

营养性复合添加剂缓解霉变玉米饲料对仔猪空肠黏膜结构的损伤

高亿清 陈代文 田 刚 郑 萍 虞 洁 毛湘冰

何 军 黄能金 余 冰*

(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: 本试验旨在研究营养性复合添加剂对采食含霉变玉米饲料断奶仔猪空肠黏膜结构与功能、氧化还原状态以及后肠微生物数量的影响。选用 18 头 26 日龄杜×长×大(DLY)断奶仔猪[(8.57±0.21) kg],随机分为 3 个组,每组 6 个重复,每个重复 1 头猪,分别饲喂对照组饲料、霉变玉米组饲料和霉变玉米+0.2%营养性复合添加剂饲料,试验期 30 d。结果发现:与对照组相比,霉变玉米极显著提高了断奶仔猪第 30 天血清二胺氧化酶(DAO)活性和空肠黏膜丙二醛(MDA)含量($P<0.01$),显著或极显著降低了空肠黏膜总抗氧化能力(T-AOC)($P<0.01$)、过氧化物歧化酶(SOD)($P<0.01$)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性($P<0.05$),以及盲肠和结肠中乳酸杆菌及盲肠总菌数量($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与霉变玉米组相比,霉变玉米+0.2%营养性复合添加剂显著或极显著降低了断奶仔猪第 30 天血清 DAO 活性($P<0.01$)和空肠黏膜 MDA 含量($P<0.05$),显著或极显著提高了空肠黏膜 GSH-Px 活性($P<0.01$)及咬合蛋白(occludin)($P<0.05$)、闭合小环蛋白(ZO-1)($P<0.01$)和溶质转运载体家族 7 成员 1(SLC7A1)mRNA 表达量($P<0.05$)。上述结果表明,霉变玉米饲料导致仔猪空肠通透性增加、抗氧化能力下降及后肠乳酸杆菌数量的降低,0.2%营养性复合添加剂可在一定程度缓解霉变玉米饲料对仔猪空肠结构的损伤和脂质过氧化。

关键词: 断奶仔猪;营养性添加剂;霉菌毒素;肠道

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2015)06-1813-10

玉米等饲料原料是霉菌生长的良好基质,其从田间生长到仓库储存都容易感染多种霉菌。霉菌会产生一系列的次级代谢产物——霉菌毒素,污染玉米等饲料原料。2014 年对来自全国 13 个省份的饲料原料及配合饲料的检测结果显示,霉菌毒素检出率高达 97.67%,检测到 3 种及以上霉菌毒素同时存在的样品比例高达 65.93%^[1]。研究表明,采食被霉菌毒素污染的饲料后,动物生产性能下降、免疫力降低、肝肾等脏器发生病变。肠道既是主要的消化器官,也是抵御经肠有害物

入侵机体的第一道防线,所面临的霉菌毒素浓度远高于其他组织,这会导致肠道氧化应激、破坏其结构完整性、影响营养物质的转运吸收等^[2-3]。因此,寻求一种有效缓解霉菌毒素对动物肠道损伤的措施显得尤为重要。已有研究报道,在霉菌毒素应激条件下分别添加精氨酸(Arg)和谷氨酰胺(Gln)等对断奶仔猪肠道具有明显的保护作用^[4-5]。但是有关多种营养性添加剂同时添加对采食含有自然霉变玉米饲料断奶仔猪肠道具有怎样的影响尚无报道。因此,本试验拟在含霉变玉

收稿日期:2015-01-20

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2012NZ0001);科技部成果转化项目(2012GB2F000399);四川省成果转化项目(2013NC0053)

作者简介:高亿清(1989—),女,四川遂宁人,硕士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: gyq5807224@126.com

* 通信作者:余 冰,教授,博士生导师,E-mail: ybingtian@163.com

米饲粮中添加以维生素 C(VC)、维生素 E(VE) 和 Gln 等为主要成分的营养性复合添加剂,从断奶仔猪空肠结构功能完整性、氧化还原状态和后肠微生物生态平衡 3 个方面考察营养性复合添加剂对采食含自然霉变玉米饲粮断奶仔猪肠道的保护作用。

1 材料与方法

1.1 霉变玉米的制备

将正常玉米水分提高到 20%左右,置于 28 ℃左右的环境中使其自然霉变。霉变结束后混合均匀于 4 ℃避光保存,并检测其毒素含量。

1.2 试验设计

试验采用单因子设计,选取初始体重为(8.57±0.21) kg 的 26 日龄健康杜×长×大(DLY)断奶仔猪 18 头,按照体重相近、公母各占 1/2 的原则随机分为 3 个组,每组 6 个重复,每个重复 1 头猪,分别饲喂对照组(基础)饲粮、霉变玉米组饲粮和霉变玉米+0.2% 营养性复合添加剂饲粮。试验期 30 d。

