

# 早期断奶对仔猪肠通透性和肠上皮紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达的影响

刘海萍 胡彩虹\* 徐 勇

(浙江大学动物科学学院, 浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

**摘 要:** 本文旨在研究早期断奶仔猪的肠通透性变化并探讨其机制。试验采用 32 头 21 日龄断奶仔猪, 并于仔猪 21、28 和 35 日龄取样测定血浆 D-乳酸含量、二胺氧化酶(DAO)活性和尿中乳果糖/甘露醇比率观察肠通透性改变, 同时检测肠上皮紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达水平。结果显示: 与断奶前相比, 28 日龄时血浆 D-乳酸含量、DAO 活性和乳果糖/甘露醇比差异达到显著水平( $P < 0.05$ ), 且至 35 日龄时, 肠道仍然维持这种较高的通透性; 仔猪断奶后 Occludin mRNA 相对表达量下降明显, 与断奶前相比差异显著( $P < 0.05$ ), 35 日龄时, 表达量有所恢复, 但仍然低于断奶前表达水平。试验结果提示, 早期断奶后仔猪肠道的通透性增加, 肠屏障功能破坏, 可能归因于肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达下降。

**关键词:** 早期断奶; 仔猪; 肠通透性; 紧密连接; Occludin

随着养猪生产向集约化和规模化方向发展, 为提高母猪的繁殖利用率, 在生产中普遍采用早期断奶技术。通过将常规断奶时间从 35~42 d 提早到 28 d 或更早, 可使母猪的年产胎数和猪场的生产效率提高 5%~10%。但是, 仔猪断奶后受心理、环境、营养应激等因素的影响, 易造成仔猪断奶后消化、吸收和免疫机能的损伤, 进而引起食欲下降、消化不良、腹泻、生长受阻等所谓“仔猪早期断奶综合症”, 给养猪业带来巨大经济损失<sup>[1-3]</sup>。

已有较多研究报道早期断奶会引起仔猪肠形态发生变化, 绒毛高度下降, 隐窝深度加深, 肠绒毛上成熟细胞数量减少, 从而造成仔猪肠道消化吸收面积减少, 消化能力下降<sup>[4-7]</sup>。然而关于早期断奶引起仔猪肠屏障通透性变化的报道却较少, Occludin 是一种跨膜蛋白, 4 个跨膜结构将 Occludin 分为 2 个细胞外环和 2 个细胞内环, Occludin 主要集中于紧密连接纤维内, 有一小部分 Occludin 沿着细胞侧膜分布而不进入纤维内, 其功能维持关系到紧密连接的完整性。哺乳动物细胞间紧密连接位于细胞侧壁的顶部, 分隔细胞顶面与基侧面, 防止上皮细胞间隙中的物质溢出和大分子在细胞间隔中穿行, 当前对其研究主要集中在医学方面<sup>[8-9]</sup>。本文研究了早期断奶对仔猪肠通透性影响, 同时通过检测肠上皮细

胞间紧密连接蛋白 Occludin mRNA 的表达来探讨相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Trizol、反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 和割胶回收试剂盒均购自上海生工。pGEM-T Easy Vector 试剂盒和质粒抽提试剂盒等均购自 Promega 公司。受体菌为大肠杆菌 top10, 由浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室提供。

### 1.2 试验动物与试验设计

试验选取体况相似、胎次和预产期接近的同品种母猪 6 窝, 母猪均为第 3 胎, 产仔数为 9~11 头, 哺乳期内为保证各窝仔猪生长, 同窝内仔猪调整乳头以保证充分利用母猪泌乳力。生产后仔猪哺乳至 21 日龄断奶, 仔猪均为杜长大三元杂交品种。断奶时间为断奶当日晚 20:00~21:00。断奶时, 赶走母猪, 仔猪仍留在原处, 试验仔猪 7 日龄开始诱食, 断奶后按照体重相近、公母各占 1/2 的方法选取 32 头断奶仔猪, 平均体重为  $(5.9 \pm 0.3)$  kg, 饲喂基础日粮至 35 日龄, 仔猪自由采食和饮水。

### 1.3 试验日粮

基础日粮参照美国 NRC(1998 版)断奶仔猪的

收稿日期: 2008-02-20

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y306028), 浙江省教育厅重点项目(20061322)

