

早期断奶应激对仔猪血清皮质醇含量和肠形态及肠屏障通透性的影响

钱仲仓, 刘海萍, 徐 勇, 胡彩虹

(浙江大学 饲料科学研究所, 动物分子营养学教育部重点实验室, 浙江省饲料及动物营养研究重点实验室, 浙江 杭州 310029)

[摘 要] **【目的】**探讨早期断奶对仔猪应激、肠形态和肠通透性的影响。**【方法】**选取 32 头杜长大三元杂交仔猪, 于 21 日龄断奶, 并于 21, 22, 25, 28 和 35 日龄取样观察肠形态, 检测血清皮质醇含量、血浆 D-乳酸含量和二胺氧化酶(Diamine oxidase, DAO)活性及尿乳果糖与甘露醇比率。**【结果】**仔猪于 21 日龄断奶后, 其血清皮质醇含量于 22 日龄迅速上升, 并达极显著水平($P < 0.01$), 断奶后 1 周内均维持在较高水平($P < 0.05$), 至 35 日龄仍处于显著水平($P < 0.05$); 21 日龄断奶后, 仔猪的肠形态发生明显变化, 肠绒毛高度下降、隐窝加深, 断奶后 1 周内的损伤最为明显, 于 28 日龄时开始修复, 至 35 日龄时基本恢复; 21 日龄断奶仔猪的血浆 D-乳酸含量、二胺氧化酶(DAO)活性及尿中乳果糖与甘露醇比率在 22 日龄迅速升高, 至 35 日龄时仍维持在较高水平, 且与断奶前相比差异显著($P < 0.05$)。**【结论】**断奶应激状态下, 仔猪的血清皮质醇含量升高, 肠屏障严重受损, 通透性增加明显先于形态变化, 但通透性的恢复却滞后于形态学重建。因此, 肠屏障功能能够更好地反映断奶仔猪的肠道状态。

[关键词] 仔猪; 早期断奶应激; 皮质醇; 肠形态; 肠屏障通透性

[中图分类号] S858.287.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)10-0062-05

Effect of early-weaned stress on serum cortisol, intestinal morphology and permeability in piglets

QIAN Zhong-cang, LIU Hai-ping, XU Yong, HU Cai-hong

(Feed science Institute, Zhejiang University, The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang Provincial Laboratory of Feed and Animal Nutrition, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: **【Objective】**The experiment studied the effect of early-weaned stress on serum cortisol, intestinal morphology and permeability in piglets. **【Method】**A total of 32 piglets were weaned at 21 d. Intestinal morphology, serum cortisol, DAO activity, plasma D-lactate level, and urine lactulose mannitol ratio were measured at 21, 22, 25, 28, 35 d of age. **【Result】**The results showed that the serum cortisol levels increased immediately at 22 d ($P < 0.01$), and remained high level in the 1 week postweaning ($P < 0.05$), even at 35 d ($P < 0.05$); Intestinal morphogenesis obviously changed during the early stage of weaning. Villous height declined, and crypt depth increased, especially in the 1 week postweaning; the intestinal tissue repaired at 28 d and recovered at 35 d. Plasma D-lactate level, DAO activity and urine lactulose mannitol ratio increased immediately at 22 d and significantly remained high level to day 35 compared with that before weaning ($P < 0.05$). **【Conclusion】**It is concluded that intestinal mucosal barrier is subject to serious damage for early-weaned stress, and permeability increase is obviously prior to morphological changes, but the permeability lags behind the restoration of the morphological. So, intestinal barrier function better reflects

* [收稿日期] 2009-01-09

[基金项目] 浙江省重大科技专项(2008C12087)

[作者简介] 钱仲仓(1985—), 男, 山东临沂人, 在读硕士, 主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: xiaobudian9116@126.com

[通信作者] 胡彩虹(1972—), 女, 浙江东阳人, 副研究员, 主要从事动物营养和饲料科学研究。E-mail: chhu@zju.edu.cn

the state of intestine.