1.3 试验饲粮

基础饲粮参照 NRC(2012)7~11 kg 仔猪营养需要配制而成,其组成及营养水平见表 1。霉变玉米组饲粮采用自然霉变玉米 100%替代基础饲粮中的玉米,霉变玉米+添加剂组饲粮在霉变玉米饲粮的基础上添加 0.2%的营养性复合添加剂(添加剂添加量等量替代玉米)。各组饲粮主要霉菌毒素种类和含量见表 2。

本试验所使用的营养性复合添加剂成分及含量(在全价料中添加量)如下:酵母硒0.15 mg/kg、VE 30 mg/kg、VC 100 mg/kg、糖萜素 30 mg/kg、酵母细胞壁 50 mg/kg、黄芪多糖 50 mg/kg、Gln 20 mg/kg和丁酸钠 200 mg/kg。

1.4 饲养管理

试验前对圈舍进行清扫消毒。试验仔猪于每天 08:00、12:00、16:00 和 20:00 进行饲喂,每次以吃饱后料槽中略有余料为度。试验期间猪只采用自由饮水。试验期间圈内温度控制在 26~28 ℃。

1.5 样品采集

1.5.1 血清

每头仔猪空腹 12 h 后于试验第 14 和 30 天

08:00,前腔静脉采血 15 mL,室温静置 10 min,4 000 r/min离心 15 min,分离血清,待测二胺氧化酶(DAO)活性。

表 1 基础饲粮组成及营养水平(饲喂基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (as-fed basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	55.40
膨化大豆 Extruded soybean	11.00
豆粕 Soybean meal	10.00
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	6.00
鱼粉 Fish meal	4.00
低蛋白乳清粉 Low protein whey powder	6.00
蔗糖 Sugar	3.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.14
食盐 NaCl	0.20
大豆油 Soybean oil	2.00
石粉 Limestone	0.73
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.66
L-赖氨酸盐酸盐 L-Lys · HCl	0.34
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.04
L-苏氨酸 L-Thr	0.11
L-色氨酸 L-Trp	0.03
预混料 Premix ¹⁾	0.35
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
消化能 DE/(MJ/kg)	14.89
粗蛋白质 CP	20.00
钙 Ca	0.80
总磷 TP	0.58
有效磷 AP	0.40
可消化赖氨酸 DLys	1.25
可消化蛋氨酸 DMet	0.34
可消化苏氨酸 DThr	0.78
可消化色氨酸 DTry	0.23
可消化异亮氨酸 DIle	0.69

¹⁾ 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 10 000 IU, VE 20.0 IU, VK₃ 1 mg, VB₂ 3.7 mg, VB₆ 3.0mg, VB₁₂ 0.03 mg, 烟酸 nicotinic acid 20 mg, 泛酸 pantothenic acid 15 mg, 叶酸 folic acid 0.5 mg, 生物素 biotin 0.1 mg, Fe 100 mg, Cu 150 mg, Mn 10 mg, Zn 120 mg, Se 0.3 mg, I 0.3 mg。

²⁾ 营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

表 2 饲料中主要霉菌毒素含量(饲喂基础)

Table 2 Main mycotoxin contents in diets (as-fed basis)

μg/kg

项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	限量标准 Limit standard
黄曲霉毒素 B ₁ AFB ₁	10.00	84.40	20.00
呕吐毒素 DON	58.70	54.20	1 000.00
玉米赤霉烯酮 ZEN	157.90	181.80	500.00
T-2 毒素 T-2	128.80	176.10	1 000.00

1.5.2 空肠黏膜

试验第 30 天早上麻醉后屠宰仔猪,剖开腹腔取空肠前段,用预冷生理盐水冲洗肠腔直至液体清亮,用手术剪剖开肠管,在生理盐水中轻轻摆动肠段,清洗干净后用滤纸小心吸干黏膜表面多余的水分,用灭菌载玻片刮取黏膜于灭菌冻存管中,投入液氮中速冻后-80℃保存待测。

1.5.3 盲肠和结肠食糜

试验第 30 天早上称重采血后屠宰。屠宰后立即结扎肠道,取下盲肠、结肠在冰面上收集食糜,分装于灭菌的冻存管中,投入液氮中速冻后-80℃保存待测菌群数量。

1.6 考察指标及方法

1.6.1 血清 DAO 活性

采用酶联免疫吸附法测定血清 DAO 活性,试剂盒购于荷兰 Biocheck 公司,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。试剂盒检测范围:7~260 U/L。

