

# 玉米赤霉烯酮对青年母猪子宫发育、生长激素分泌及其受体分布与表达的影响

吴峰洋<sup>1</sup> 崔嘉<sup>1</sup> 杨新宇<sup>1</sup> 陈宝江<sup>1,2\*</sup>

(1.河北农业大学动物科技学院,保定 071000;2.河北省牛羊胚胎技术创新中心,保定 071000)

**摘要:** 本试验旨在研究玉米赤霉烯酮(ZEA)对青年母猪子宫发育、生长激素(GH)分泌及其受体(GHR)分布与表达的影响。选择胎次和体重 $[(23.20\pm 0.68)\text{ kg}]$ 相近的长×大二元青年母猪48头,将其随机分为4组,每组12个重复,每个重复1头。对照组(CON组)饲喂基础饲料,试验组(T1、T2、T3组)饲喂在基础饲料中分别添加200、800、1 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ZEA的试验饲料。预试期7 d,正试期40 d。结果表明:1)各组间血清及子宫组织中GH含量均无显著差异( $P>0.05$ )。2)各组间子宫组织中ZEA含量均无显著差异( $P>0.05$ )。3)各组间始重、末重、平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)及料重比(F/G)均无显著差异( $P>0.05$ );但与CON组相比,T2组子宫指数显著升高( $P<0.05$ ),T3组极显著升高( $P<0.01$ )。4)与CON组相比,试验组子宫肌层和内膜增厚,子宫腺数量增多,毛细血管增多,T2和T3组还出现炎症反应及上皮细胞坏死。5)与CON组相比,T2组GHR和Janus蛋白酪氨酸激酶2(JAK2)mRNA相对表达量及T3组GHR mRNA相对表达量显著上调( $P<0.05$ ),信号转导与转录激活因子3(STAT3)mRNA相对表达量各组间无显著差异( $P>0.05$ )。6)ZEA对GHR在青年母猪子宫中的分布与定位无明显影响,但与CON组相比,试验组GHR免疫阳性物质分布增多,免疫阳性强度增大。7)各组间子宫GHR蛋白表达量没有显著差异( $P>0.05$ );但与CON组相比,T2组灰度值有升高的趋势( $P=0.09$ )。综上所述,ZEA对青年母猪的生长性能以及血液和子宫中GH和ZEA的含量均无显著影响,但可通过升高GHR、JAK2和STAT3的mRNA相对表达量、增强GHR免疫阳性及升高蛋白表达量来增强GH的生物效应,使子宫发育异常,导致子宫指数出现极显著升高,子宫肌层和内膜增厚,子宫腺和毛细血管数量增多。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮;青年母猪;子宫;生长发育;生长激素;生长激素受体

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)01-0217-10

玉米赤霉烯酮(ZEA)是主要由镰刀菌菌株产生的,具有类雌激素活性和多种毒性作用的代谢产物,是猪饲料中最常见的霉菌毒素之一。中国气候复杂多样,领土辽阔广大,谷物在田间生长、收获加工以及运输和贮存过程中都容易受到ZEA的污染<sup>[1]</sup>。王国强<sup>[2]</sup>对从全国12个省市收集的饲料样品进行检测,发现ZEA阳性检出率为

92.59%,ZEA在阳性样品中的中值为172.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均值为332.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,最高值为3 123.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,高于《饲料卫生标准》(GB 13078—2017)的部分限量要求。子宫是重要的繁殖器官,子宫的生长发育及功能状态直接影响母猪繁殖潜力的发挥<sup>[3]</sup>。生长激素受体(GHR)是一种单链跨膜糖蛋白,可通过与生长激素特异性结

收稿日期:2020-07-20

基金项目:饲料霉菌毒素消减技术研究及产品开发(20326613D);河北农业大学科研发展基金(3003003);中国-欧盟饲料霉菌毒素生物脱毒关键技术合作研究(S2016G4513)

作者简介:吴峰洋(1989—),男,河北石家庄人,博士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: fengyangwu2015@163.com

\*通信作者:陈宝江,教授,博士生导师,E-mail: chenbaojiang@vip.sina.com

合,以自分泌或旁分泌的方式发挥生长调节作用<sup>[4]</sup>。已有研究表明,ZEA可以促进母猪子宫的发育,但是通过GHR调节子宫发育的报道较少。因此,本试验以对ZEA较敏感的青年母猪为对象,研究ZEA对子宫发育、生长激素(GH)分泌及GHR分布与表达的影响,为探讨ZEA繁殖毒性机理提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

ZEA购自Triplebond公司(加拿大),纯度保证值 $\geq 98\%$ 。

### 1.2 试验设计及饲料

选择胎次和体重 $[(23.20 \pm 0.68) \text{ kg}]$ 相近的长 $\times$ 大二元青年母猪48头,随机分为4组,每组12个重复,每个重复1头。对照组(CON组)饲喂基础饲料,试验组(T1、T2、T3组)分别饲喂在基础饲料中添加200、300、1 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ZEA的试验饲料。预试期7 d,正试期40 d。试验前对猪舍进行清洁和消毒,母猪采用分栏饲养,自由采食和饮水,常规饲养管理。

青年母猪饲喂玉米-豆粕型饲料,不添加抗生素及脱霉剂。基础饲料参照《猪饲养标准》(NY/T 65—2004)进行配制,其组成及营养水平见表1。

饲料于试验开始前配制完成,经酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测,各组饲料中呕吐毒素(DON)、伏马毒素(FB)和黄曲霉毒素 $B_1$ (AFB $_1$ )含量均符合《饲料卫生标准》(GB 13078—2017)的限量要求,ZEA的含量分别为52.37、241.60、825.20和1 634.46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。ZEA、DON和AFB $_1$ 试剂盒购自深圳芬德生物技术有限公司,FB试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