Key words: piglet; early-weaned stress; cortisol; intestinal morphology; intestinal barrier permeability

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,早期断奶技术在生产中被普遍采用。早期断奶是将猪的断奶时间从常规的 35~42 d 提前到 28 d 或更早,这样虽然可使母猪的年产胎数和猪场的生产效率提高 5%~10%,但受断奶后心理、环境、营养应激等因素的影响,早期断奶后易造成仔猪食欲下降、消化不良、腹泻、生长受阻等,导致“仔猪早期断奶综合症”,这也给养猪业带来了巨大的经济损失^[1]。产生这一后果的主要原因是断奶应激会影响仔猪肠道的结构和功能,这对肠道发育尚不成熟的仔猪来说无疑是雪上加霜^[2]。因而,研究早期断奶仔猪肠道状态及功能的发展变化,对科学确定断奶时间无疑具有重要的实际意义。

早期断奶增加了仔猪对环境中潜在病原微生物的敏感性,使仔猪肠绒毛高度下降,隐窝深度加深,肠绒毛上成熟细胞数量减少^[3],造成仔猪肠道消化吸收面积减少,消化能力下降,导致腹泻进而影响仔猪的健康生长^[4]。目前,国内已有较多关于断奶引起仔猪肠形态变化的研究报道,而关于早期断奶对

仔猪肠屏障功能损伤的研究尚比较少,关于早期断奶仔猪肠形态与肠屏障功能关系的研究尚未见报道。为此,本试验研究了早期断奶对仔猪血清皮质醇含量、肠形态和肠屏障通透性的影响,以期对断奶仔猪肠道损伤的恢复研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选取母猪体况相似、胎次接近、预产期接近的杜长大三元杂交仔猪 6 窝,生产后待仔猪哺乳至 21 日龄时开始断奶。断奶时间为 21 日龄当日晚 8:00~9:00,断奶时赶走母猪,仔猪仍留在原处。试验仔猪于 7 日龄开始诱食,断奶后按照体质量相近、公母各半随机选取 32 头仔猪,饲喂基础日粮至 35 日龄,饲喂期间自由采食和饮水。

1.2 试验日粮

参照美国 NRC(1998 版)断奶仔猪的营养需要配制颗粒饲料,其配方及主要营养水平见表 1。

表 1 断奶仔猪基础日粮配方及营养水平
Table 1 Ingredients and nutrient level of basal diet

原料 Ingredient	配比/(g·kg ⁻¹) Content	营养水平 Nutrient	含量 Content
玉米 Corn	580	消化能 (MJ·kg ⁻¹) DE	13.9
豆粕 Soybean meal	170	粗蛋白/(g·kg ⁻¹) CP	201
膨化全脂大豆 Extruded full-fat Soya bean	70	钙/(g·kg ⁻¹) Ca	9.0
鱼粉 Fish meal	45	总磷/(g·kg ⁻¹) P	7.5
乳清粉 Dried whey	45	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	11.2
次粉 Wheat middling	50	蛋氨酸+胱氨酸/(g·kg ⁻¹) Met+Cys	6.5
磷酸氢钙 CaHPO ₄	15		
食盐 Salt	2.5		
石粉 Limestone	11		
复合维生素-微量元素预混料 Vitamun-mineral premix	10		
赖氨酸 Lysine	1.5		

注:(1)每 kg 饲料中含维生素 A 1 500 IU,维生素 D₃ 200 IU,维生素 E 10 IU,维生素 K₃ 0.5 mg,生物素 0.05 mg,叶酸 0.3 mg,D-泛酸 10 mg,烟酸 10 mg,维生素 B₂(核黄素)3.6 mg,维生素 B₁(硫胺素)1.0 mg,维生素 B₆ 1.5 mg,铜 6 mg,铁 100 mg,锌 100 mg,锰 3 mg,硒 0.30 mg,碘 0.14 mg,维生素 B₁₂ 15 mg。
(2)DE 为计算值,其余均为实测。
Note:(1) Supplied per kilogram of diet: VA 1 500 IU,VD₃ 200 IU,VE 10 IU,VK3 0.5 mg,Biotin 0.05 mg,Folic acid 0.3 mg,D-pantothenic acid 10 mg,Niacin 10 mg,Riboflavin 3.6 mg,Thiamine 1.0 mg,Pyridoxine 1.5 mg,Cu 6 mg,Fe 100 mg,Zn 110 mg,Mn 3 mg,Se 0.30 mg,I 0.14 mg,VB₁₂ 15 mg.
(2) DE is calculated value. Other nutrient levels are measured values.