1.6.2 空肠黏膜氧化还原状态

空肠黏膜匀浆制备:称取 0.7 g 左右黏膜,按照重量(g):体积(mL)=1:9 加入预冷生理盐水,冰浴条件手动匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清待测。

空肠黏膜丙二醛(MDA)含量,总抗氧化能力(T-AOC),超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性采用比色法测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。使用 UV-1100 紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司)进行比色。

1.6.3 肠道紧密连接蛋白和养分转运载体基因 mRNA 表达量

采用实时 PCR(RT-PCR)技术检测空肠黏膜闭合小环蛋白(*zonula-1*, *ZO-1*)、咬合蛋白(*occlu-*

din)、钠-葡萄糖共转运载体 1(Na^+ -dependent glucose transporter 1, *SGLT-1*)、溶质转运载体家族 7 成员 7(solute carrier family 7 member 7, *SLC7A7*)和溶质转运载体家族 7 成员 1(solute carrier family 7 member 1, *SLC7A1*) mRNA 表达量。组织中总 mRNA 的提取和质量检测参照陈渝^[6]的方法进行。cDNA 的合成采用试剂盒(PrimeScript™ reagent kit, TaKaRa, 日本)进行,具体操作步骤参照说明书进行。登陆 NCBI 获得目的基因 CDS 序列,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,在 NCBI 中进行 Blast 比对引物特异性,筛选出特异性好的引物序列进行合成(上海英骏生物科技有限公司),引物序列及退火温度见表 3。RT-PCR 反应体系为 10 μL:5 μL SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本),上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 3 μL。PCR 扩增条件为:95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 最佳退火温度 30 s, 40 个循环, 95℃ 10 s。熔解曲线:65~95℃, 温度以 0.5℃/s 提升。以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参基因,相对荧光定量计算方法采用^{ΔΔ}CT 法计算得来^[6]。

1.6.4 食糜微生物数量

采用 RT-PCR 技术测定盲肠和结肠食糜中大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和总菌数量^[7]。食糜 DNA 提取采用试剂盒进行(Omega, 美国)。Real-MasterMix(Probe)购于北京天根生化科技有限公司。大肠杆菌、乳酸杆菌反应体系:1 μL Probe Ehane Solution, 8 μL RealMaterMix, 上、下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 探针 0.3 μL 和 ddH₂O 7.7 μL; 双歧杆菌反应体系:1 μL Probe Ehane Solution, 8 μL RealMaterMix, 上、下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 探针 0.8 μL 和 ddH₂O 7.2 μL; PCR 条件:95℃ 10 s, 95℃ 5 s, 最佳退火温度 25 s, 50 个循环, 95℃ 10 s。总菌反应体系:12.5 μL SYBR Premix Ex Taq™ II, 上、下游引物

各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 9.5 μL; PCR 条件: 95 ℃ 10 s, 95 ℃ 5 s, 最佳退火温度 25 s, 40 个循环, 95 ℃ 10 s。熔解曲线: 65 ~ 95 ℃, 温度以 0.5 ℃/s 提升。

1.7 数据处理
采用 SAS 8.2 统计软件 GLM 过程对试验数据进行单因素方差分析, 并用 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。

表 3 RT-PCR 基因引物序列及退火温度
Table 3 Sequences of primers and annealed temperature used for RT-PCR

项目 Items	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物长度 Product length/bp	退火温度 Annealed temperature/℃
闭合小环蛋白 ZO-1	上游: CGTGTCAACGCCACTATCA 下游: TTGCTCTCCAAAGCCCCT	148	61.5
咬合蛋白 occludin	上游: AACTTCCACTGATGTCCCCCGT 下游: CCTAGACTTTCCTGCTCTGCCC	138	61.5
钠-葡萄糖转运载体 1 SGLT1	上游: GCAACAGCAAAGAGGAGCGTAT 下游: GCCACAAAACAGGTCATAGGTC	95	61.5
溶质转运载体家族 7 成员 7 SLC7A7	上游: TTTGTTATGCGGAACTGG 下游: AAAGGTGATGGCAATGAC	155	61.5
溶质转运载体家族 7 成员 1 SLC7A1	上游: TGCCCATACTTCCCGTCC 下游: GGTCCAGGTTACCGTCAG	192	61.5
总菌 Total bacteria	上游: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 下游: ATTACCGCGGCTGCTGG	200	66.2
大肠杆菌 Escherichia coli	上游: CATGCCGCGTGTATGAAGAA 下游: CGGGTAACGTCAATGAGCAAA 探针: AGGTATTAACTTTACTCCCTTCCTC	96	60.4
乳酸杆菌 Lactobacillus	上游: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC 下游: CAACAGTTACTCTGACACCCGTTCTTC 探针: AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTT	121	53
双歧杆菌 Bifidobacterium	上游: CGCGTCCGGTGTGAAAG 下游: CTTCCCGATATCTACACATTCCA 探针: ATTCCACCGTTACACGGGAA	126	59.3