### 1.3 测定指标与方法

#### 1.3.1 血清及组织指标

于正试期结束后,试验母猪空腹12 h,然后每组随机选择8头进行前腔静脉采血,每头采集15 mL,将血液注入离心管内倾斜静置,待血凝后3 000 r/min离心10 min,分离血清。每组随机选取4头试验母猪进行屠宰,取子宫组织样品,血清及部分组织于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷冻保存待测。采用ELISA法测定血清及子宫组织中GH及ZEA含量,试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,按说明书指示进行操作。

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	65.00
豆粕 Soybean meal	19.00
小麦麸 Wheat bran	12.00
预混料 Premix <sup>1)</sup>	4.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
消化能 DE/(MJ/kg)	14.06
粗蛋白质 CP	20.34
粗纤维 CF	2.18
钙 Ca	0.88
总磷 TP	0.64
有效磷 AP	0.46
赖氨酸 Lys	1.22
蛋氨酸 Met	0.41
苏氨酸 Thr	0.81

1) 每千克预混料含有 One kilogram of premix contained the following: VA 360 000 IU, VD $_3$  60 000 IU, VE 375 mg, VK $_3$  120 mg, VB $_1$  50 mg, VB $_2$  180 mg, VB $_6$  90 mg, VB $_{12}$  0.63 mg, 烟酸 nicotinic acid 1 000 mg, 泛酸 pantothenic acid 630 mg, 生物素 biotin 12 mg, 胆碱 choline 15 g, 叶酸 folic acid 100 mg, Fe 3 g, Cu 0.375 g, Mn 1.047 g, Zn 3.08 g, I 8 mg, Se 10 mg, Cr 6 mg, Ca 155 g, P 35 g, NaCl 75 g, 赖氨酸 Lys 19 g。

2) 消化能为计算值,其余为实测值。DE was a calculated value, while the others were measured values.

#### 1.3.2 生长性能及子宫指数

试验开始时称量各组母猪的体重获得初始体重,试验结束时再次称量获得终末体重,并根据试验天数计算获得平均日增重(ADG)。统计试验期间的各组母猪的采食量,计算获得平均日采食量(ADFI)和料重比(F/G)。宰前称量青年母猪宰前活重,宰后称量子宫组织重计算器官指数。

子宫指数(g/kg) = 子宫鲜重(g) / 宰前活重(kg)。

#### 1.3.3 子宫组织形态观察

取子宫新鲜组织于10%中性甲醛固定液中固定,经脱水,透明,浸蜡,包埋,切片处理后用苏木素-伊红染液染色,经脱水,透明,中性树胶封固后使用显微摄像系统进行切片观察和图像采集。

#### 1.3.4 子宫组织基因相对表达量

根据GenBank中已报道的猪的甘油醛-3-磷

酸脱氢酶(*GAPDH*)、生长激素受体(*GHR*)、Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(*JAK2*)和信号转导与转录激活因子 3(*STAT3*)基因序列,和前人文献中已发表的

引物序列,使用 Primer 6.0 软件设计相应特异性引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应引物序列

Table 2 Sequence of primers for real-time qPCR

基因名称 Gene names	引物序列 Primer sequence (5'—3')	产物大小 Product size/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.	参考文献 References
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	F: ATGGTGAAGGTCGGAGTGAA R: CGTGGGTGGAATCATACTGG	154	NM_001206359.1	牛群升等 <sup>[5]</sup>
生长激素受体 <i>GHR</i>	F: CCTCAACTGGACTCTACTG R: ACACGCACTTCATACTCTT	228	DQ_106869.1	戴美玲 <sup>[6]</sup>
Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 <i>JAK2</i>	F: AGACAACACTGGGGAGGTGGT R: TCATGCTGCAAGGATTTAAGGA	108	AB_006011.1	张鸣等 <sup>[7]</sup>
信号转导与转录激活因子 3 <i>STAT3</i>	F: GAAAGCAGCAAAGAAGGAGGAG R: GACCAGCGGAGACACAAGGAT	198	NM_001044580.1	张鸣等 <sup>[7]</sup>

将子宫样品取出 50~100 mg,提取总 RNA,具体操作按 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明进行,用 RNA 浓度仪(ThermoNanoDrop Lite)检测 RNA 浓度。用反转录试剂盒(Vazyme 公司, R323-01, 20  $\mu$ L 反应体系)进行反转录,具体操作说明书指示进行。按荧光定量试剂盒(Vazyme 公司, Q111-02, 20  $\mu$ L 反应体系)具体操作按说明书指示进行。扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环反应 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环;熔解曲线 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。每个样品作 3 个重复,目标基因表达情况:mRNA 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

### 1.3.5 免疫组织化学法检测

取子宫新鲜组织迅速于 4% 多聚甲醛固定液中固定,经脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片后,使用显微摄像系统进行切片观察和图像采集。

### 1.3.6 蛋白质印迹法检测

取子宫组织提取总蛋白,经样品蛋白质浓度测定(BCA 法)、样品测定、蛋白质变性、上样、电泳、转膜、封闭、孵育抗体、显影、定影后统计结果。

### 1.4 数据统计分析

使用 Excel 2016 和 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,用 one-way ANOVA 检验各组数据间显著性差异,用 Duncan 氏法进行多重比较,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著,  $0.05 < P < 0.10$  表示有变化趋势。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZEA 对青年母猪血清和子宫组织 GH 含量的影响

由表 3 可知,各组间血清及子宫组织中 GH 含量均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 ZEA 对青年母猪血清和子宫组织 GH 含量的影响

Table 3 Effects of ZEA on growth hormone content in serum and uterine tissue of prepubertal gilts

项目 Items	CON 组 Control group	T1 组 Test 1 group	T2 组 Test 2 group	T3 组 Test 3 group
血清 Serum/( $\mu$ g/L)	10.83 $\pm$ 1.29	11.58 $\pm$ 1.54	9.98 $\pm$ 2.32	10.64 $\pm$ 1.77
子宫组织 Uterine tissue/( $\mu$ g/kg prot)	2.13 $\pm$ 0.24	2.08 $\pm$ 0.11	2.51 $\pm$ 0.53	2.67 $\pm$ 0.26

同行数据肩标不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below.

