

# 白藜芦醇对氧化应激仔猪回肠黏膜形态、抗氧化能力、紧密连接蛋白及炎症因子 mRNA 表达的影响

符清瑶<sup>1</sup> 施力光<sup>2</sup> 周汉林<sup>2</sup> 曹 婷<sup>2</sup> 马中华<sup>1</sup> 姜宏正<sup>1</sup> 荀文娟<sup>1,2\*</sup>

(1.海南大学动物科技学院,海口 570228;2.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所,儋州 571737)

**摘要:** 本试验旨在研究白藜芦醇(Res)对氧化应激仔猪肠道黏膜结构、抗氧化能力、紧密连接蛋白及炎症因子 mRNA 表达的影响。选择健康状况良好、胎次相近的 28 日龄三元杂交(杜×长×大)断奶仔猪 30 头,随机分为 5 组,对照组饲喂基础饲料,试验组在基础饲料中分别添加 0、10、30、90 mg/kg Res,每组 6 个重复,每个重复 1 头仔猪。于试验第 15 天清晨给试验组[敌草快(Diquat)组、Diquat+10 mg/kg Res 组、Diquat+30 mg/kg Res 组、Diquat+90 mg/kg Res 组]仔猪按照 10 mg/kg BW 的剂量腹腔注射 Diquat 建立氧化应激模型,对照组只注射相同剂量灭菌生理盐水为参照。试验期 21 d。结果表明:与对照组相比,Diquat 组绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度(V/C)显著降低( $P<0.05$ ),隐窝深度显著升高( $P<0.05$ );肠黏膜丙二醛(MDA)含量显著升高( $P<0.05$ ),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性显著降低( $P<0.05$ );肠黏膜白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(IL-6)含量显著升高( $P<0.05$ ),而肠黏膜白细胞介素-10(IL-10)含量显著降低( $P<0.05$ );肠黏膜闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)和跨膜蛋白(Claudin)的 mRNA 相对表达量均显著降低( $P<0.05$ )。与 Diquat 组相比,Diquat+30 mg/kg Res 组和 Diquat+90 mg/kg Res 组回肠绒毛高度和 V/C 显著提高( $P<0.05$ );肠黏膜 MDA 含量显著下降( $P<0.05$ ),GSH-Px 和 SOD 活性显著提高( $P<0.05$ ),其中以 Diquat+90 mg/kg Res 组效果最为显著;肠黏膜 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的 mRNA 相对表达量均显著提高( $P<0.05$ ),且不同 Res 剂量组间无显著差异( $P>0.05$ );肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量显著降低( $P<0.05$ ),同时 IL-10 含量显著提高( $P<0.05$ )。综上所述,Res 可以提高氧化应激仔猪回肠抗氧化酶活性,改善回肠黏膜形态结构,同时抑制肠道炎症的发生,维持肠道健康。

**关键词:** 白藜芦醇;仔猪;回肠黏膜;氧化应激;肠道健康

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)02-1163-10

氧化应激被认为是体内所释放的氧化自由基超过机体本身的抗氧化水平,引发机体发生不同的生理或病理现象。当仔猪发生氧化应激时会破坏自由代谢和抗氧化系统<sup>[1]</sup>,从而发生严重的

氧化应激反应,由此使机体免疫系统损坏,引发炎症反应<sup>[2]</sup>,同时还与肠道健康有关,可导致肠黏膜屏障功能受损<sup>[3]</sup>。Li 等<sup>[4]</sup>研究表明,敌草快(Diquat)诱导的仔猪氧化应激会显著降低回肠黏

收稿日期:2020-07-06

基金项目:中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630032019023,1630032017035);国家农业农村部农产品质量安全专项(2130109);海南省自然科学基金青年基金项目(319QN307)

作者简介:符清瑶(1996—),女,海南文昌人,硕士研究生,研究方向为猪的营养。E-mail:1394707528@qq.com

\*通信作者:荀文娟,副研究员,硕士生导师,E-mail:xunwenjuan991@163.com

膜结构的绒毛高度/隐窝深度(V/C),导致肠绒毛形态发育不完整。Zheng等<sup>[5]</sup>研究发现,仔猪腹腔注射 Diquat 显著提高血清中皮质醇和丙二醛(MDA)的含量,造成仔猪抗氧化能力下降,导致营养物质的吸收减少。因此,寻找一种缓解仔猪肠道氧化应激的饲料添加剂对于仔猪的生产具有实际意义。