2 结 果

2.1 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪空肠结构和功能的影响

2.1.1 血清 DAO 活性

由表 4 可知, 在试验第 14 天, 各组间断奶仔猪血清 DAO 活性无显著差异 ($P>0.05$); 在试验第 30 天, 霉变玉米组仔猪血清 DAO 活性极显著高于对照组 ($P<0.01$), 而霉变玉米+添加剂组仔猪血清 DAO 活性极显著低于霉变玉米组 ($P<0.01$), 与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。

2.1.2 紧密连接蛋白 mRNA 表达

由表 5 可知, 与对照组相比, 霉变玉米组 *occludin* 和 *ZO-1* mRNA 表达量下调, 但差异不显著 ($P>0.05$); 与霉变玉米组相比, 霉变玉米+添加剂组 *occludin* ($P<0.05$) 和 *ZO-1* mRNA 表达量 ($P<0.01$) 显著或极显著上调。

2.1.3 养分转运载体 mRNA 表达

由表 6 可知, 与对照组相比, 霉变玉米组 *SGLT1*、*SLC7A7* 和 *SLC7A1* mRNA 表达量降低, 但差异不显著 ($P>0.05$); 与霉变玉米组相比, 霉变玉米+添加剂组 *SGLT1* ($P>0.05$)、*SLC7A7* ($P>0.05$) 和 *SLC7A7* mRNA 表达量 ($P<0.05$) 不同程度的提高。

表 4 不同处理对断奶仔猪血清 DAO 活性的影响					
Table 4 Effects of different treatments on serum DAO activity in weaned piglet					U/L
项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	霉变玉米+添加剂组 Contaminated corn+ additive group	SEM	P 值 P-value
第 14 天 Day 14	173.76	168.64	169.90	5.39	0.79
第 30 天 Day 30	177.15 ^{Bb}	225.08 ^{Aa}	191.61 ^{Bb}	7.59	0.01
同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 肩标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 significant difference ($P<0.01$). The same as below.					

表 5 不同处理对断奶仔猪空肠黏膜 occludin 和 ZO-1 mRNA 表达的影响					
Table 5 Effects of different treatments on mRNA expression of jejunum mucosa occludin and ZO-1 in weaned piglet					
项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	霉变玉米+添加剂组 Contaminated corn+ additive group	SEM	P 值 P-value
咬合蛋白 occludin	1.00 ^{ab}	0.83 ^b	1.57 ^a	0.19	0.04
闭合小环蛋白 ZO-1	1.00 ^{ABab}	0.77 ^{Bb}	1.23 ^{Aa}	0.08	0.01

表 6 不同处理对断奶仔猪空肠黏膜养分转运载体 mRNA 表达的影响					
Table 6 Effects of different treatments on mRNA expression of jejunum mucosa transporters in weaned piglet					
项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	霉变玉米+添加剂组 Contaminated corn+ additive group	SEM	P 值 P-value
钠-葡萄糖共转运载体 1 SGLT1	1.00	0.37	1.13	0.39	0.37
溶质转运载体家族 7 成员 7 SLC7A7	1.00	0.83	1.35	0.17	0.11
溶质转运载体家族 7 成员 1 SLC7A1	1.00 ^{ab}	0.49 ^b	1.79 ^a	0.28	0.02

2.2 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪空肠黏膜抗氧化能力的影响

由表 7 可知,与对照组相比,霉变玉米极显著提高了空肠黏膜 MDA 含量 ($P<0.01$),显著或极显著降低了 T-AOC ($P<0.01$)、SOD ($P<0.01$) 和 GSH-Px 活性 ($P<0.05$),但是对 CAT 活性无显著影响 ($P>0.05$);与霉变玉米组相比,霉变玉米+添加剂显著降低了 MDA 含量 ($P<0.05$),极显著提高了 GSH-Px 活性 ($P<0.01$),但是对 T-AOC 及