**2.2 ZEA 对青年母猪子宫组织中 ZEA 含量的影响**  
由表 4 可知,各组间子宫组织中 ZEA 含量均

无显著差异 ( $P>0.05$ ),与 CON 组相比,T2 和 T3 组均升高,分别升高了 7.96% 和 10.40%。

表 4 ZEA 对青年母猪子宫组织中 ZEA 含量的影响

Table 4 Effects of ZEA on ZEA content in uterine tissue of prepubertal gilts  $\mu\text{g}/\text{kg prot}$

项目 Item	CON 组 Control group	T1 组 Test 1 group	T2 组 Test 2 group	T3 组 Test 3 group
玉米赤霉烯酮 ZEA	3.27±0.77	3.18±0.53	3.53±1.01	3.61±0.90

**2.3 ZEA 对青年母猪生长性能及子宫指数的影响**

由表 5 可知,各组间初始体重、终末体重、ADG、ADFI 及 F/G 均无显著差异 ( $P>0.05$ )。与

CON 组相比,T2 组青年母猪的子宫指数显著升高 ( $P<0.05$ ),T3 组极显著升高 ( $P<0.01$ ),分别升高了 152% 和 186%。

表 5 ZEA 对青年母猪生长性能及子宫指数的影响

Table 5 Effects of ZEA on growth performance and uterus index of prepubertal gilts

项目 Items	CON 组 Control group	T1 组 Test 1 group	T2 组 Test 2 group	T3 组 Test 3 group
初始体重 Initial weight/kg	22.74±2.13	23.37±2.12	24.05±3.16	22.59±2.02
终末体重 Final weight/kg	41.02±1.13	39.60±1.51	40.45±1.35	39.81±1.42
平均日增重 ADG/(g/d)	456.46±25.02	389.17±39.22	408.75±36.53	427.92±43.02
平均日采食量 ADFI/(g/d)	1 396.73±108.55	1 369.63±79.87	1 417.41±86.43	1 438.64±58.35
料重比 F/G	3.06±0.10	3.52±0.16	3.49±0.41	3.38±0.42
子宫指数 Uterus index/(g/kg)	0.50±0.31 <sup>Aa</sup>	0.83±0.36 <sup>ABab</sup>	1.26±0.12 <sup>ABbc</sup>	1.43±0.50 <sup>Bc</sup>

**2.4 ZEA 对青年母猪子宫结构形态的影响**

由图 1 可知,CON 组子宫内膜、肌层和外膜结构较为清晰;子宫内膜上皮细胞矮柱状,排列较规则,未见明显变性坏死或增生;子宫内膜固有层基质细胞排列较紧密,多量子宫腺分布,子宫腺结构正常,未见明显扩张,毛细血管较丰富。与 CON 组相比,T1 组子宫肌层和内膜增厚,固有层近上皮区域细胞排列较稀疏,少量淋巴细胞散在浸润。T2 和 T3 组子宫肌层和内膜增厚,子宫腺数量增多,毛细血管增多,局部固有层内有细胞灶性浸润,以淋巴细胞为主,部分上皮细胞变性坏死,见坏死细胞胞质空泡化,胞核固缩。上述结果表明,ZEA 可以使子宫肌层和内膜增厚,腺体数量增多,毛细血管增多,使子宫发育异常。ZEA 还可以使子宫产生炎症反应(淋巴细胞浸润)及上皮细胞变性坏死,且随 ZEA 剂量增大,损伤作用增强。

**2.5 ZEA 对青年母猪子宫组织 GHR、JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量的影响**

由图 2 可知,与 CON 组相比,T2 和 T3 组子

宫 GHR mRNA 相对表达量以及 T2 组 JAK2 mRNA 相对表达量均显著升高 ( $P<0.05$ ),STAT3 mRNA 相对表达量各组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。

**2.6 ZEA 对青年母猪子宫组织 GHR 免疫阳性分布的影响**

由表 6 可知,各组间母猪子宫组织 GHR 的平均光密度值没有显著差异 ( $P>0.05$ ),但 T2 和 T3 组均高于 CON 组,其中 T3 组有升高的趋势 ( $P=0.08$ )。

图 3 可知,GHR 的免疫阳性物质主要分布于子宫的血管、基质细胞、子宫腺、固有层和肌层细胞的细胞质及细胞间质中,阳性细胞呈黄色或棕黄色。ZEA 对 GHR 在青年母猪子宫中的分布与定位无明显的影响,但各试验组中随着子宫肌层和内膜增厚,子宫腺数量增多,毛细血管增多,免疫阳性物质分布进一步增多,免疫阳性强度进一步增大。由此可见,ZEA 可以使青年母猪子宫内 GHR 免疫阳性物质分布增多,免疫阳性强度增大,来促进子宫的发育。