白藜芦醇(Res)是一种植物多酚,属于植物抗毒素类的二苯乙烯家族<sup>[6]</sup>,在体内外均表现出强大的抗氧化活性<sup>[7-8]</sup>。因其具备广泛的生物活性而备受关注,其中还包括抗炎、抗癌、抗衰老、保护心血管和调控脂肪沉积等作用<sup>[9-13]</sup>。Meng等<sup>[14]</sup>研究发现,Res能够通过上调核因子E2相关因子2(Nrf2)蛋白表达水平,下调Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)蛋白表达水平,从而激活Nrf2信号通路;并上调Nrf2调节的抗氧化防御系统相关基因表达,包括过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物1型酶(GPX1)和血红素加氧酶1(HO1),提高了母猪妊娠期胎盘的抗氧化能力。另有研究表明,Res可以调节断奶仔猪肠道微生物群,抑制Toll样受体4(TLR4)信号通路,减轻肠道炎症,增强肠道免疫功能<sup>[15]</sup>。目前,对于Res的研究主要集中在其对动物的生产性能、脂质合成和缓解肠道炎症等方面的影响,然而其对肠黏膜的保护作用以及具体机制鲜有报道。因此,本试验拟通过建立Diquat诱导的断奶仔猪氧化应激模型,比较Res对氧化应激仔猪肠道黏膜结构、抗氧化能力、紧密连接蛋白及炎性因子mRNA表达的影响,明确其对肠黏膜的保护作用,以期为仔猪绿色饲料添加剂的研发提供数据支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

Res购于上海某生物科技有限公司,纯度为98%;Diquat溶液购于Sigma公司;荧光定量PCR试剂盒、逆转录试剂盒与RNAiso Plus购于南京诺唯赞生物有限公司;抗氧化试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 试验设计及饲料

选择健康状况良好、胎次相近的28日龄三元杂交(杜×长×大)断奶仔猪30头,随机分为5组,对照组饲喂基础饲料,试验组在基础饲料中分别添加0、10、30、90 mg/kg Res,每组6个重复,每个

重复1头仔猪。试验期21 d。于试验第15天清晨给试验组(Diquat组、Diquat+10 mg/kg Res组、Diquat+30 mg/kg Res组、Diquat+90 mg/kg Res组)仔猪按照10 mg/kg BW的剂量腹腔注射Diquat建立氧化应激模型,对照组只注射相同剂量灭菌生理盐水为参照,诱导产生氧化应激后再继续饲喂7 d,屠宰采集肠道样品。基础饲料参考NRC(2012)营养需要配制,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	62.50
豆粕 Soybean meal	20.50
乳清粉 Whey powder	5.50
鱼粉 Fish meal	4.50
豆油 Soybean oil	1.30
蔗糖 Sucrose	1.50
石粉 Limestone	0.60
氯化胆碱 Choline chloride	0.10
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.20
酸化剂 Acidifying agent	0.30
L-赖氨酸 L-lysine	0.40
DL-蛋氨酸 DL-methionine	0.16
L-色氨酸 L-tryptophan	0.04
L-苏氨酸 L-threonine	0.10
食盐 NaCl	0.30
预混料 Premix <sup>1)</sup>	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
消化能 DE/(MJ/kg)	14.21
粗蛋白质 CP	19.62
钙 Ca	0.75
有效磷 AP	0.40
赖氨酸 Lys	1.31
蛋氨酸 Met	0.42
苏氨酸 Thr	0.73
色氨酸 Trp	0.20

1) 每千克饲料含有 One kilogram of the diet contained as following: Cu 16.5 mg, Fe 100 mg, Mn 35 mg, Zn 100 mg, Se 0.3 mg, I 0.3 mg, VA 12 000 IU, VD<sub>3</sub> 3 000 IU, VE 80 IU, VK 2.5 mg, 叶酸 folic acid 1.5 mg, 烟酸 nicotinic acid 40 mg, 泛酸 pantothenate 20 mg, 生物素 biotin 0.20 mg, VB<sub>1</sub> 2.5 mg, VB<sub>2</sub> 6.0 mg, VB<sub>12</sub> 0.05 mg。

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 饲养管理

本试验在中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所畜牧基地开展,整个动物饲养试验开展期间所有仔猪自由采食和饮水。每天饲喂 3 次,以仔猪吃饱后料槽内有余料为度。每天打扫保持圈舍清洁,定期消毒。

### 1.4 样品采集

饲养试验结束前 12 h 停止对仔猪喂食。试验第 22 天清晨所有仔猪颈静脉放血处死,屠宰后打开腹腔,取出回肠,立即放入盛有冰块的冰盒中,取回肠中段 5~10 cm,用冰浴的生理盐水洗净外壁及内容物,滤纸吸干,剪开肠管,用载玻片轻轻刮取肠黏膜,取约 0.5 g 肠黏膜用锡箔纸成粒状,每个样品包 4~5 粒放入 2 mL 离心管中,编号,放入液氮中暂时保存,采样结束后样品保存于 -80 ℃。另取约 5 cm 回肠中段,用生理盐水洗去内容物后放入 4% 多聚甲醛固定液固定肠管。

### 1.5 回肠黏膜形态测定

将已固定的组织样修整、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、修块、切片、展片<sup>[16]</sup>后进行苏木精-伊红(HE)染色,光镜下测定小肠绒毛长度、宽度、隐窝深度和 V/C,每张切片选取 5 个视野拍照,并选取 3 个走向完整的肠绒毛进行测量取均值。

### 1.6 抗氧化能力测定

肠黏膜谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超

氧化物歧化酶(SOD)活性、MDA 含量采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定,检测过程按照试剂盒的操作说明完成。