SOD 和 CAT 活性无显著影响 ($P>0.05$)。

2.3 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪后肠微生物数量的影响

由表 8 可知,与对照组相比,霉变玉米显著降低了盲肠食糜中乳酸杆菌和总菌数量 ($P<0.05$),极显著降低了结肠食糜中乳酸杆菌数量 ($P<0.01$),对其他微生物数量无显著影响 ($P>0.05$);与霉变玉米组相比,霉变玉米+添加剂对盲肠和结肠食糜中各微生物数量均无显著影响 ($P>0.05$)。

表 7 不同处理对断奶仔猪空肠黏膜氧化还原状态的影响

Table 7 Effect of different treatments on jejunum mucosa redox status in weaned piglet

项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	霉变玉米+添加剂组 Contaminated corn+ additive group	SEM	P 值 P-value
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.28 ^{Bc}	0.52 ^{Aa}	0.41 ^{Ab}	0.03	0.01
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)	0.29 ^{Aa}	0.14 ^{Bb}	0.14 ^{Bb}	0.03	0.01
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	123.66 ^{Aa}	89.22 ^{Bb}	101.57 ^{ABab}	5.44	0.01
过氧化氢酶 CAT/(U/mg prot)	5.09	4.60	3.80	0.46	0.19
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)	8.19 ^{ABb}	6.59 ^{Bc}	9.83 ^{Aa}	0.44	0.01

表 8 不同处理对断奶仔猪肠道菌群数量的影响

Table 8 Effect of different treatments on intestinal number flora in weaned piglet

lg(CFU/g)

项目 Items	对照组 Control group	霉变玉米组 Contaminated corn group	霉变玉米+添加剂组 Contaminated corn+ additive group	SEM	P 值 P-value
盲肠食糜 Caecum chyme					
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	7.48	8.04	7.76	0.55	0.78
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	8.70 ^{Aa}	8.17 ^{ABb}	8.00 ^{Bb}	0.15	0.01
双歧杆菌 <i>Bifidobacterum</i>	2.90	2.67	2.91	0.25	0.76
总菌 <i>Total bacteria</i>	13.61 ^a	13.30 ^b	13.29 ^b	0.08	0.02
结肠食糜 Colon chyme					
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	7.63	7.87	7.76	0.50	0.94
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	9.45 ^{Aa}	8.82 ^{Bb}	8.93 ^{ABb}	0.13	0.01
双歧杆菌 <i>Bifidobacterum</i>	2.94	2.57	3.23	0.29	0.32
总菌 <i>Total bacteria</i>	13.47	13.43	13.54	0.07	0.49

3 讨 论

3.1 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪空肠黏膜结构和功能的影响

动物饲料原料及配合饲料因霉菌毒素污染对畜禽的危害一直是畜牧养殖业所关注的重点。前人的调查发现,霉菌毒素污染呈现 2 个特点:一是污染普遍,检出率高;二是多种霉菌毒素同时存在。本试验所使用的自然霉变玉米主要遭受黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 污染,同时也含有玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON) 和 T-2 毒素。不仅如此,在对照组饲料中也检测到了 AFB₁、ZEN、DON 和 T-2 毒素,但是均没有超过限量标

准。采食被霉菌毒素污染的饲料会破坏动物肠道正常的结构,增加肠上皮细胞通透性,破坏肠道的正常生理功能^[8]。DAO 是所有哺乳动物肠绒毛中的细胞内酶,生理状态下血清中的活性很低,其活性是衡量肠道机械屏障的完整性和损伤程度的敏感性指标^[9]。有研究报道,采食被 DON 污染的饲料后显著提高了仔猪血清 DAO 活性,降低了十二指肠和空肠 DAO 的活性^[10]。本研究发现,在试验第 30 天霉变玉米组断奶仔猪血清 DAO 活性显著升高,说明采食霉变玉米后造成仔猪肠道上皮细胞受损,细胞内 DAO 透过肠黏膜进入血液。紧密连接是由 ZO-1、完整的跨膜蛋白等组成,可以封闭细胞间的间隙。大量研究发现,霉菌毒素对