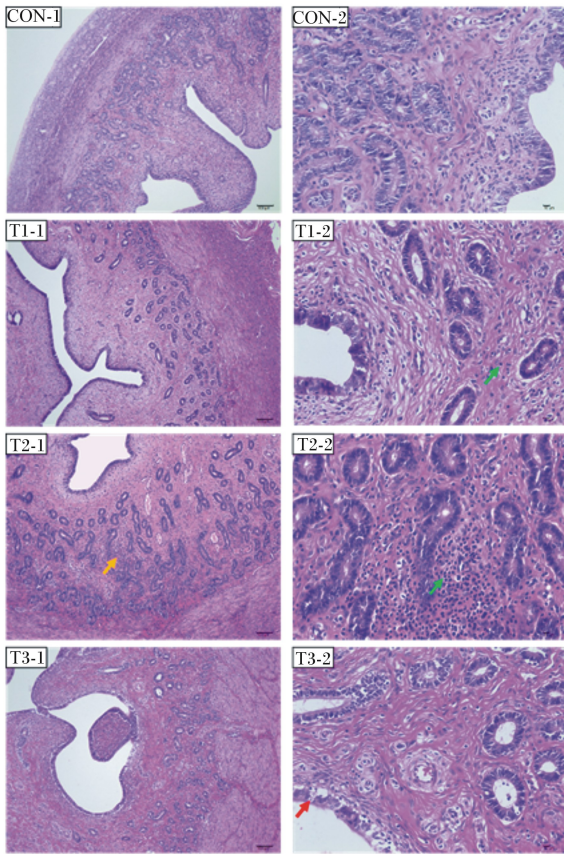


图 CON-1、T1-1、T2-1、T3-1 与图 CON-2、T1-2、T2-2、T3-2 分别为 CON 组与各试验组在 100 与 400 倍下获得的子宫组织视野。图中绿色箭头指示淋巴细胞,黄色箭头指示炎细胞灶性浸润,红色箭头指示上皮细胞坏死。100 和 400 倍下的比例尺分别为:100 和 10  $\mu\text{m}$ 。

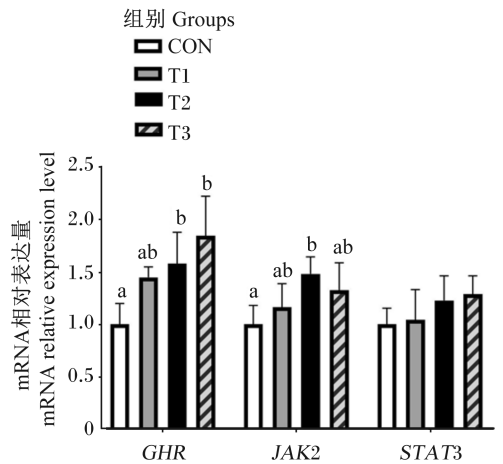
Figures CON-1, T1-1, T2-1, T3-1 and figures CON-2, T1-2, T2-2, T3-2 represent the visual field of uterine tissue obtained by the control group and each experimental group at 100 and 400 magnification, respectively. The green arrows indicate lymphocytes, the yellow arrows indicate focal inflammatory cell infiltration, and the red arrows indicate epithelial cell necrosis. The plotting scales are 100 and 10  $\mu\text{m}$ , respectively.

图 1 ZEA 对青年母猪子宫组织形态学的影响

Fig.1 Effects of ZEA on uterine histomorphology of prepubertal gilts

## 2.7 ZEA 对青年母猪子宫 GHR 蛋白表达量的影响

由图 4 和图 5 可知,各组间青年母猪子宫组织的 GHR 蛋白表达量没有显著差异 ( $P>0.05$ ),但各试验组灰度值均高于 CON 组,其中 T2 组有升高的趋势 ( $P=0.09$ )。



*GHR*: 生长激素受体 growth hormone receptor; *JAK2*: Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 Janus activated kinase 2; *STAT3*: 信号转导与转录激活因子 3 signal transducer and activator of transcriptions 3。

数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。Value columns with different small letters mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ( $P<0.01$ )。

图 2 ZEA 对青年母猪子宫 *GHR*、*JAK2*、*STAT3* mRNA 相对表达量的影响

Fig.2 Effects of ZEA on relative expression levels of *GHR*, *JAK2* and *STAT3* mRNA in uterus of prepubertal gilts

## 3 讨论

### 3.1 ZEA 对青年母猪血清和子宫 GH 及 ZEA 含量的影响

GH 是由垂体分泌的肽类激素,具有促进蛋白质合成、影响脂肪和矿物质代谢等生物功能,对子宫的生长发育具有重要的调节作用<sup>[8]</sup>。研究表明,ZEA 及其代谢产物可以影响垂体的功能状态,继而改变 GH 的分泌来影响骨骼和器官的发育。Thomas 等<sup>[9]</sup>报道,玉米赤霉醇可以通过影响羊垂体转录因子 Pit-1、生长激素释放激素受体以及 GH mRNA 的表达来促进 GH 的分泌。但本试验中,各组青年母猪血清和子宫组织中 GH 含量均无显著差异,说明 ZEA 处理对青年母猪的 GH 分泌没有显著影响,结果差异可能和试验动物及试验材料的差异有关。Olivares 等<sup>[10]</sup>也发现玉米赤霉醇对羔羊血清的 GH 含量没有显著影响。

表 6 ZEA 对青年母猪子宫 GHR 平均光密度的影响

Table 6 Effects of ZEA on mean optical density of GHR in uterus of prepubertal gilts

项目 Item	CON 组 Control group	T1 组 Test 1 group	T2 组 Test 2 group	T3 组 Test 3 group
平均光密度 Mean optical density	0.226±0.003	0.226±0.006	0.232±0.008	0.235±0.004