### 1.7 肠黏膜紧密连接蛋白与细胞因子 mRNA 相对表达量测定

采用实时荧光定量 PCR 检测肠黏膜闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)和跨膜蛋白(Claudin)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)的 mRNA 相对表达量。RNAiso Plus 试剂盒提取回肠黏膜组织总 RNA,利用超微量分光光度计测定仪检测 RNA 浓度,吸光度在 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.8~2.2 表示 RNA 纯度较高;采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 品质,电泳后可见 28s、18s 和 5s 的小分子条带则说明 RNA 完整性较好,之后保存于 -80 ℃ 备用。HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒说明进行 cDNA 的合成,得到的 cDNA 于 -20 ℃ 保存备用。以反转录的 cDNA 为模板扩增基因,进行实时荧光定量 PCR (Vazyme Biotech) 检测。反应程序为:95 ℃ 30 s→95 ℃ 10 s→60 ℃ 30 s(40 个循环);熔解曲线 95 ℃ 15 s→60 ℃ 60 s→95 ℃ 15 s。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算各组基因的 mRNA 相对表达量。利用 Premier 5.0 软件设计引物,引物序列见表 2<sup>[16-17]</sup>。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因 Genes	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物大小 Product size/bp
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	AF017079	F:GAAGGTCGGAGTGAACGGAT R:CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	149
闭合蛋白 Occludin	NM_001163647.1	F:ATGCTTTCTCAGCCAGCGTA R:AAGGTTCCATAGCCTCGGTC	176
闭锁小带蛋白-1 ZO-1	XM003353439.1	F:GAGGATGGTCACACCGTGGT R:GGAGGATGCTGTTGTCTCGG	169
跨膜蛋白 Claudin	NM_001161635.1	F:GGACTAATAGCCATCTTTGT R:CAGCCATCCGCATCTTCT	88
白细胞介素-1 $\beta$ IL-1 $\beta$	NM_214055.1	F:ACCTGGACCTTGGTTCTC R:GGATTCTTCATCGGCTTC	124
肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$	NM_214022.1	F:ACGCTCTTCTGCCTACTGC R:TCCCTCGGCTTTGACATT	162
白细胞介素-10 IL-10	NM_214041.1	F:CACTGCTCTATTGCCTGATCTTCC R:AAACTCTTCACTGGGCCGAAG	136
白细胞介素-6 IL-6	NM_214399.1	F:TTCAGTCCAGTCGCCTTCT R:GTGGCATCACCTTTGGCATCTTCTT	91

## 1.8 数据处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 氏法进行多重比较, 以  $P < 0.05$  作为差异显著性判断标准。

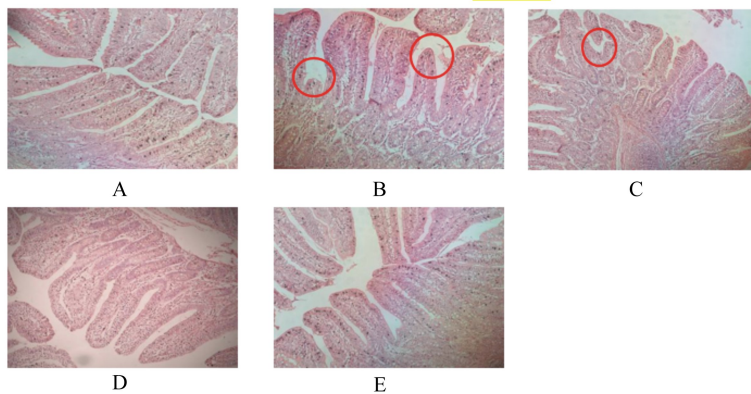
## 2 结果与分析

### 2.1 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜形态的影响

由图 1 可知, 对照组回肠绒毛结构完整, 排列整齐 (图 1-A), Diquat 组肠绒毛结构出现脱落或松散的现象 (图 1-B), 经过 Diquat + Res

(10 mg/kg) 处理后绒毛结构仍有脱落 (图 1-C), Diquat+30 mg/kg Res 组和 Diquat+90 mg/kg Res 组肠黏膜结构发育趋于整齐且密集, 形状规则 (图 1-D、图 1-E)。

由表 3 可知, 与对照组相比, Diquat 组绒毛高度和 V/C 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 隐窝深度显著升高 ( $P < 0.05$ )。氧化应激状态下, Diquat+30 mg/kg Res 组和 Diquat+90 mg/kg Res 组绒毛高度均显著高于 Diquat 组 ( $P < 0.05$ ), 隐窝深度显著低于 Diquat 组 ( $P < 0.05$ )。



A: 对照组 control group; B: Diquat 组 Diquat group; C: Diquat+10 mg/kg Res 组 Diquat+10 mg/kg Res group; D: Diquat+30 mg/kg Res 组 Diquat+30 mg/kg Res group; E: Diquat+90 mg/kg Res 组 Diquat+90 mg/kg Res group。

图 1 各组回肠黏膜形态

Fig.1 Morphology of ileum mucosa in each group (200×)

表 3 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜形态的影响

Table 3 Effects of Res on ileal mucosal morphology in oxidative stress piglets ( $n=6$ )