ZO-1、occludin 和 claudin 的表达具有不同程度的抑制作用^[11-13]。本研究发现,霉变玉米组具有下调断奶仔猪空肠黏膜 ZO-1 和 occludin mRNA 表达的趋势。以上研究结果表明,霉菌毒素可以破坏肠道上皮的通透性且不同程度下调紧密连接蛋白的表达。小肠是消化吸收营养物质的主要部位,肠上皮结构的完整是确保营养物质消化吸收的前体条件。伴随着霉菌毒素对肠道结构完整性的破坏,肠道功能又会发生怎样的改变呢?养分转运载体主要分布于小肠刷状缘上,与小肠绒毛高度成正比。体内、外研究表明,霉菌毒素显著下调小肠葡萄糖转运载体 (SGLT1、GLUT2) 和氨基酸转运载体 (SLC7A7、SLC7A1) mRNA 表达^[4-5,7,14],影响营养物质的转运吸收。本研究也发现,采食含自然霉变玉米饲料后,断奶仔猪空肠黏膜 SGLT1、SLC7A7 和 SLC7A1 mRNA 表达出现不同程度下调,说明在本试验条件下,采食含霉菌毒素饲料会影响空肠对葡萄糖和氨基酸的吸收。

前人研究表明,在应激条件下添加单一或者2种营养性添加剂对动物肠道结构和功能具有一定的保护作用。饲料中添加 Arg 可以抑制脂多糖应激仔猪肠道上皮细胞凋亡,缓解肠绒毛萎缩和形态改变,维持小肠结构的完整性^[15-16]。霉菌毒素应激仔猪饲料中添加 Arg 和 Gln 显著提高氨基酸转运载体的基因表达量,提高仔猪对氨基酸的利用率^[4,17]。本研究发现,霉变饲料中添加 0.2% 营养性复合添加剂可极显著降低仔猪第 30 天血清 DAO 活性,提高 occludin 和 ZO-1 以及 SGLT1、SLC7A7 和 SLC7A1 mRNA 表达量。这表明,本试验所用营养性复合添加剂可以缓减霉菌毒素对肠上皮结构与养分转运功能的损伤。其可能原因在于,Gln 是肠黏膜细胞代谢必需的营养物质,在霉菌毒素应激条件下肠黏膜细胞内 Gln 很快耗竭,本研究所用的营养性复合添加剂为肠黏膜细胞提供了充足的 Gln。此外,添加剂中的丁酸钠也可为肠上皮细胞提供快速能量来源,而糖萜素具有促进蛋白质合成和小肠细胞发育的功能,有利于肠黏膜快速修复保护其结构和功能完整性。硒作为体内重要的无机微量元素主要参与 GSH-Px 等抗氧化酶的形成。VC 和 VE 能够清除机体产生的自由基,有研究称它们之间具有协同作用,即 VE 主要负责与自由基反应,然后在 VC 的作用下,携带自由基的 VE 实现再生^[18]。从前人和本研究结果

可以发现,霉菌毒素可通过氧化应激损伤动物机体。本试验所用的营养性复合添加剂中的 VC、VE、酵母硒可提高仔猪空肠黏膜小分子抗氧化剂含量和抗氧化酶活性,缓解霉菌毒素引起的肠道氧化损伤。 α -甘露聚糖和 β -葡聚糖是广泛存在于酵母细胞壁中的 2 种多糖,它们可通过吸附作用减少肠道对霉菌毒素的吸收,从而减少霉菌毒素对动物肠道的破坏^[19]。

3.2 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪空肠黏膜抗氧化能力的影响

前人研究表明,霉菌毒素损伤会产生大量自由基,造成细胞膜和细胞器膜脂质过氧化反应引起氧化应激^[20]。本研究发现,采食含霉变玉米饲料后仔猪空肠黏膜脂质过氧化产物 MDA 含量极显著升高,而 T-AOC 及 SOD 和 GSH-Px 活性显著下降,说明霉菌毒素可能通过影响空肠黏膜抗氧化系统,损伤抗氧化能力,导致脂质过氧化增加进而破坏黏膜结构。为了抵抗氧化损伤,机体形成了一套抗氧化体系,包括小分子的非酶系统 (VC、VE 和谷胱甘肽) 和大分子的酶系统 (GSH-Px 和 SOD)^[21]。本试验发现,添加试验所用复合添加剂可显著降低空肠黏膜 MDA 含量且提高 GSH-Px 活性。原因可能与复合添加剂中所含小分子抗氧化剂有关 (VC 和 VE)。同时,Gln 还可能作为合成体内重要非酶性抗氧化剂谷胱甘肽的前体物质,参与机体抗氧化反应。此外,添加剂中酵母硒和黄芪多糖均具有良好的抗氧化作用。Wang 等^[22]发现,硒显著提高 AFB₁ 引起的肉鸡脾脏 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性下降。黄芪多糖能够缓解黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶引起的心肌细胞氧化损伤^[23]。