作者简介: 刘海萍(1982-), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事动物分子营养学研究。E-mail: haipingliu1002@163.com

\* 通讯作者: 胡彩虹, 博士, 副研究员, E-mail: chhu@zju.edu.cn

营养需要配合成颗粒饲料。配方及主要营养水平见表 1。

表 1 基础日粮配方及营养水平(风干基础)

Table 1 Ingredients and nutrient levels of basal diet	
(air-dry basis, %)	
项目 Items	含量 Content
组成 Ingredients	
玉米 Corn	58.00
豆粕 Soybean meal	17.00
膨化全脂大豆 Extruded full-fat soybean	7.00
鱼粉 Fish meal	4.50
乳清粉 Dried whey	4.50
次粉 Wheat middling	5.00
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.50
食盐 NaCl	0.25
石粉 Limestone	1.10
复合维生素-微量元素预混料 Vitamin-mineral premix <sup>1)</sup>	1.00
L-赖氨酸盐酸盐 L-lysine · HCl	0.15
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
消化能 DE(MJ/kg) <sup>2)</sup>	13.90
粗蛋白质 CP	20.10
钙 Ca	0.90
总磷 TP	0.75
赖氨酸 Lys	1.12
蛋氨酸+胱氨酸 Met + Cys	0.65

<sup>1)</sup> 预混料向每千克饲料中提供 The premix provides following for per kg diet: VA 1 500 IU; VD<sub>3</sub> 200 IU; VE 10 IU; VK 0.5 mg; 生物素 biotin 0.05 mg; 叶酸 folic acid 0.3 mg; D-泛酸 D-pantothenic acid 10 mg; 烟酸 nicotinic acid 10 mg; 核黄素 riboflavin 3.6 mg; 硫胺素 thiamine 1.0 mg; VB<sub>6</sub> pyridoxine 1.5 mg; Cu(as copper sulfate) 6 mg; Fe(as ferrous sulfate) 100 mg; Zn(as zinc sulfate) 100 mg; Mn 3 mg; Se 0.30 mg; I 0.14 mg; VB<sub>12</sub> 15 mg。

<sup>2)</sup> DE 为计算值,其余均为实测值。DE is calculated value, while other nutrient levels are measured values.

1.4 样品采集与测定

分别于仔猪 21、28 和 35 日龄随机选取 4 头仔猪(公母各占 1/2),每千克体重肌肉注射 4%戊巴比妥钠溶液 40 mg 进行麻醉,待麻醉完全后前腔静脉取血,然后屠宰取肠道样品。宰前禁饲 24 h,禁饲期间自由饮水。

1.4.1 血浆 D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)和尿中乳果糖与甘露醇排泄比率的测定

仔猪前腔静脉采血于离心管中,肝素抗凝,

3 000 r/min离心后制备血浆, - 70℃ 保存。血浆 D-乳酸浓度测定参照 Brandt 等<sup>[10]</sup>建立的分光光度法。血浆二胺氧化酶(DAO)活性测定参照黎君友等<sup>[11]</sup>建立的分光光度法。

随机选取未屠宰仔猪 4 头,经胃管喂服双糖溶液,每头灌服 10 mL 检测溶液(含 10% 乳果糖和 5% 甘露醇)。随后连续收集 6 h 尿液,将各组收集的尿液混匀后各取 5 mL,加入 1 mg 硫柳汞作防腐剂,置于 - 20℃ 冰箱保存待测。利用高效液相色谱仪(Waters,美国)分析尿中乳果糖 / 甘露醇比值。乳果糖和甘露醇标准品购自 Sigma 公司。

1.4.2 Occludin 基因克隆和断奶对 Occludin mRNA 表达的影响

取液氮冻存的猪小肠组织放入研钵中,加入液氮研磨成粉末,将粉末转移到 1.5 mL 离心管中。参照 Trizol Reagent 使用说明书提取总 RNA,并用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和浓度。提取的总 RNA 置于 - 70℃ 保存或立即进行反转录。RNA 提取液 1~4 μg 为模板,进行反转录。反转录条件: 37℃ 水浴 60 min, 70℃ 水浴 10 min, 结束反应。将反转录产物放入 - 20℃ 保存备用。

