱氨酸用作 PSSC 形成的来源,起到缓冲氧化应激的作用。

4 结 论

总的来说,早期断奶使仔猪小肠处于氧化应激状态,试验证实了断奶应激可增强仔猪小肠组织中 xCT 和 ASCT2 蛋白及其 mRNA 表达量,以促进谷氨酸/谷氨酰胺的摄取尤其是半胱氨酸的吸收,降低仔猪小肠的氧化应激水平。

参考文献:

- [1] KO K B, KIM G D, KANG D G, et al. The influences of weaning age and weight on carcass traits and meat quality of pigs [J]. *Animal Science Journal*, 2015, 86 (4): 428-434.
- [2] VERDON M, MORRISON R S, RAULT J L. The welfare and productivity of sows and piglets in group lactation from 7, 10, or 14 d postpartum [J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(3) : skaa037.
- [3] GÓRSKA-WARSEWICZ H, LASKOWSKI W, KULYKOVETS O, et al. Food products as sources of protein and amino acids-the case of poland [J]. *Nutrients*, 2018, 10(12) : 1977
- [4] KAMEI Y, HATAZAWA Y, UCHITOMI R, et al. Regulation of skeletal muscle function by amino acids [J]. *Nutrients*, 2020, 12(1) : 261.
- [5] HU L, KRISTENSEN N B, CHE L Q, et al. Net absorption and liver metabolism of amino acids and heat production of portal-drained viscera and liver in multiparous sows during transition and lactation [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2020, 11 : 5.
- [6] JOHNSON J S, LAY D C, Jr. Evaluating the behavior, growth performance, immune parameters, and intestinal morphology of weaned piglets after simulated transport and heat stress when antibiotics are eliminated from the diet or replaced with *L*-glutamine [J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(1) : 91-102.
- [7] CORMERAIS Y, MASSARD P A, VUCETIC M, et al. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(8) : 2877-2887.
- [8] WANG Q J, CUI Y Z, ZHANG X YI, et al. Effect of early weaning on the expression of excitatory amino acid transporter 1 in the jejunum and ileum of piglets [J]. *Molecular medicine reports*, 2017, 16: 6518-6525.
- [9] YAP Y A, MARIÑO E. An insight into the intestinal web of mucosal immunity, microbiota, and diet in inflammation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2617.
- [10] DAVIS J. Hunger, ghrelin and the gut [J]. *Brain research*, 2018, 1693 : 154-158.
- [11] SMITH F, CLARK J E, OVERMAN B L, et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 298(3) : G352-G363.
- [12] LANGFORD M P, REDMOND P, CHANIS R, et al. Glutamate, excitatory amino acid transporters, X^{C-} antiporter, glutamine synthetase, and γ -glutamyltranspeptidase in human corneal epithelium [J]. *Current Eye Research*, 2010, 35(3) : 202-211.
- [13] LO M, LING V, WANG Y Z, et al. The X^{C-} cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance [J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 99(3) : 464-472.
- [14] DANBOLT N C, FURNESS D N, ZHOU Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: resolving the conundrum [J]. *Neurochemistry International*, 2016, 98: 29-45.
- [15] BAK L K, SCHOUSBOE A, WAAGEPETERSEN H S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 98(3) : 641-653.
- [16] FONTANA A C K. Protocols for measuring glutamate uptake: dose-response and kinetic assays in *in vitro* and *ex vivo* systems [J]. *Current Protocols in Pharmacology*, 2018, 82(1) : e45.
- [17] BURDO J, DARGUSCH R, SCHUBERT D. Distribution of the cystine/glutamate antiporter system X-C in the brain, kidney, and duodenum [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, 54(5) : 549-557.
- [18] BRIDGES C C, HU H K, MIYAUCHI S, et al. Induction of cystine-glutamate transporter X^{C-} by human immunodeficiency virus type 1 transactivator protein tat in retinal pigment epithelium [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2004, 45(9) : 2906-2914.
- [19] MCBEAN G J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23(7) : 299-302.
- [20] EPLER M J, SOUBA W W, MENG Q H, et al. Metabolic acidosis stimulates intestinal glutamine absorption [J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 2003, 7(8) : 1045-1052.
- [21] OPPEDISANO F, POCHINI L, GALLUCCIO M, et

- al. The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes; transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : Biomembranes*, 2007, 1768(2) : 291–298.
- [22] WANG W W, DAI Z L, WU Z L, et al. Glycine is a nutritionally essential amino acid for maximal growth of milk-fed young pigs [J]. *Amino Acids*, 2014, 46(8) : 2037–2045.
- [23] AOYAMA K, WATABE M, NAKAKI T. Regulation of neuronal glutathione synthesis [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008, 108(3) : 227–238.
- [24] WU G Y, FANG Y Z, YANG S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(3) : 489–492.
- [25] LAPENNA D, CIOFANI G, GIAMBERARDINO M A. Glutathione metabolic status in the aged rabbit aorta [J]. *Experimental Gerontology*, 2017, 91 : 34–38.
- [26] OMIDI M, GHAFARIAN-BAHRAMAN A, MOHAMMADI-BARDBORI A. GSH/GSSG redox couple plays central role in aryl hydrocarbon receptor-dependent modulation of cytochrome P450 1A1 [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 5 : e22164.

Effects of Early Weaning on Expression of Glutamate/Glutamine Transporters in Small Intestine of Piglets

WANG Qiuju¹ CUI Yizhe^{1*} WANG Mengzhu¹ JIA Junfeng¹ HU Haiyan²
WU Zhimin² GENG Zhongcheng¹

(1. College of Animal Science and Veterinary, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2. Animal Husbandry Bureau of Duerbert Mongolia Autonomous County, Daqing 166299, China)

Abstract: The purpose of this study was to study the effects of early weaning on the expression of glutamate/glutamine transporters in small intestine of piglets. A total of 40 piglets with similar body weight and 10 days of age were selected from 40 piglets of different sows. They were randomly divided into 2 groups with 20 piglets in each group. Control group piglets were suckling piglets, feeding with sows. The experimental group piglets were weaning piglets, isolated and weaned. The trial lasted for 10 days. At the end of feeding, 12 piglets were randomly selected from each group, jejunum and ileum were collected, and the gene and protein expression of glutamate/glutamine transporter were determined. The results showed as follows: compared with suckling piglets, early weaning significantly increased the expression of glutamate/cystine exchange transporter (xCT) and neutral amino acid transporter 2 (ASCT2) proteins and mRNA in the jejunum and ileum of the piglets ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis results showed that the expression levels of xCT and ASCT2 proteins in issues homogenate, cell endoplasm, apical membrane of weaning piglets and suckling piglets showed a positive linear relationship with the expression levels of corresponding mRNA in jejunum and ileum ($P < 0.05$). The height of villi in the jejunum and ileum of weaning piglets decreased, and the crypt depth increased, with significant differences ($P < 0.05$). The total antioxidant capacity in jejunum and ileum of weaning piglets significantly reduced ($P < 0.05$), and the content of oxidized glutathione (GSSG) in jejunum significantly increased ($P < 0.05$), and the content of glutathione (GSH) significantly decreased in ileum ($P < 0.05$). Early weaning places the small intestine of piglets in a state of oxidative stress, significantly increases the expression levels of xCT and ASCT2 proteins and their mRNA in the small intestinal tissues of weaning piglets, so as to promote the uptake of glutamate/glutamine and reduce the level of oxidative stress in the small intestine of piglets. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(7) : 3324–3332]

Key words: piglets; small intestine; glutamate transporter; glutamine transporter; antioxidant capacity