3.3 自然霉变玉米及营养性复合添加剂对断奶仔猪后肠微生物数量的影响

动物健康与其肠道微生物息息相关,一旦肠道微生物平衡遭到破坏将给动物健康带来不利影响。80% DON、ZEN 和 AFB₁ 等毒素在十二指肠以及空肠前段被吸收,未被吸收的毒素进入后肠增加致病菌的定植,破坏肠道微生物平衡^[8]。采食霉菌毒素后显著提高了断奶仔猪肠道中大肠杆菌的数量^[24]。赭曲霉毒素显著提高了蛋鸡肠道内沙门氏菌数量^[25]。本试验研究发现,采食霉变玉米饲料显著降低了断奶仔猪盲肠和结肠食糜中乳酸杆菌数量以及盲肠食糜中总菌数量。可能与乳

酸杆菌具有吸附霉菌毒素的作用有关。前人研究发现,鼠李糖乳酸杆菌 GG 吸附 AFB₁ 的同时,其对肠道的黏附能力由 30% 下降至 5%^[26],进而有利于吸附有 AFB₁ 的乳酸杆菌排出体外,减少 AFB₁ 对肠道的损伤。同时,本试验发现营养性复合添加剂的添加对所检测肠道微生物无显著影响。可能原因在于试验所用复合添加剂主要是通过增强仔猪机体抗氧化能力和肠道细胞营养,促进霉菌毒素应激条件下断奶仔猪肠道的自我修复而发挥作用,但是营养性复合添加剂中具有吸附作用的酵母细胞壁含量较少,以至于未被肠道吸收的霉菌毒素随食糜进入后肠,进而产生与霉变玉米组类似的效应。

4 结 论

① 霉变玉米饲粮导致仔猪空肠通透性增加、抗氧化能力下降及后肠乳酸杆菌数量的降低。

② 添加 0.2% 营养性复合添加剂对采食含霉变玉米饲粮断奶仔猪空肠结构具有一定的保护作用。

参考文献:

- [1] 杜妮.2014 年 1-6 月全国饲料及原料霉菌毒素污染及调查报告[J].中国动物保健,2014,16(9):63-66.
- [2] GIRISH C K, SMITH T K. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium mycotoxins* on small intestinal morphology of turkeys[J]. Poultry Science, 2008, 87(6): 1075-1082.
- [3] AWAD W A, BÖHM J, RAZZAZI-FAZELI E, et al. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2006, 85(6): 974-979.
- [4] YIN J, REN W K, DUAN J L, et al. Dietary arginine supplementation enhances intestinal expression of *SLC7A7* and *SLC7A1* and ameliorates growth depression in mycotoxin-challenged pigs[J]. Amino Acids, 2014, 46(4): 883-892.
- [5] DUAN J L, YIN J, WU M M, et al. Dietary glutamate supplementation ameliorates mycotoxin-induced abnormalities in the intestinal structure and expression of amino acid transporters in young pigs[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112357.
- [6] 陈渝.精氨酸对免疫应激断奶仔猪细胞膜表面 TLRs 基因表达的影响及作用途径研究[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2012.
- [7] 雷晓娅.自然霉变玉米及甘露寡糖对仔猪生长性能和肠道健康的影响[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2011.
- [8] GRENIER B, APPLGATE T J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals[J]. Toxins, 2013, 5(2): 396-430.
- [9] NAMIKAWA T, FUKUDOME I, KITAGAWA H, et al. Plasma diamine oxidase activity is a useful biomarker for evaluating gastrointestinal tract toxicities during chemotherapy with oral fluorouracil anti-cancer drugs in patients with gastric cancer[J]. Oncology, 2012, 82(3): 147-152.
- [10] WU M M, XIAO H, REN W K, et al. Therapeutic effects of glutamic acid in piglets challenged with deoxynivalenol[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e100591.
- [11] DIESING A K, NOSSOL C, PANTHER P, et al. Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular responses in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-2[J]. Toxicology Letters, 2011, 200(1/2): 8-18.
- [12] PONTON P, BRICU C, NOUGAYREDE J P, et al. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism[J]. The Journal of Nutrition, 2010, 140(11): 1956-1962.
- [13] DE WALLE J V, SERGENT T, PIRONT N, et al. Deoxynivalenol affects *in vitro* intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 245(3): 291-298.
- [14] AWAD W A, ASCHENBACH J R, SETYABUDI F M C S, et al. *In vitro* effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens[J]. Poultry Science, 2007, 86(1): 15-20.
- [15] LIU Y L, HUANG J J, HOU Y Q, et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs[J]. British Journal of Nutrition, 2008, 100(3): 552-560.
- [16] ZHU H L, LIU Y L, XIE X L, et al. Effect of L-arginine on intestinal mucosal immune barrier function in