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	对照 Control	Diquat	Diquat+ 10 mg/kg Res	Diquat+ 30 mg/kg Res	Diquat+ 90 mg/kg Res		
绒毛高度 Villus height/ $\mu\text{m}$	337.81 <sup>a</sup>	270.72 <sup>c</sup>	298.67 <sup>b</sup>	324.53 <sup>a</sup>	332.74 <sup>a</sup>	10.220	0.001
隐窝深度 Crypt depth/ $\mu\text{m}$	193.25 <sup>c</sup>	249.34 <sup>a</sup>	237.73 <sup>ab</sup>	224.78 <sup>b</sup>	222.51 <sup>b</sup>	9.206	0.001
绒毛高度/隐窝深度 V/C	1.79 <sup>a</sup>	1.11 <sup>d</sup>	1.32 <sup>c</sup>	1.52 <sup>b</sup>	1.56 <sup>b</sup>	0.069	0.001

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

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

### 2.2 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜抗氧化能力的影响

由表 4 可知, 与对照组相比, Diquat 组肠黏膜

MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), GSH-Px 和 SOD 活性显著下降 ( $P < 0.05$ )。与 Diquat 组相比, Diquat+30 mg/kg Res 组或 Diquat+90 mg/kg Res 组中肠



黏膜 GSH-Px 和 SOD 活性显著提高 ( $P < 0.05$ ), MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且 Diquat +

90 mg/kg Res 组中抗氧化酶活性与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 4 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜抗氧化能力的影响

Table 4 Effects of Res on antioxidant ability of ileal mucosa in oxidative stress piglets

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	对照 Control	Diquat	Diquat+ 10 mg/kg Res	Diquat+ 30 mg/kg Res	Diquat+ 90 mg/kg Res		
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)	62.63 <sup>a</sup>	35.59 <sup>c</sup>	36.41 <sup>c</sup>	48.13 <sup>b</sup>	55.37 <sup>ab</sup>	2.970	0.001
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	95.41 <sup>a</sup>	57.46 <sup>c</sup>	62.52 <sup>c</sup>	77.36 <sup>b</sup>	85.47 <sup>ab</sup>	4.030	<0.001
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.42 <sup>c</sup>	1.17 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.64 <sup>bc</sup>	0.55 <sup>c</sup>	0.077	<0.001

### 2.3 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的影响

由表 5 可知,与对照组相比,Diquat 组中肠黏膜 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的 mRNA 相对表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 Diquat 组相比,肠黏

膜 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的 mRNA 相对表达量均显著提高 ( $P < 0.05$ ),且 Diquat+10 mg/kg Res 组、Diquat+30 mg/kg Res 组和 Diquat+90 mg/kg Res 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 5 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的影响

Table 5 Effects of Res on relative expression levels of tight junction protein mRNA of ileal mucosa in oxidative stress piglets

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	对照 Control	Diquat	Diquat+ 10 mg/kg Res	Diquat+ 30 mg/kg Res	Diquat+ 90 mg/kg Res		
闭锁小带蛋白-1 ZO-1	1.00 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.76 <sup>a</sup>	0.86 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.067	0.003
闭合蛋白 Occludin	1.00 <sup>a</sup>	0.54 <sup>c</sup>	0.70 <sup>bc</sup>	0.72 <sup>bc</sup>	0.76 <sup>b</sup>	0.046	0.007
跨膜蛋白 Claudin	1.00 <sup>a</sup>	0.43 <sup>c</sup>	0.65 <sup>bc</sup>	0.84 <sup>ab</sup>	0.91 <sup>ab</sup>	0.062	0.004

### 2.4 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜细胞因子 mRNA 相对表达量的影响

由表 6 可知,与对照组相比,Diquat 组肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ),IL-10 的 mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。饲料中添加 30 和 90 mg/kg Res 能显著降低氧化应激仔猪肠黏膜细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ ),显著提高 IL-10 的 mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜形态的影响

肠道的绒毛结构往往能反映出肠道健康情

况,肠道形态损伤影响营养物质的吸收,增加肠道的通透性,从而降低肠道对疾病的抵抗力<sup>[18]</sup>。Wen 等<sup>[19]</sup>研究表明,氧化应激损害断奶仔猪十二指肠、空肠和回肠的形态发育,缩短绒毛高度,降低 V/C,并显著增加十二指肠的隐窝深度。有研究发现,在断奶仔猪的饲料中补充 Res 增加了空肠绒毛高度,并有减少空肠凋亡细胞数量的趋势<sup>[20]</sup>。Chen 等<sup>[21]</sup>研究发现,在饲料中添加 300 mg/kg Res 可显著增加断奶仔猪空肠的绒毛高度和 V/C。在本试验中,添加 Res 可以有效地提高氧化应激仔猪回肠的绒毛高度和 V/C,降低隐窝深度,其中以添加量 30、90 mg/kg Res 效果较为显著,说明 Res 在一定程度上可以改善仔猪的

回肠黏膜形态,缓解肠道应激,有利于促进机体对 营养物质的消化吸收。

表 6 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜细胞因子 mRNA 相对表达量的影响

Table 6 Effects of Res on relative expression levels of inflammatory factor mRNA of ileal mucosa in oxidative stress piglets