根据 GenBank 已登录的 Occludin (U79554) 和 18S rRNA (AY265350)序列设计引物(上海生工合成)。Occludin 上下游引物分别为 5'-TAT GAG ACA GAC TAC ACA ACT GGC GGC GAG TCC-3', 5'-ATC ATA GTC TCC AAC CAT CTT CTT GAT GTG-3', 预期产物为 363 bp。18S rRNA 上下游引物分别为 5'-GCG GCT TTG GTG ACT CTA-3', 5'-CTG CCT CCT TGG ATG TG-3', 预期产物为 195 bp。取 2 μL 模板进行 PCR 扩增,反应体系总体积 50 μL,置于 geneamp9600 PCR 仪上。预试验确定最佳 Mg<sup>2+</sup> 浓度、退火温度和循环数。Occludin 和 18S rRNA 的 PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ / 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 29 个循环; 72℃ 再延伸 10 min, 反应结束 4℃ 保存。取 10 μL 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测,观察扩增结果。PCR 产物经克隆、测序分析后进行 RT-PCR 表达分析。凝胶电泳显像仪(ImageMaster VDS)进行图片分析。定量分析软件用 ImageMaster VDS Software。

1.5 数据统计

试验数据均以平均值 ± 标准差表示,采用 SAS 6.12 软件分析数据,不同日龄间平均值的比较采用 Duncan 氏多重比较进行差异显著性检验。

2 结 果

2.1 早期断奶仔猪肠通透性的变化

由表 2 可知,早期断奶引起仔猪肠通透性的增

加。与断奶前相比,28 日龄时血浆 *D*-乳酸含量、DAO 活性和乳果糖/甘露醇比值差异达到显著水平 ( $P<0.05$ ),且至 35 日龄时,肠道仍然维持这种较高的通透性。

表 2 早期断奶仔猪肠通透性变化  
Table 2 Changes in intestinal permeability of early weaning piglets

项目 Items	21 日龄 21 d	28 日龄 28 d	35 日龄 35 d
<i>D</i> -乳酸 <i>D</i> -lactate(μg/mL)	8.18 ± 0.83 <sup>a</sup>	9.53 ± 0.78 <sup>b</sup>	9.46 ± 0.84 <sup>b</sup>
二胺氧化酶 DAO(U/L)	5.45 ± 0.91 <sup>a</sup>	7.44 ± 0.91 <sup>b</sup>	7.01 ± 0.93 <sup>b</sup>
乳果糖/甘露醇 L/M	0.089 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.205 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.183 ± 0.06 <sup>b</sup>

同行肩标字母不同者为差异显著( $P<0.05$ )。  
In the same row, values with different letter mean significant difference( $P<0.05$ ).

2.2 Occludin 基因克隆和断奶对 Occludin mRNA 表达的影响

2.2.1 Occludin 基因克隆与序列分析

RT-PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,显示扩增得到大约 363 bp 左右的片段,与设计的产物大小一致(图 1)。PCR 产物割胶回收,转入载体 pGEM-T 后克隆。挑选阳性克隆子经过正反两个测序反应,得到 363 bp 的核苷酸序列。经过比对发现,得到的序列与 GenBank 中猪 Occludin 基因(U79554)核苷酸序列基本相同,同源性达到 100%,说明所克隆的基因序列为猪的 Occludin 基因。

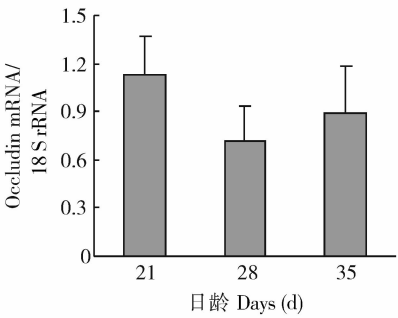


图 2 早期断奶对仔猪 Occludin mRNA 表达的影响  
Fig.2 Effect of early weaning on Occludin mRNA expression of piglets

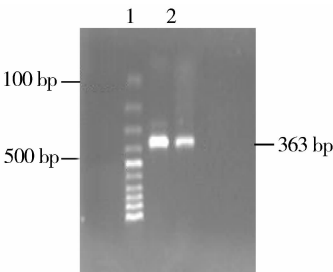


图 1 PCR 产物凝胶电泳  
Fig.1 Gel electrophoresis of PCR product  
1. DNA marker 2. PCR 产物 PCR product