- weaned pigs after *Escherichia coli* LPS challenge[J]. *Innate Immunity*, 2013, 19(3):242-252.
- [17] WU L, WANG W, YAO K, et al. Effects of Dietary arginine and glutamine on alleviating the impairment induced by deoxynivalenol stress and immune relevant cytokines in growing pigs [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69502.
- [18] PACHER J E, SLATER T F, WILLSON R L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C [J]. *Nature*, 1979, 278(5706):737-738.
- [19] KOGAN G, KOCHER A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection [J]. *Livestock Science*, 2007, 109(1/2/3):161-165.
- [20] OSSELAERE A, SANTOS R, HAUTEKIET V, et al. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69014.
- [21] LYKKESFELDT J, SVENDSEN O. Oxidants and antioxidants in disease; oxidative stress in farm animals [J]. *The Veterinary Journal*, 2007, 173(3):502-511.
- [22] WANG F Y, SHU G, PENG X, et al. Protective effects of sodium selenite against aflatoxin B₁-induced oxidative stress and apoptosis in broiler spleen [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2013, 10(7):2834-2844.
- [23] 孙成文, 江岩, 钟国赣, 等. 黄芪多糖抗氧化损伤作用的研究 [J]. *中国药理学通报*, 1996, 12(2):161-163.
- [24] OSWALD I P, DESAUTELS C, LAFFITTE J, et al. Mycotoxin fumonisin B₁ increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10):5870-5874.
- [25] FUKATA T, SASAI K, BABA E, et al. Effect of ochratoxin A on *Salmonella typhimurium*-challenged layer chickens [J]. *Avian Diseases*, 1996, 40(4):924-926.
- [26] KANKAANPÄÄP, TUOMOLA E, EL-NEZAMI H, et al. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model [J]. *Journal of Food Protection*, 2000, 63(3):412-414.

Nutritional Compound Additive Alleviates Jejunal Mucosal Structure Disruption of Piglets Challenged with Feed Containing Corn Contaminated with Mycotoxins

GAO Yiqing CHEN Daiwen TIAN Gang ZHENG Ping YU Jie MAO Xiangbing
HE Jun HUANG Nengjin YU Bing*

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

Abstract: This experiment was conducted to study the protective effects of nutritional compound additive on jejunal mucosal structure and function, redox status and the numbers of bacteria in caecum and colon content of weaned piglets challenged-with feed contained corn naturally contaminated with mycotoxins. Eighteen “Duroc×Landrace×Large White” piglets were randomly allocated to control group, naturally contaminated corn group and naturally contaminated corn+0.2% nutritional compound additive group (6 replicates per group and 1 piglet per replicate). The trial lasted for 30 d. The results showed that corn naturally contaminated with mycotoxins significantly increased the serum diamine oxidase (DAO) activity on day 30 ($P<0.01$) and the content of methane dicarboxylic aldehyde (MDA) in jejuna mucosa ($P<0.01$), significantly decreased total antioxidation capability (T-AOC) ($P<0.01$), superoxide dismutase (SOD) ($P<0.01$) and glutathione peroxidase (GSH-Px) ($P<0.05$) activities in jejuna mucosa, as well as the number of *Lactobacillus* in caecum and colon chyme and the number of total bacteria in caecum chyme compared to the control group ($P<0.05$). The 0.2% nutritional compound additive significantly decreased the serum DAO activity ($P<0.01$) and the content of MDA in jejuna mucosa ($P<0.05$), significantly increased GSH-Px activity in jejuna mucosa ($P<0.01$), and significantly up-regulated the mRNA expression of jejunal *occludin* ($P<0.05$), *zonula-1* (*ZO-1*) ($P<0.01$) and solute carrier family 7 member 1 (*SLC7A1*) ($P<0.05$), in comparison with the corn naturally contaminated with mycotoxins group. Collectively, these results indicate that dietary mycotoxins can increase the intestinal permeability, and decrease the antioxidant capacity of jejunum mucosa and the numbers of *Lactobacillus* in caecum and colon contents. Meanwhile, dietary supplementation with 0.2% nutritional compound additive can alleviate the damage of jejuna mucosal structure and lipid peroxidation of jejunum in piglets fed mold-contaminated feeds, in a certain degree. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(6):1813-1822]

Key words: weaned piglets; nutritional additive; mycotoxins; jejunum