项目 Items	组别 Groups					SEM	P 值 P-value
	对照 Control	Diquat	Diquat+ 10 mg/kg Res	Diquat+ 30 mg/kg Res	Diquat+ 90 mg/kg Res		
白细胞介素-1 $\beta$ <i>IL-1<math>\beta</math></i>	1.00 <sup>b</sup>	1.75 <sup>a</sup>	1.38 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>b</sup>	1.17 <sup>b</sup>	0.128	0.043
肿瘤坏死因子- $\alpha$ <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	1.00 <sup>b</sup>	1.97 <sup>a</sup>	1.43 <sup>b</sup>	1.26 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	0.107	0.023
白细胞介素-6 <i>IL-6</i>	1.00 <sup>c</sup>	1.64 <sup>a</sup>	1.50 <sup>ab</sup>	1.18 <sup>bc</sup>	1.09 <sup>bc</sup>	0.084	0.036
白细胞介素-10 <i>IL-10</i>	1.00 <sup>a</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.74 <sup>ab</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.97 <sup>a</sup>	0.058	0.016

### 3.2 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜抗氧化能力的影响

细胞内活性氧(ROS)是机体在代谢过程中产生的一系列活性氧簇。机体的抗氧化系统维持着 ROS 产生与清除的动态平衡,同时核因子 E2 相关因子 2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Nrf2/Keap1)和核因子- $\kappa$ B/核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白(NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B)也广泛参与氧化应激反应<sup>[22]</sup>。GSH-Px、CAT 和总超氧化物歧化酶(T-SOD)等抗氧化酶都具有很强的清除自由基的能力<sup>[23]</sup>。此外,MDA 含量是衡量氧化应激水平的标志<sup>[24]</sup>。Meng 等<sup>[14]</sup>研究表明,在母猪妊娠期和哺乳期补充 Res 降低了胎盘和乳汁中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量,增加其胎盘和乳汁的抗氧化状态,从而增加断奶仔猪的抗氧化能力,同时增加了胎盘中 Keap1-Nrf2 通路和沉默信息调节因子 2 相关酶 1(*Sirt1*)抗氧化基因表达。Cao 等<sup>[25]</sup>研究发现,在 Diquat 应激仔猪饲料中添加 Res 减少了空肠线粒体 ROS 的产生。本试验研究表明,在氧化应激状态下添加不同水平 Res 均显著降低了回肠黏膜 MDA 含量,其中以 30 和 90 mg/kg 剂量的效果最为理想。此外,随着 Res 剂量的增加,肠黏膜 GSH-Px 和 SOD 的 mRNA 相对表达量得到显著升高,且以 Diquat+90 mg/kg Res 组的效果最为显著;这与胡瑶莲等<sup>[26]</sup>结果相似,说明适量的 Res 可以增强氧化应激仔猪的抗氧化能力。

### 3.3 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的影响

黏附连接(AJ)和紧密连接(TJ)是肠道黏膜屏障的关键组成部分,在肠道稳态中起关键作用,ZO-1、Occludin 和 Claudins 是 TJ 的重要成分,钙黏

附蛋白 E(E-cadherin)是 AJ 的主要成分<sup>[27]</sup>。ZO-1、Occludin、Claudins 和 E-cadherin 的表达量降低会导致肠道通透性增加。研究表明,当仔猪受到氧化应激时会下调紧密连接蛋白的表达<sup>[25]</sup>。同时 Liu 等<sup>[28]</sup>研究发现,Diquat 降低了 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 表达以及 ZO-1 和 Occludin 的蛋白质表达,表明肠上皮屏障的紧密连接蛋白受到了氧化应激的破坏。多酚通过多种信号途径调节 TJ 表达,比如可通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Nrf2 或血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路来改善屏障功能<sup>[29-31]</sup>。Res 是多酚类化合物,Zhuang 等<sup>[32]</sup>研究发现,Res 通磷脂肌醇 3-激酶/蛋白激酶(PI3K/Akt)介导的 Nrf2 信号通路上调 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激下 TJ 蛋白的表达来减轻肠屏障的功能障碍,提高猪小肠上皮(IPEC-J2)细胞活力,降低凋亡率。本试验研究结果表明,Diquat 组仔猪回肠黏膜 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的 mRNA 相对表达量均显著降低,但在氧化应激状态下补充 90 mg/kg Res 可以有效地增加 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的 mRNA 相对表达量,其中以 Claudin 的 mRNA 相对表达量的增加最为明显。该结果与 Cao 等<sup>[33]</sup>的研究结果相似,在注射 Diquat 的仔猪饲料中添加 100 mg/kg 的 Res 显著提高回肠黏膜 Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 的蛋白表达水平,说明饲料中添加 Res 可以有效促进紧密连接蛋白表达,降低肠道通透性,缓解仔猪回肠黏膜氧化应激损伤,达到保护仔猪肠道健康的作用。