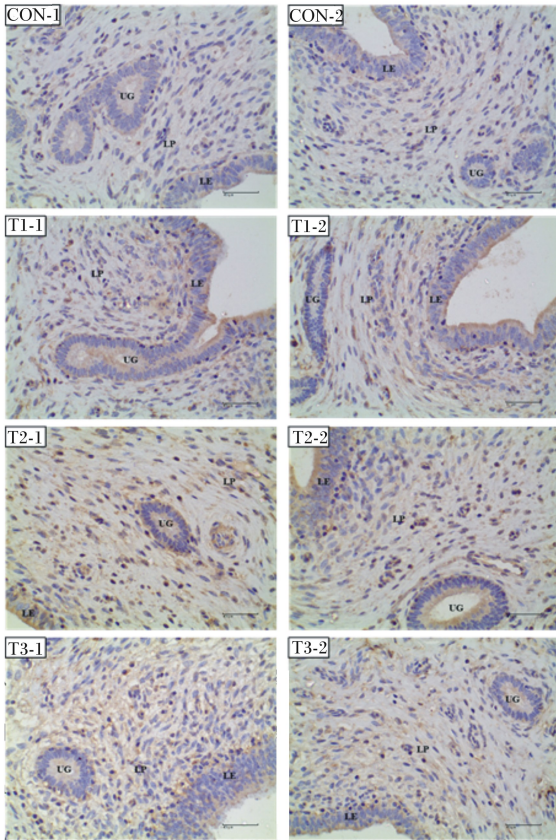


图 CON-1、T1-1、T2-1、T3-1 与图 CON-2、T1-2、T2-2、T3-2 分别为对照组与各试验组在 400 倍下获得的子宫组织的 2 个视野。图中 ML 表示肌层,UG 表示子宫腺,LP 表示固有层,LE 表示腔上皮。图中比例尺均为 40  $\mu\text{m}$ 。

Figures CON-1, T1-1, T2-1, T3-1 and figures CON-2, T1-2, T2-2, T3-2 represent 2 visual fields of uterine tissue obtained at 400 magnification in the control group and each experimental group, respectively. In the figure, ML represents the muscularis, UG represents the uterine glands, LP represents the lamina propria, and LE represents the lumen epithelium. The plotting scales in the figure are 40  $\mu\text{m}$ .

图 3 ZEA 对青年母猪子宫 GHR 免疫阳性分布的影响

Fig.3 Effects of ZEA on immunopositive distribution of GHR in uterus of prepubertal gilts

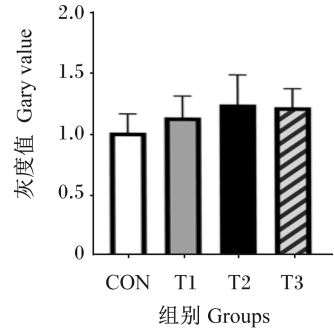


图 4 ZEA 对青年母猪子宫 GHR 蛋白表达量的影响

Fig.4 Effects of ZEA on GHR protein expression level in uterus of prepubertal gilts

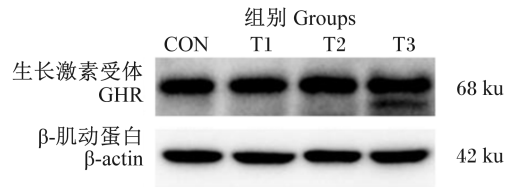


图 5 ZEA 对青年母猪子宫 GHR 蛋白灰度值的影响

Fig.5 Effects of ZEA on GHR protein gray value in uterus of prepubertal gilts

ZEA 具有类雌激素活性和多种毒性作用,母猪摄入 ZEA 后经胃肠吸收后,可在子宫、肝脏、肾脏等组织中沉积<sup>[11]</sup>,发挥毒性作用,ZEA 导致的子宫疾病及机能障碍与之有关。本试验中,各组青年母猪子宫组织中 ZEA 含量未出现显著差异,可能和试验时间相对较短有关。Gajecka 等<sup>[11]</sup>饲喂母猪被 ZEA 污染的饲料持续 1 年,发现子宫组织中 ZEA 的含量显著升高。本试验中,T2 和 T3 组青年母猪子宫 ZEA 含量较 CON 组均提高 7% 以上,可见 ZEA 沉积量与饲料添加量有一定的正相关性,这可能是 ZEA 导致子宫异常发育的原因之一。

### 3.2 ZEA 对青年母猪生长性能及子宫指数和组织形态的影响

本试验中 ZEA 对青年母猪的生长性能无显著影响。Fu 等<sup>[12]</sup>饲喂母猪被 ZEA 污染的饲料持续



21 d,也发现对 ADG、ADFI 和 F/G 均无显著影响。这可能和消化系统不是 ZEA 毒性作用的主要靶器官有关。这说明 ZEA 对生长性能的影响不是造成子宫异常发育的主要原因。

ZEA 对子宫组织生长发育的促进作用已有报道,如周敏等<sup>[13]</sup>在小母猪的饲料中添加 0.5、1.0 和 1.5 mg/kg ZEA,发现 ZEA 可使子宫内膜和肌层显著增厚,腺体数量显著增多,腺体密度显著增大,使子宫发育异常。本试验中,各试验组青年母猪的子宫指数均高于或显著高于 CON 组,且经组织学观察发现,试验组青年母猪子宫组织出现肌层和内膜增厚、腺体增多、毛细血管增多等变化。本试验中,ZEA 处理对青年母猪的 ADG、ADFI 以及 F/G 均无显著影响,结合血清和子宫组织中 GH 含量的变化,说明影响生长性能及调节 GH 分泌可能不是 ZEA 促进青年母猪子宫发育的主要作用途径。ZEA 可以通过调控子宫内生长发育相关基因及蛋白的表达来使子宫发育异常,如 ZEA 可以使母猪子宫内增殖细胞核抗原表达量升高,并激活转化生长因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ )/Smad 蛋白 3 (Smad3)信号通路<sup>[14]</sup>。组织学观察还发现 ZEA 可以使青年母猪子宫出现炎症反应和上皮细胞变性坏死。这与 ZEA 能通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)信号通路引起炎症反应及损伤,以及 ZEA 能诱导机体产生过量的活性氧引起氧化应激及损伤有关<sup>[15-16]</sup>。