2.2.2 早期断奶对 Occludin mRNA 表达的影响

由图 2 可知,仔猪早期断奶后,28 日龄仔猪 Occludin mRNA 相对表达量下降明显,与断奶前相比差异显著( $P<0.05$ )。35 日龄时,表达量有所恢复,但仍然低于断奶前表达水平。

3 讨 论

3.1 早期断奶对仔猪肠通透性变化的影响

仔猪早期断奶应激会引起小肠绒毛高度下降,隐窝深度加深,对断奶仔猪小肠形态造成损伤<sup>[6]</sup>。而早期断奶是否会引起仔猪肠屏障通透性变化尚未见报道。*D*-乳酸是肠道细菌代谢、裂解的产物。哺乳动物组织既不产生 *D*-乳酸,也不能或仅能缓慢代谢 *D*-乳酸。当肠黏膜生物屏障被破坏时肠道中细菌产生的大量 *D*-乳酸透过受损的肠黏膜进入血液循环,故血浆 *D*-乳酸水平可及时反映肠黏膜损伤的程度和通透性变化。DAO 是哺乳动物肠黏膜上绒毛细胞中具有高度活性的细胞内酶,血浆 DAO 增高也能提示肠屏障破坏。而乳果糖和甘露醇由于其在肠道不被代谢,无毒性,无免疫性,在尿中以原型代谢。且甘露醇是单糖,分子较小,主要通过肠黏膜细胞膜上的水溶性微孔透过肠黏膜;乳果糖是双糖,分子较大,主要通过肠黏膜细胞间紧密连接直接透过细胞膜,这也是细菌及内毒素通过肠黏膜的途径,

因此,乳果糖的通透性可反映肠黏膜屏障的功能。在疾病状态下,肠黏膜可能萎缩,吸收面积减少,甘露醇通过减少,同时,细胞间紧密连接受到破坏,乳果糖通过增加,这样可使乳果糖与甘露醇排出率比值增加。本试验发现,仔猪断奶后 28 日龄血浆 D-乳酸含量、DAO 活性及尿乳果糖/甘露醇排出率显著高于断奶前水平且维持至 35 日龄,说明早期断奶增加了仔猪肠道的通透性。腹泻、感染和手术等多种应激状态均可导致暂时或较长时间的肠屏障损害,表现为肠黏膜萎缩、破损,肠黏膜通透性增高、细菌和毒素移位等。早期断奶后仔猪肠道的通透性显著增加证实了肠屏障功能的损伤。

### 3.2 早期断奶对仔猪肠上皮 Occludin mRNA 表达的影响

本试验同时发现,仔猪早期断奶后肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin mRNA 相对表达量明显下降,至 35 日龄时虽有所恢复,但仍然低于断奶前表达水平。已知肠上皮屏障功能与肠上皮细胞间紧密连接的生物学特征和开放程度密切相关。已知肠上皮的跨膜结合蛋白 Occludin 是构成紧密连接的主要结构蛋白之一,Occludin 具有四次跨膜结构,与 Claudin1、Claudin2 共同构成紧密连接,胞内部分通过 ZO-1 和 ZO-2 与细胞骨架蛋白相连。Occludin 一旦进入紧密连接,其连接部位的膜通透性降低,仅允许小分子出入,而大分子难以进出<sup>[12-13]</sup>。它的存在决定肠道选择性屏障,一旦发生变异、减少和缺失可以引起肠上皮细胞间隙通透性增加,细菌内毒素等大分子物质可透过紧密连接进入体循环。对其水平的检测可在一定程度上反映致病菌对肠道紧密连接及屏障的破坏情况<sup>[14-15]</sup>。本试验发现早期断奶引起仔猪肠屏障受损、通透性增加可能与肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 表达下降相关。Jiang 等<sup>[16]</sup>用抗肿瘤药物亚麻酸作用于人内皮细胞发现,细胞的跨膜电阻值升高,对大分子的通透性降低;免疫荧光和 Western blot 显示 Occludin 表达增高,细胞紧密连接更加突出,提示 Occludin 通过调节细胞通透性在紧密连接中发挥重要作用。尹芳等<sup>[17]</sup>试验也发现耐药细胞可以通过提高 Occludin mRNA 的表达降低紧密连接的通透性,从而参与细胞耐药性的调节。因此早期断奶通过破坏肠结构、增加肠道通透性,从而破坏肠屏障功能。仔猪肠屏障功能的破坏会引起或加重仔猪腹泻的发生,其相关机制还有待于进一步研究。