### 3.4 Res 对氧化应激仔猪回肠黏膜炎性因子 mRNA 相对表达量的影响

Res 常被用于治疗炎症,如结肠炎<sup>[34]</sup>、乳腺

炎<sup>[35]</sup>等。NF- $\kappa$ B 是氧化应激和炎症相关组织损伤中氧化还原敏感的转录因子,在 小鼠巨噬细胞中<sup>[36]</sup>,发现 Res 通过分别降低和增加 ac-NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B- $\alpha$  水平来调节炎症反应。在 小鼠糖尿病模型中,Wang 等<sup>[37]</sup>研究结果显示,Res 显著增加 Nrf2 下游抗氧化基因 NADPH 醌脱氢酶-1(NQO-1)、HO-1 的 mRNA 表达,且显著降低了 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的蛋白表达水平,这说明它可能通过上调 Nrf2 和下游抗氧化剂的表达控制炎症发生。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  属于炎症关键细胞因子,两者会导致肠黏膜紧密连接蛋白表达和分布发生变化,引起肠道通透性增加<sup>[38]</sup>。Cheng 等<sup>[39]</sup>在 小鼠热应激模型中发现 Res 可以使 TNF- $\alpha$  含量降低,TLR4 和细胞因子 mRNA 表达下调,通过抑制氧化应激和炎症来保护肠功能。本试验研究结果表明,当断奶仔猪受到氧化应激时,肠道黏膜炎症因子 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量显著增加,可能参与了 Jun 激酶(JNK)或 NF- $\kappa$ B 介导的信号转导通路的激活;结合 IL-6 表达丰度的增加和 IL-10 的 mRNA 表达量的降低,推测 Res 可能通过 IL-6 刺激 T 细胞增殖、IL-10 抑制炎症因子进而实现抑制肠道炎症的发生。此外,与 Diquat 组相比,Diquat+30 mg/kg Res 组或 Diquat+90 mg/kg Res 组肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 相对表达量均显著降低,而 IL-10 的 mRNA 相对表达量则显著升高,且与对照组无显著差异,与 Gan 等<sup>[15]</sup>在断奶仔猪添加 300 mg/kg Res 能降低空肠中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平、提高 IL-10 的 mRNA 表达水平结果一致。这说明 Res 对于肠道炎症具有一定的抑制作用,但其具体的信号机制还需再进行深一步探讨。

#### 4 结 论

当断奶仔猪遭受氧化应激时,其回肠黏膜形态结构遭到破坏,紧密连接蛋白表达显著降低,抗氧化及抗炎性能均显著降低。添加 Res 可以有效改善回肠黏膜形态,显著增强仔猪抗氧化能力,并抑制肠道炎症的发生,其中添加 90 mg/kg Res 效果较好。

#### 参考文献:

[ 1 ] YIN J, WU W W, XIAO H, et al. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets [ J ].

- Journal of Animal Science, 2014, 92(2) : 612-619.
- [ 2 ] STOKES C R, BAILEY M, HAVERSON K, et al. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning [ J ]. Animal Research, 2004, 53(4) : 325-334.
- [ 3 ] WIJTEN P J A, VAN DER MEULEN J, VERSTEGEN M W A. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review [ J ]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(7) : 967-981.
- [ 4 ] LI M, YUAN D X, LIU Y H, et al. Dietary puerarin supplementation alleviates oxidative stress in the small intestines of Diquat-challenged piglets [ J ]. Animals, 2020, 10(4) : 631.
- [ 5 ] ZHENG P, YU B, HE J, et al. Arginine metabolism and its protective effects on intestinal health and functions in weaned piglets under oxidative stress induced by Diquat [ J ]. British Journal of Nutrition, 2017, 117(11) : 1495-1502.
- [ 6 ] PANDEY K B, RIZVI S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease [ J ]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009, 2: 897484.
- [ 7 ] ZHANG C, WANG L, ZHAO X H, et al. Dietary resveratrol supplementation prevents transport-stress-impaired meat quality of broilers through maintaining muscle energy metabolism and antioxidant status [ J ]. Poultry Science, 2017, 96(7) : 2219-2225.
- [ 8 ] WANG X, LIU M, ZHU M J, et al. Resveratrol protects the integrity of alveolar epithelial barrier via SIRT1/PTEN/p-Akt pathway in methamphetamine-induced chronic lung injury [ J ]. Cell Proliferation, 2020, 53(3) : e12773.
- [ 9 ] ZHOU Z X, MOU S F, CHEN X Q, et al. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B in animal models of acute pharyngitis [ J ]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(1) : 1269-1274.
- [ 10 ] RAUF A, IMRAN M, BUTT M S, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: a review [ J ]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(9) : 1428-1447.
- [ 11 ] BHULLAR K S, HUBBARD B P. Lifespan and healthspan extension by resveratrol [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta ( BBA ): Molecular Basis of Disease, 2015, 1852(6) : 1209-1218.
- [ 12 ] BREUSS J M, ATANASOV A M, UHRIN P. Resveratrol and its effects on the vascular system [ J ]. Interna-