### 3.3 ZEA 对青年母猪子宫组织 GHR、JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量的影响

GH 在组织和细胞水平发挥作用,需要与靶细胞膜表面的 GHR 结合使 GHR 二聚体化,激活 JAK2 后使 GHR 胞内结构与及自身酪氨酸残基磷酸化,进一步激活 STAT3,诱导蛋白质因子磷酸化,产生级联放大效应,将生物信号传导到细胞内引发生物效应,参与调节子宫组织的生长发育等生理过程<sup>[16-17]</sup>。组织中 GHR 的含量及功能影响 GH 生物效应的发挥,如 GHR 基因突变可使男童体内的 GH 的生物效应降低,导致男童身材矮小<sup>[18]</sup>。JAK2 及 STAT3 是 JAK-STAT 信号通路中的重要基因,在细胞的生长和增殖过程中发挥重要的调节作用。Feng 等<sup>[19]</sup>报道,GH 可通过 GHR-JAK2-STAT3 途径促进人子宫内膜腺细胞的增殖,如果使用 GHR 抑制剂 AG490,则 GHR、JAK2 和 STAT3 基因表达下调,GH 生物效应降低,细胞增

殖速率降低。

本试验中,各试验组青年母猪子宫组织 GHR、JAK2 和 STAT3 mRNA 相对表达量均高于或显著高于 CON 组,说明 ZEA 可能通过上调 GHR mRNA 相对表达量,提高 GH 与 GHR 的结合率,并激活下游 JAK-STAT 信号通路,使 JAK2 和 STAT3 mRNA 相对表达量上调,增强了 GH 的生物效应。GH 可以通过 GHR-JAK-STAT 途径促进子宫内膜细胞和子宫内膜腺细胞等细胞的增殖和血管的生成,使子宫指数出现极显著升高,子宫肌层和内膜增厚,子宫腺和毛细血管数量增多,子宫发育异常<sup>[19-20]</sup>。Zhou 等<sup>[21]</sup>在断奶母猪饲料中添加 1 mg/kg 的 ZEA,也发现子宫指数显著增大,子宫内膜变厚,GHR mRNA 相对表达量显著升高。

### 3.4 ZEA 对青年母猪子宫组织 GHR 蛋白阳性分布及表达的影响

在实时荧光定量 PCR 的基础上进一步进行了免疫组织化学和 Western blot 检测,发现 ZEA 可以使青年母猪子宫内 GHR 免疫阳性物质分布增多,免疫阳性强度增大,并且 T2 组 GHR 蛋白灰度值有升高的趋势。这说明 ZEA 可能通过上调 GHR 蛋白的表达水平,增强 GH 的生物作用,来促进子宫的发育。Wathes 等<sup>[22]</sup>报道,GHR 可以促进牛子宫发育。而子宫发育加快可能会增加子宫发育不全、早衰、功能异常和子宫肌瘤等疾病的患病风险,降低青年母猪的繁殖潜力<sup>[23]</sup>。Zhou 等<sup>[21]</sup>在断奶母猪的饲喂试验中发现,1 mg/kg 的 ZEA 可以使子宫 GHR 蛋白表达量显著升高。戴美玲<sup>[6]</sup>报道,饲喂断奶仔猪 1.04 mg/kg 的 ZEA 可以促进卵巢发育并使 GHR mRNA 的表达量及蛋白免疫阳性强度增大,这与本试验结果一致。

### 3.5 ZEA 对青年母猪繁殖性能的影响

ZEA 具有类雌激素活性可以特异性的与雌激素受体结合调控靶基因和蛋白质的转录与合成,产生生殖毒性作用,使母猪子宫组织发育异常,子宫细胞凋亡,子宫机能下降,是母猪繁殖性能降低的重要原因之一,持续危害着养猪业的发展<sup>[24-26]</sup>。本试验的结果表明,ZEA 对 GH 的分泌无显著影响,但可以通过调控 GHR、JAK2 和 STAT3 mRNA 相对表达和蛋白的表达来增强 GH 的生物效应,导致子宫异常发育,是 ZEA 生殖毒性作用的途径之一。同时,T2 和 T3 组青年母猪子宫还出现淋巴细胞浸润以及上皮细胞坏死等病理变化。子宫异

常发育及出现病理变化,将增加子宫发育不全、早衰、功能异常以及多种疾病的患病风险,导致母猪的繁殖性能降低<sup>[23]</sup>。如 Zhao 等<sup>[27]</sup>在断奶雌鼠的的饲喂试验中发现,40 mg/kg 的 ZEA 可以使雌鼠子宫发育异常,子宫机能降低,受精减少,胚胎运输和植入前发育延迟,胚胎着床中断,繁殖性能下降。高文博<sup>[28]</sup>在后备母猪饲料中添加 1 mg/kg 的 ZEA 也发现,子宫发育异常并产生氧化应激损伤。此外,GH 通过结合 GHR 激活下游 JAK-STAT 信号通路除了参与调节动物的生长发育外,还参与代谢、生殖系统、心血管以及消化系统等多种生理和病理过程的调节<sup>[29]</sup>。ZEA 通过此途径发挥子宫毒性作用,影响青年母猪的繁殖性能。