1.3 样品的采集与测定

分别于 21,22,25,28 和 35 日龄随机选取 4 头仔猪(公母各半),肌肉注射 4%戊巴比妥钠溶液(40

mg/kg)麻醉后取样。宰前禁饲 24 h,禁饲期间自由饮水。

1.3.1 血清皮质醇含量、血浆 D-乳酸含量和二胺

氧化酶(DAO)活性及尿中乳果糖与甘露醇排泄比率的测定 屠宰时用一次性塑料杯腔静脉采血,静置待凝血析出血清时用移液器吸取血清于离心管中,以 3 000 r/min 低温离心,分离血清样品,4 ℃保存。血清皮质醇含量用放射免疫法测定,皮质醇药盒由北京东雅生物制品有限公司提供。

仔猪前腔静脉采血,肝素抗凝,3 000 r/min 离心后分离血浆,−70 ℃保存。血浆 D-乳酸含量测定参照 Brandt 等^[5]的分光光度法进行;血浆 DAO 活性的测定参照黎君友等^[6]的分光光度法进行。

随机选取未屠宰仔猪 4 头,灌服检测溶液(含 10%乳果糖和 5%甘露醇)10 mL/头。随后连续收集 6 h 尿液,利用高效液相色谱仪(Waster,美国)分析计算尿中的乳果糖与甘露醇比率,试验所用乳果糖和甘露醇标准品购自 Sigma 公司。

1.3.2 肠道形态的观察 屠宰后,沿肠系膜纵向切开小肠,取空肠中段长度约 1 cm 的肠管,用生理盐水将其轻轻冲洗干净,而后平铺在滤纸上吸干液体,浸入体积分数 10%甲醛固定液中置 4 ℃保存,用于光镜分析其形态结构的变化。

小肠镜检样品测定时,利用德国 Leica 组织切片整套设备,经固定、修整、脱水、切片(厚度约 5

μm)和 H. E. 染色制片。利用 Leica Qwin 图像分析仪对绒毛高度、隐窝深度进行显微测量。其中绒毛高度为绒毛顶端至隐窝开口处的垂直距离;隐窝深度为隐窝开口处至隐窝基部的垂直距离。每个样品观察 3 个非连续的纵切片和横切片。每张纵切片测定 10 个相应指标,取其平均值作为 1 个测定数据。

1.4 数据统计与分析

试验数据均以“平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示,采用 SAS(6.12 版)软件中的一般线性模式(GLM)对数据进行单因素分析,不同日龄间的平均值比较采用 Duncan’s 多重比较进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 早期断奶仔猪血清皮质醇的变化

由表 2 可见,仔猪于 21 日龄断奶后,其血清皮质醇含量于 22 日龄时达到最高,与断奶前相比差异达极显著水平($P<0.01$)。血清皮质醇含量在断奶后的 1 周左右均处于较高水平($P<0.05$);至 35 日龄时,断奶仔猪的血清皮质醇含量仍显著高于断奶前($P<0.05$)。

表 2 早期断奶对仔猪血清皮质醇含量的影响

Table 2 Effect of early-weaned stress on serum levels of cortisol in piglets

日龄/d Day	血清质醇/(nmol·L ⁻¹) Serum cortisol	日龄/d Day	血清质醇/(nmol·L ⁻¹) Serum cortisol	日龄/d Day	血清质醇/(nmol·L ⁻¹) Serum cortiso
21	126.45±23.47 a	25	264.85±61.76 bc	35	183.56±49.36 c
22	281.06±57.34 b	28	213.92±51.21 bc		

注:同列数据后标不同字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。下表同
Note: Different letters in the same column mean significant difference($P<0.05$). The following tables are the same.

2.2 早期断奶仔猪肠形态结构的变化

由表 3 可知,早期断奶使仔猪的肠形态发生了较大变化,断奶导致仔猪肠绒毛萎缩、隐窝深度增大。25 日龄时,断奶仔猪的肠道受到严重损伤,绒

毛高度和隐窝深度与断奶前相比差异均达显著水平($P<0.05$),28 日龄后才开始逐渐恢复,至 35 日龄时虽然仍未完全恢复,但与断奶前相比已无显著差异($P>0.05$)。

表 3 早期断奶对仔猪肠形态结构的影响

Table 3 Effect of early-weaned stress on intestinal morphology in piglets

日龄/d Day	绒毛高度 Villus height	隐窝深度 Crypt depth	日龄/d Day	绒毛高度 Villus height	隐窝深度 Crypt depth
21	347.76±51.43 a	236.12±22.67 a	28	305.03±45.37 ab	269.01±19.73 b
22	318.13±48.05 ab	260.57±20.58 ab	35	330.11±43.21 ab	255.17±23.37 ab
25	271.24±48.92 b	284.02±21.46 b			