- tional Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 ( 7 ) : 1523.
- [ 13 ] MOMCHILOVA A, PETKOVA D, STANEVA G, et al. Resveratrol alters the lipid composition, metabolism and peroxide level in senescent rat hepatocytes [ J ]. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 207 : 74-80.
- [ 14 ] MENG Q W, GUO T, LI G Q, et al. Dietary resveratrol improves antioxidant status of sows and piglets and regulates antioxidant gene expression in placenta by Keap1-Nrf2 pathway and Sirt [ J ]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9 : 34.
- [ 15 ] GAN Z D, WEI W Y, LI Y, et al. Curcumin and resveratrol regulate intestinal bacteria and alleviate intestinal inflammation in weaned piglets [ J ]. *Molecules*, 2019, 24 ( 7 ) : 1220.
- [ 16 ] 荀文娟, 周汉林, 侯冠彧, 等. 姜黄素对早期断奶仔猪回肠黏膜形态、紧密连接蛋白和炎性因子基因表达以及血清免疫球蛋白水平的影响 [ J ]. *动物营养学报*, 2016, 28 ( 3 ) : 826-833.
- XUN W J, ZHOU H L, HOU G Y, et al. Effects of curcumin on ileal mucosa morphology, tight junction protein and inflammatory factor gene expression and serum immunoglobulin levels in early weaned piglets [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28 ( 3 ) : 826-833. ( in Chinese )
- [ 17 ] 赵春萍. 姜黄素对大肠杆菌攻毒仔猪生长性能及肠黏膜屏障功能的影响 [ D ]. 硕士学位论文. 海口: 海南大学, 2015 : 26-34.
- ZHAO C P. Effects of curcumin on growth performance and intestinal mucosal barrier function of piglets challenged by *E. coli* [ D ]. Master's Thesis. Haikou: Hainan University, 2015 : 26-34. ( in Chinese )
- [ 18 ] 王海超. 甜菜碱对仔猪生长和肠道功能的影响及机制研究 [ D ]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2019 : 19-54.
- WANG H C. Study on the effect and mechanism of betaine on growth and intestinal function of piglets [ D ]. Ph. D. Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2019 : 19-54. ( in Chinese )
- [ 19 ] WEN C Y, GUO Q P, WANG W L, et al. Taurine alleviates intestinal injury by mediating tight junction barriers in Diquat-challenged piglet models [ J ]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11 : 449.
- [ 20 ] ZHANG H, CHEN Y A, CHEN Y P, et al. Comparison of the protective effects of resveratrol and pterostilbene against intestinal damage and redox imbalance in weanling piglets [ J ]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2020, 11 : 52.
- [ 21 ] CHEN X L, ZENG Z Y, HUANG Z Q, et al. Effects of dietary resveratrol supplementation on immunity, antioxidative capacity and intestinal barrier function in weaning piglets [ J ]. *Animal Biotechnology*, 2019, 24 : 1-6.
- [ 22 ] 文超越. 氧化应激对猪肌肉组织的损伤以及牛磺酸的缓解作用机制 [ D ]. 博士学位论文. 长沙: 湖南师范大学, 2019 : 11-14.
- WEN C Y. The damage of oxidative stress to pig muscle tissue and the mitigation mechanism of taurine [ D ]. Ph.D. Thesis. Changsha: Hunan Normal University, 2019 : 11-14. ( in Chinese )
- [ 23 ] ZHANG H, CHEN Y P, LI Y, et al. Medium-chain TAG attenuate hepatic oxidative damage in intra-uterine growth-retarded weanling piglets by improving the metabolic efficiency of the glutathione redox cycle [ J ]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112 ( 6 ) : 876-885.
- [ 24 ] CELI P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production [ J ]. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 2010, 39 ( Suppl. 1 ) : 348-363.
- [ 25 ] CAO S T, WU H, WANG C C, et al. Diquat-induced oxidative stress increases intestinal permeability, impairs mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets [ J ]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96 ( 5 ) : 1795-1805.
- [ 26 ] 胡瑶莲, 张恒志, 陈代文, 等. 白藜芦醇对生长育肥猪抗氧化能力、空肠黏膜免疫及结肠菌群的影响 [ J ]. *动物营养学报*, 2019, 31 ( 1 ) : 459-468.
- HU Y L, ZHANG H Z, CHEN D W, et al. Effects of resveratrol on antioxidant capacity, jejunal mucosal immunity and colonic flora in growing-finishing pigs [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 ( 1 ) : 459-468. ( in Chinese )
- [ 27 ] YANG G, XUE Y S, ZHANG H Y, et al. Favourable effects of grape seed extract on intestinal epithelial differentiation and barrier function in IL-10-deficient mice [ J ]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114 ( 1 ) : 15-23.
- [ 28 ] LIU J B, ZHANG Y, LI Y, et al. *L*-tryptophan enhances intestinal integrity in Diquat-challenged piglets associated with improvement of redox status and mitochondrial function [ J ]. *Animals*, 2019, 9 ( 5 ) : 266.
- [ 29 ] YANG G, BIBI S, DU M, et al. Regulation of the intestinal tight junction by natural polyphenols: a mechanistic perspective [ J ]. *Critical Reviews in Food Sci-*