## 4 结 论

ZEA 对青年母猪的生长性能以及血清和子宫 GH 和 ZEA 的含量均无显著影响,但是可通过升高 *GHR*、*JAK2* 和 *STAT3* mRNA 相对表达量、增强 GHR 的免疫阳性、升高蛋白表达量来增强 GH 的生物效应,使子宫发育异常,导致子宫指数出现极显著升高,子宫肌层和内膜增厚,子宫腺和毛细血管数量增多。

## 参考文献:

- [ 1 ] 王相生.玉米赤霉烯酮及其降解酶对母猪繁殖性能的影响[D].博士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2017:1-2.  
WANG X S.Effects of zearalenone and its degrading enzymes on reproductive performance of sows[D].Ph.D.Thesis.Lanzhou;Gansu Agricultural University,2017:1-2.(in Chinese)
- [ 2 ] 王国强.2019 年我国部分地区饲料及饲料原料霉菌毒素污染调查报告[J].养猪,2020(2):14-16.  
WANG G Q.2019 investigation report on mycotoxin contamination of feed and feed raw materials in some areas of China[J].Swine Industry Science,2020(2):14-16.(in Chinese)
- [ 3 ] WU L H,DUAN Q N,GAO D Y, et al.Zearalenone blocks autophagy flow and induces cell apoptosis during embryo implantation in gilts[J].Toxicological Sciences,2020,175(1):126-139.
- [ 4 ] HRABIA A, PACZOSKA-ELIASIEWICZ H E, BERGHMAN L R, et al.Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation[J].Cell and Tissue Research,2008,332(2):317-328.
- [ 5 ] 牛群升,杨维仁,黄丽波,等.镰刀菌毒素对断奶小母猪阴户、生殖器官指数、子宫雌激素受体分布和表达的影响[J].动物营养学报,2016,28(5):1525-1533.  
NIU Q S,YANG W R,HUANG L B, et al.Effects of fusarium toxins on vulva, reproductive organ index distribution and expression of estrogen receptors in uterus of weaning gilts[J].Chinese Journal of Animal Nutrition,2016,28(5):1525-1533.(in Chinese)
- [ 6 ] 戴美玲.玉米赤霉烯酮对断奶仔猪卵巢中 *GHR*、*Ghrelin* 和 *PCNA* 表达的影响[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2016:1-2.  
DAI M L.Effects of zearalenone-diet on expression of *GHR*, ghrelin and *PCNA* in ovaries of post-weaning piglets[J].Master's Thesis.Tai'an; Shandong Agricultural University,2016:1-2.(in Chinese)
- [ 7 ] 张鸣,许厚强,陈伟,等.从江香猪和大白猪不同组织/器官中 *GHR*、*JAK2*、*STAT3* 基因的表达分析[J].黑龙江畜牧兽医,2018(21):10-14.  
ZHAN M,XU H Q,CHEN W, et al.The expression analysis of *GHR*, *JAK2* and *STAT3* genes in different tissues of Jiangxiang pig and large white pig[J].Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine,2018(21):10-14.(in Chinese)
- [ 8 ] HYMER W C,KENNETT M J,MAJI S K, et al.Bioactive growth hormone in humans: controversies, complexities and concepts[J].Growth Hormone & IGF Research,2020,50:9-22.
- [ 9 ] THOMAS M G,CARROLL J A,RAYMOND S R, et al.Transcriptional regulation of pituitary synthesis and secretion of growth hormone in growing wethers and the influence of zeranol on these mechanisms[J].Domestic Animal Endocrinology,2000,18(3):309-324.
- [ 10 ] OLIVARES V H,HALLFORD D M.Growth and carcass characteristics and serum growth hormone, prolactin and insulin profiles in debouillet lambs treated with ovine growth hormone and (or) zeranol[J].Journal of Animal Science,1990,68(7):1971-1979.
- [ 11 ] GAJECKA M,SŁAWUTA P,NICPOŃ J, et al.Zearalenone and its metabolites in the tissues of female wild boars exposed per os to mycotoxins[J].Toxicol,2016,114:1-12.
- [ 12 ] FU G H,WANG L H,LI L, et al.*Bacillus licheniformis* CK1 alleviates the toxic effects of zearalenone in feed on weaned female Tibetan piglets[J].Journal of