2.3 早期断奶仔猪肠通透性的变化

由表 4 可知,仔猪断奶后血浆 D-乳酸含量、DAO 活性及尿中乳果糖与甘露醇比率均在 22 日龄时迅速升高,且与断奶前相比差异均达显著水平

($P<0.05$);D-乳酸含量和 DAO 活性均在 25 日龄时达到最大值,而尿中乳果糖与甘露醇比率在 28 日龄时达到最大,至 35 日龄时各指标值仍然维持在较高的水平,且与断奶前相比差异显著($P<0.05$)。

表 4 早期断奶对仔猪血浆 D-乳酸含量、DAO 活性及尿中乳果糖与甘露醇比率的影响

Table4 Effect of early-weaned stress on the levels of plasma D-lactate, DAO activity and urine lactulose/mannitol ratio in piglets

日龄/d Day	D-乳酸/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) D-lactate	二胺氧化酶/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$) DAO	乳果糖/甘露醇 Lactose/Mannose
21	8.18 $\pm$ 0.63 a	5.45 $\pm$ 0.81 a	0.089 $\pm$ 0.06 a
22	9.06 $\pm$ 0.56 b	6.70 $\pm$ 0.82 b	0.189 $\pm$ 0.05 b
25	9.62 $\pm$ 0.72 b	7.54 $\pm$ 0.77 b	0.194 $\pm$ 0.04 b
28	9.53 $\pm$ 0.78 b	7.44 $\pm$ 0.79 b	0.205 $\pm$ 0.04 b
35	9.46 $\pm$ 0.84 b	7.01 $\pm$ 0.87 b	0.183 $\pm$ 0.06 b

3 讨 论

早期断奶后,仔猪不仅要面对与母猪分离和断奶后环境变化带来的应激,还要适应由温热的液体母乳向冷而干燥的固体颗粒料的转变。由断奶导致的应激会使仔猪的内分泌功能发生剧烈变化,进而影响下丘脑-垂体-肾上腺轴功能,使血浆皮质醇浓度上升^[7-8]。因此,常用血清皮质醇水平来反映仔猪应对断奶应激而产生的生理变化,皮质醇含量的变化可作为断奶应激诊断的一个指标^[7]。本试验中,仔猪 21 日龄断奶后,血清皮质醇含量在 22 日龄时达到最高,与断奶前的差异达到极显著水平,且于断奶后的 1 周左右均处于较高水平,至 35 日龄时断奶仔猪的血清皮质醇含量仍显著高于断奶前,这与前人的研究结果^[9]基本一致,说明早期断奶使仔猪处于断奶应激状态。吴金节等^[10]也研究了早期断奶应激对仔猪血清激素水平的影响,结果发现,仔猪断奶 1 d 和 3 d 后,其血清皮质醇水平极显著升高($P<0.01$)。

有研究表明,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^[11]。本试验发现,仔猪断奶后其肠形态会发生明显变化,如肠绒毛萎缩和隐窝加深,均证实了断奶对仔猪小肠形态的损害。本试验还发现,仔猪早期断奶后 1 周内,其肠道损伤程度最高,而于 28 日龄后开始修复,至 35 日龄时基本恢复,该结果也与多数研究结果^[4,12]一致。

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-乳酸水平可及时地反映肠黏膜损伤和通透性变化的程度。DAO 是哺乳动物肠黏膜绒毛细胞中具有高度活性的胞内酶,血浆 DAO 增高也能反映肠屏障的破坏情况。乳果糖和甘露醇由于在肠道不被代谢,无毒性和无免疫性,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的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,乳果糖的通透性也可以反映肠黏膜屏障的功能。在疾病状态下,肠黏膜可能萎缩,吸收面积减小,甘露醇通过量减少,同时细胞间紧密连接受到破坏,乳果糖通过量增加,导致乳果糖与甘露醇排出率比值增加。