## 4 结 论

① 早期断奶后仔猪肠道通透性增加,肠屏障功

能遭到破坏,且肠通透性增高维持至 35 日龄尚未恢复。

② 早期断奶引起仔猪肠屏障受损、通透性增加可能与肠上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 表达下降相关。

### 参考文献:

- [1] Bosi P, Gremokolini C, Trevisi P. Dietary regulations of the intestinal barrier function at weaning. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2003, 16: 596-608.
- [2] Boudry G, Peron V, Le Huerou-Luron I, Lalles J P, Seve B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *Journal of Nutrition*, 2004, 134: 2256-2262.
- [3] Lalles J P, Boudry G, Favier C, Le Floc N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel S, Seve B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research*, 2004, 53: 301-331.
- [4] Cera K R, Mahan D C, Cross R F, Reinhart G A, Whitmover R E. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science*, 1988, 66: 574-584.
- [5] Van Beers-Schreurs H M G, Nabuurs M J A, Vellenga L, Kalsbeek-van der H J. Weaning and the weanling diet influence the villus height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *Journal of Nutrition*, 1998, 128 (6): 947-953.
- [6] Pluske J R. *Morphological, functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig*. Nottingham: Nottingham University Press, 2001.
- [7] Hedemann M S, Hojsgaard S, Jensen B B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of animal Physiology and Animal Nutrition*, 2003, 87: 32-41.
- [8] Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *European Journal of Cell Biology*, 1997, 73: 222-231.
- [9] Huber D, Balda M S, Matter K. Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 5773-5778.
- [10] Brandt R B, Siegel S A, Waters M G, Bloch M H. Spectrophotometric assay for D-lactate in plasma.

- Analytical Biochemistry*, 1980, 102(1): 39-46.
- [11] 黎君友, 于 燕, 郝 军, 晋 桦, 许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(4): 28-30.
- [12] Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occluding in tight junction formation. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 137(6): 1393-1401.
- [13] Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occluding in fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 143 (2): 391-401.
- [14] Mazzon E, Sturniolo G C, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut*, 2002, 51: 507-513.
- [15] Berkes J, Viswanathan V K, Sarkovic S D, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effect on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, 2003, 52: 439-451.
- [16] Jiang W G, Bryce R P, Horrobin D F, Mansel R E. Regulation of tight junction permeability and occluding expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(2): 414-420.
- [17] 尹 芳, 时永全, 肖 冰, 陈宝军, 苗继延, 樊代明. Occludin 在胃癌耐药细胞 SGC7901 中 mRNA 水平. 现代消化及介入诊疗杂志, 1999, 4(2): 40-41.

## Effects of Early Weaning on Intestinal Permeability and Tight Junction Protein Occludin mRNA Expression Levels of Piglets

LIU Hai-ping HU Cai-hong\* XU Yong

(College of Animal Science, Zhejiang University, The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** The aim of this paper is to study the changes of intestinal permeability and mechanisms in early weaning piglets. A total of 32 piglets weaned on the 21<sup>st</sup> day were selected to measure plasma *D*-lactate level, DAO activity and urine lactulose mannitol ratio on the 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> day to evaluate the intestinal permeability. Level of Occludin mRNA expression was researched at the same time. The results indicated that plasma *D*-lactate level, DAO activity and urine lactulose mannitol ratio increased significantly on the 28<sup>th</sup> day and markedly maintained high level to on the 35<sup>th</sup> day compared with the figures before weaning ( $P < 0.05$ ); Occludin mRNA expression level decreased obviously after weaning ( $P < 0.05$ ), and recovered to some extent on the 35<sup>th</sup> day. It is suggested that damage of intestinal barrier function and the increase of intestinal permeability may be due to the declined expression of tight junction protein Occludin mRNA. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(4): 442-446]

**Key words:** Early weaning; Piglets; Intestinal permeability; Tight junction; Occludin

\* Corresponding author, associate professor, E-mail: chhu@zju.edu.cn