- ence and Nutrition, 2017, 57(18):3830–3839.
- [30] SHIN D Y, LU J N, KIM G Y, et al. Anti-invasive activities of anthocyanins through modulation of tight junctions and suppression of matrix metalloproteinase activities in HCT-116 human colon carcinoma cells [J]. *Oncology Reports*, 2011, 25(2):567–572.
- [31] WANG N, HAN Q, WANG G, et al. Resveratrol protects oxidative stress-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by upregulating heme oxygenase-1 expression [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2016, 61(9):2522–2534.
- [32] ZHUANG Y, WU H R, WANG X X, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through pI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019:1–14.
- [33] CAO S T, SHEN Z J, WANG C C, et al. Resveratrol improves intestinal barrier function, alleviates mitochondrial dysfunction and induces mitophagy in Diquat challenged piglets [J]. *Food & Function*, 2019, 10(1):344–355.
- [34] MARTÍN A R, VILLEGA I, SÁNCHEZ-HIDALGO M, et al. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 147(8):873–885.
- [35] 张旭. 白藜芦醇对 LPS 诱导小鼠乳腺炎的作用及机制研究 [D]. 硕士学位论文. 长春: 吉林大学, 2019: 6–54.  
ZHANG X. Study on the effect and mechanism of resveratrol on LPS-induced mastitis in mice [D]. Master's Thesis. Changchun: Jilin University, 2019: 6–54. (in Chinese)
- [36] LEE E H, KIM S S, SEO S R. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits inflammatory signaling via expression of regulator of calcineurin activity 1 (RCAN1): anti-inflammatory mechanism of PDTC through RCAN1 induction [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 143:107–117.
- [37] WANG X X, FANG H, XU G, et al. Resveratrol prevents cognitive impairment in type 2 diabetic mice by upregulating *Nrf2* expression and transcriptional level [J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2020, 13:1061–1075.
- [38] FRAZIER T H, DIBASE J K, MCCLAIN C J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury [J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2011, 35(5S):14S–20S.
- [39] CHENG K, SONG Z H, LI S M, et al. Effects of resveratrol on intestinal oxidative status and inflammation in heat-stressed rats [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 85:102415.

# Effects of Resveratrol on Ileal Mucosal Morphology, Antioxidant Capacity, Tight Junction Protein and Inflammatory Factor mRNA Expression in Oxidative Stress Piglets

FU Qingyao<sup>1</sup> SHI Liguang<sup>2</sup> ZHOU Hanlin<sup>2</sup> CAO Ting<sup>2</sup> MA Zhonghua<sup>1</sup>  
JIANG Hongzheng<sup>1</sup> XUN Wenjuan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Crop Variety Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** The purpose of this experiment was to study resveratrol (Res) on the intestinal mucosal structure, antioxidant capacity, tight junction protein and inflammatory factor mRNA expression in oxidative stress piglets. Thirty 28-day-old three-way cross (Duroc×Landrace×Yorkshire) weaned piglets with good health and similar parity were selected and randomly divided into 5 groups, with 6 replicates in each group and 1 piglet in each replicate. The control group was fed a basal diet, and the experimental groups were intraperitoneally injected with Diquat+Res of 0, 10, 30 and 90 mg/kg were added to the basal diet, respectively. In the early morning of the 15th day of the experiment, the piglets in the experimental groups (Diquat group, Diquat + 10 mg/kg Res group, Diquat+30 mg/kg Res group and Diquat+90 mg/kg Res group) were intraperitoneally injected with Diquat at a dose of 10 mg/kg BW to establish an oxidative stress model, and the control group only injected the same dose of sterilized saline as a reference. The trial period was 21 days. The results showed that: compared with the control group, the villus height and the ratio of villus height/crypt depth (V/C) of the Diquat group were significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the crypt depth was significantly increased ( $P<0.05$ ); the content of malondialdehyde (MDA) increased significantly ( $P<0.05$ ), the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) were significantly reduced in intestinal mucosa ( $P<0.05$ ), intestinal mucosal interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) contents were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the intestinal mucosal interleukin-10 (IL-10) content was significantly decreased ( $P<0.05$ ); the relative expression levels of zonules atresia protein-1 (ZO-1), *Occludin* and transmembrane protein (*Claudin*) in the intestinal mucosa were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the Diquat group, the ileal villi height and V/C in the Diquat+30 mg/kg Res group and Diquat+90 mg/kg Res group were significantly increased ( $P<0.05$ ); the MDA content of the intestinal mucosa was significantly decreased ( $P<0.05$ ), GSH-Px and SOD activities were significantly increased ( $P<0.05$ ), among which the Diquat+90 mg/kg Res group had the most significant effect; intestinal mucosal ZO-1, *Occludin* and *Claudin* mRNA relative expression levels were all significantly increased ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference among different Res dose groups ( $P>0.05$ ); intestinal mucosal IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 contents were significantly reduced ( $P<0.05$ ), while IL-10 content was significantly increased ( $P<0.05$ ). In summary, Res can increase the activity of antioxidant enzymes in the ileum of oxidative stress piglets, improve the morphological structure of the ileal mucosa, inhibit the occurrence of intestinal inflammation and maintain intestinal health. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(2):1163-1172]

**Key words:** resveratrol; piglets; ileal mucosa; oxidative stress; intestinal health