本试验发现,仔猪断奶后血浆 D-乳酸含量、DAO 活性及乳果糖与甘露醇排出率比值于 22 日龄迅速增加,说明此时仔猪肠道通透性增加、肠屏障功能遭到损伤;22 日龄后,肠道通透性一直维持在较高水平,至试验结束时仍显著高于断奶之前;仔猪肠形态的变化在断奶后 1 周最为明显,且随着日龄增加而逐渐恢复。这说明断奶应激使仔猪肠道屏障严重受累并迅速损坏,其变化先于肠形态结构因断奶而发生的明显改变,这种功能性损坏持续的时间较长。肠形态的恢复只是肠上皮细胞重新生长而覆盖了肠绒毛表面,其正常的功能并未建立。重建的上皮细胞并未达到完全成熟,与固有层的连接也不完善,而微绒毛的延迟修复可能也影响了肠上皮的营养供应及功能的充分表达^[13-14]。这说明肠黏膜细胞最初开始的修复阶段仅仅是其细胞结构的建立,或者只是恢复了肠上皮细胞的连续性,其功能尚未开始恢复,甚至肠屏障功能障碍还在进一步加重,因此最终的修复就不仅仅是以新增殖的细胞代替损伤的黏膜细胞。

Prasad 等^[15]认为,尽管在形态学上,肠细胞的连续性和肠屏障的一些特性已得以恢复,但重建后的黏膜表面细胞所具有的物质转运属性和超微结构特点,仍不同于未损伤的上皮组织,而肠黏膜损伤主要是细胞紧密连接的损害,细胞连接的损害主要以其功能变化为主。本试验结果还发现,肠道形态学上的恢复并未使肠上皮的内在结构和功能得到恢复,由于肠屏障功能恢复滞后于肠形态的恢复,因此肠屏障功能的变化能够更好地反映断奶仔猪的肠道

损伤情况。而肠屏障功能的具体恢复过程和机制等,还有待于进一步研究。

〔参考文献〕

- [1] Boudry G, Peron V, Le Huerou-Luron I, et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine [J]. *J Nutr*, 2004, 134: 2256-2262.
- [2] Spreeuwenberg M A M, Verdonk J M A J, Gaskins H R, et al. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning [J]. *J Nutr*, 2001, 131: 1520-1527.
- [3] Dunsford B R, Knabe D A, Haensly W E. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pig [J]. *J Anim Sci*, 1989, 67: 1855-1863.
- [4] Hampson D J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning [J]. *Research in Veterinary Science*, 1986, 40: 32-40.
- [5] Brandt R B, Siegel S A, Waters M G, et al. Spectrophotometric assay for D-lactate in plasma [J]. *Anal Biochem*, 1980, 102(1): 39-46.
- [6] 黎君友, 于 燕, 郝 军, 等. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性 [J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18(4): 28-30.
Li J Y, Yu Y, Hao J, et al. Determination of diamine oxidase activity in intestinal tissue and blood using spectrophotometry [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1996, 18(4): 28-30. (in Chinese)
- [7] Becker B A, Nienaber J A, Christenson R K. Peripheral concentrations of cortisol as an indicator of stress in the pig [J]. *Am J Vet Res*, 1985, 46(5): 1034-1038.
- [8] Dantzer R, Mormede P. Influence of weaning method on the behavior and the hypophysealadrenal axis activity in the piglet [J]. *Reprod Nutr Dev*, 1981, 21(5): 661-670.
- [9] Kanitz E, Manteuffel G, Otten W. Effects of weaning and restraint stress on glucocorticoid receptor binding capacity in limbic areas of domestic pigs [J]. *Brain Res*, 1998, 804(2): 311-315.
- [10] 吴金节, 张德群, 章孝荣, 等. 早期断奶应激对仔猪某些血清激素水平及细胞免疫功能的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(2): 170-173.
Wu J J, Zhang D Q, Zhang X R, et al. Effect of early-weaned stress on serum levels of hormones and cellular immune responses in piglets [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2001, 21(2): 170-173. (in Chinese)
- [11] Pluske J R. Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig [C]//Piva A, Bach Knudsen K E, Lindberg J E, Eds. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham A; Nottingham University Press, 2001: 1-27.
- [12] Hedemann M S, Højsgaard S, Jensen B B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2003, 87: 32-41.
- [13] 陈 华, 王翠娥, 刘亚千, 等. 大鼠失血性休克致肠道细菌移位的病理学观察 [J]. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(1): 86.
Chen H, Wang C E, Liu Y Q, et al. Pathological observation of intestinal bacterial translocation after hemorrhagic shock in rats [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2001, 18(1): 86. (in Chinese)
- [14] Itoh H, Yagi M, Hasebe K, et al. Regeneration of small intestinal mucosa after acute ischemia-reperfusion injury [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(12): 2704-2710.
- [15] Prasad M, Ito S, Silen W. Functional studies of in vitro rat distal colon before and after restitution [J]. *Surgery*, 1997, 121(4): 430-439.