- Animal Science, 2018, 96(10):4471-4480.
- [13] 周敏,周雪梅,杨立杰,等.玉米赤霉烯酮对断奶小母猪子宫形态学及热应激蛋白 70 分布和表达的影响[J].中国农业科学,2018,51(4):778-788.  
ZHOU M, ZHOU X M, YANG L J, et al. Effects of zearalenone on expression of heat shock protein 70 and morphology of uterus tissues of post-weaning piglets[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(4):778-788. (in Chinese)
- [14] PISTOL G C, BRAICU C, MOTIU M, et al. Zearalenone mycotoxin affects immune mediators, MAPK signalling molecules, nuclear receptors and genome-wide gene expression in pig spleen[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0127503.
- [15] ZHENG W L, FENG N N, WANG Y, et al. Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: a review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 126:262-276.
- [16] 张鸣. *GHR* 基因编辑猪生长发育指标及相关基因表达研究[D]. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州农业大学, 2018:2-6.  
ZHANG M. Study on the growth and development index and related gene expression of *GHR* gene editing pigs[D]. Master's Thesis. Guiyang: Guizhou University, 2018:2-6. (in Chinese)
- [17] 吴天成, 兰海楠, 马思慧, 等. 生长激素受体介导的信号转导机制研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(12):186-189.  
WU T C, LAN H N, MA S H, et al. Research progress on signal transduction mechanisms underlying growth hormone receptor action[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(12):186-189. (in Chinese)
- [18] RUGHANI A, ZHANG D S, VAIRAMANI K, et al. Severe growth failure associated with a novel heterozygous nonsense mutation in the GHR transmembrane domain leading to elevated growth hormone binding protein[J]. Clinical Endocrinology, 2020, 92(4):331-337.
- [19] FENG Q, GAO B S, HUANG H, et al. Growth hormone promotes human endometrial glandular cells proliferation and motion through the GHR-STAT3/5 pathway[J]. Annals of Translational Medicine, 2020, 8(4):53.
- [20] CUI N, LI A M, LUO Z Y, et al. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium[J]. Journal of Endocrinological Investigation, 2019, 42(1):27-35.
- [21] ZHOU M, YANG L J, CHEN Y H, et al. Comparative study of stress response, growth and development of uteri in post-weaning gilts challenged with zearalenone and estradiol benzoate[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2019, 103(6):1885-1894.
- [22] WATHES D C, CHENG Z R, FENWICK M A, et al. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow[J]. Reproduction, 2011, 141(2):269-281.
- [23] KANORA A, MAES D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review[J]. Veterinární Medicína, 2009, 54(12):565-576.
- [24] ZHOU M, YANG L J, SHAO M H, et al. Effects of zearalenone exposure on the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway and the expression of proliferation or apoptosis related genes of post-weaning gilts[J]. Toxins, 2018, 10(2):49.
- [25] GRENIER B, HACKL M, SKALICKY S, et al. MicroRNAs in porcine uterus and serum are affected by zearalenone and represent a new target for mycotoxin biomarker discovery[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):9408.
- [26] GAJECKA M, RYBARCZYK L, JAKIMIUK E, et al. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2012, 64(6):537-542.
- [27] ZHAO F, LI R, XIAO S, et al. Postweaning exposure to dietary zearalenone, a mycotoxin, promotes premature onset of puberty and disrupts early pregnancy events in female mice[J]. Toxicological Sciences, 2013, 132(2):431-442.
- [28] 高文博. 吸附剂对玉米赤霉烯酮致后备母猪子宫毒性的保护作用研究[D]. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学, 2019:1-2.  
GAO W B. Protective effect of adsorbents on the toxic effects of zearalenone on sow uterus[D]. Master's Thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019:1-2. (in Chinese)
- [29] DEHKHODA F, LEE C M M, MEDINA J, et al. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects[J]. Frontiers in Endocrinology, 2018, 9:35.

# Effects of Zearalenone on Uterus Development, Growth Hormone Secretion and Its Receptor Distribution and Expression in Prepubertal gilts

WU Fengyang<sup>1</sup> CUI Jia<sup>1</sup> YANG Xinyu<sup>1</sup> CHEN Baojiang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Hebei Technology Innovation Center of Cattle and Sheep Embryo, Baoding 071000, China)

**Abstract:** The purpose of this experiment was to investigate the effects of zearalenone on uterus development, growth hormone secretion and its receptor distribution and expression in prepubertal gilts. A total of 48 Landrace×Yorkshire prepubertal gilts with similar litter times, breeds and weight of (23.20±0.68) kg were randomly divided into 4 groups (12 replicates per group, 1 gilt per replicate). Prepubertal gilts in control group (CON group) were fed a basal diet and those in test groups (T1, T2 and T3 groups) were fed the basal diet supplemented with 200, 800, 1 600 μg/kg ZEA, respectively. Pretest lasted for 7 d, and test lasted for 40 d. The results showed as follows: 1) there were no significant differences in the contents of GH in serum and uterine tissues of prepubertal gilts in all groups ( $P>0.05$ ). 2) There were no significant differences in the contents of ZEA in uterine tissues of prepubertal gilts in all groups ( $P>0.05$ ). 3) There were no significant differences in the initial weight, final weight, average daily gain, average daily feed intake and feed/gain of each group of prepubertal gilts ( $P>0.05$ ), but compared with the CON group, the uterine index of the gilts in the T2 group was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the T3 group was extremely significantly increased ( $P<0.01$ ). 4) Compared with the CON group, the myometrium and endometrium of prepubertal gilts in the test groups were thickened, and the number of uterine glands and capillaries were increased. The T2 and T3 groups also showed inflammatory responses and epithelial cell necrosis. 5) Compared with the CON group, the relative expression levels of *GHR* and Janus activated kinase 2 mRNA in the T2 group and *GHR* mRNA in the T3 group were significantly increased ( $P<0.05$ ), and the relative expression levels of signal transducer and activator of transcription 3 mRNA were not significantly different among the groups ( $P>0.05$ ). 6) ZEA had no obvious effect on the distribution and localization of GHR in the uterus of prepubertal gilts. However, compared with the CON group, the distribution of GHR immunopositive substances increased in the experimental groups, and the immunopositive intensity increased. 7) There was no significant difference in the expression level of GHR protein in the uterus among groups ( $P>0.05$ ), but the gray value in T2 group showed an increasing trend compared with CON group ( $P=0.09$ ). In conclusion, ZEA has no significant effect on the growth performance and the levels of serum and uterus GH and ZEA of prepubertal gilts. However, ZEA can increase the relative expression levels of *GHR*, *JAK2* and *STAT3* mRNA, and enhance the immunopositive of GHR, and increase the protein expression level, which enhance the biological effect of GH and make the uterus abnormal development. ZEA significantly increase uterine index, thicken myometrium and endometrium, and increase uterine glands and capillaries. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(1):217-226]

**Key words:** zearalenone; prepubertal gilts; uterus; growth and development; growth hormone; growth hormone receptor