

网络出版时间:2018-07-30 17:12

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.02.002

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180730.1710.004.html>

酵母硒对分娩应激状态下围产期 奶牛代谢的影响

罗正中¹, 白利鹏¹, 黄逸馨¹, 江 婧¹, 沈留红¹, 陶金忠², 余树民¹, 曹随忠¹

(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130; 2 宁夏大学 农学院 动物科学系, 宁夏 银川 750021)

【摘要】【目的】研究酵母硒对围产期奶牛代谢的影响,从代谢物变化的角度阐述其在分娩应激状态下的生物学作用。【方法】选择 24 头体况、胎次、年龄、体质量和预产期相近的健康围产前期奶牛随机分为对照组和试验组,每组各 12 头,对照组饲喂基础日粮,试验组在基础日粮中添加 0.15 g/kg 干物质的酵母硒,于产前 21 d 开始饲喂,分娩后当天停止饲喂。在产前 21 d 及分娩后 6 h 内尾静脉采血,使用 EDTA 抗凝并离心收集血浆。应用 UPLC-TOF/MS 分析技术,在正负离子模式下对所有血浆样品进行代谢组学分析,数据经预处理后利用多维统计(包括主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA))和单变量(*t* 检验和差异倍数)分析方法,分析在产前 21 d 和分娩当天试验组和对对照组奶牛血浆中代谢物差异性,以 OPLS-DA 获得的 VIP 值>1 和 *t* 检验中 $P<0.1$ 为条件筛选差异代谢物。【结果】2 组奶牛血浆代谢物在饲喂硒前差异不明显,饲喂硒后有 19 种差异代谢物。与对照组相比,试验组奶牛在分娩后血浆中 *L*-苯丙氨酸、*L*-亮氨酸、异亮氨酸、*L*-谷氨酰胺、*L*-缬氨酸、酪胺、酮亮氨酸和硫酸吡啶酚显著降低($P<0.05$),甜菜碱、7-甲基黄嘌呤、马尿酸、尿囊素和柠檬酸显著升高($P<0.05$),*L*-正亮氨酸、*DL*-苯丙氨酸、乙二醇单乙醚和氧代己二酸呈降低趋势($0.05<P<0.1$),*L*-肌肽和苯乙酰甘氨酸呈升高趋势($0.05<P<0.1$)。【结论】在分娩应激状态下,硒可能通过影响氨基酸、脂类和尿嘌呤衍生物的代谢,发挥着抗应激反应的作用。

【关键词】 酵母硒;奶牛;围产期;代谢组学;分娩应激

【中图分类号】 S816.72

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)02-0007-09

Effect of selenium yeast on plasma metabolism of transition dairy cow in parturition stress status

LUO Zhengzhong¹, BAI Lipeng¹, HUANG Yixin¹, JIANG Jing¹, SHEN Lihong¹,
TAO Jinzhong², YU Shumin¹, CAO Suizhong¹

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China;

2 Department of Animal Science, Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract:【Objective】The aim of this study was to detect the effect of selenium yeast on metabolism of transition dairy cows and to explain the biological functions of selenium yeast during parturition stress. 【Method】A total of 24 transition dairy cows with similar body condition scoring, parity, age and due date were selected and randomly divided into a test group and a control group. The 12 cows in each group were fed on basal diet supplemented with or without 0.15 g selenium yeast per kg dry matter (DM) from 21 days prepartum to postpartum. Plasma from caudal vein was collected 21 d prepartum and 6 h postpartum.

【收稿日期】 2017-11-14

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金项目(31660731);四川农业大学学科建设双支计划项目(03571537)

【作者简介】 罗正中(1994—),男,重庆垫江人,在读硕士,主要从事奶牛疾病研究。E-mail:zhengzhongluo@163.com

【通信作者】 曹随忠(1971—),男,甘肃岷县人,教授,博士,硕士生导师,主要从事奶牛疾病研究。E-mail:suizhongcao@126.com

Serum samples were subjected to metabolic profiling analysis using ultra performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF/MS) in positive and negative modes. Pretreatment data was performed by multivariate statistical methods including principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) as well as univariate analysis including t -test or fold difference method. The differences of plasma metabolites were analyzed between test group and control group 21 d prepartum and the delivery day. The differential metabolites were selected based on the VIP score (>1) obtained from OPLS-DA model and $P<0.1$ in t -test. 【Result】 The plasma metabolites of two groups had no significant difference before feeding selenium, but there were 19 differential metabolites after feeding selenium. Compared with control group, *L*-phenylalanine, *L*-leucine, isoleucine, *L*-glutamine, *L*-valine, tyramine, leucine, and indoxyl sulfate in test group were significantly reduced ($P<0.05$), while betaine, 7-methylxanthine, hippuric acid, allantoin and citrate were significantly increased ($P<0.05$). *L*-norleucine, *DL*-phenylalanine, 2-ethoxyethanol and 2-oxoadipic acid in test group were lower than that of the control ($0.05<P<0.1$), while *L*-creatine and phenylacetyl glycine were higher ($0.05<P<0.1$). 【Conclusion】 The selenium may play an important role in anti-stress process by regulating the metabolism of amino acid, lipids and purine derivatives during parturition stress.

Key words: selenium yeast; dairy cows; transition period; metabolomics; parturition stress

围产期是奶牛整个生产周期饲养管理的关键,当奶牛由妊娠后期过渡到泌乳初期时患病风险会大大增加^[1]。在分娩过程中,由于分娩应激和微生物入侵易发生急性炎症反应,炎症反应促进 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸和氨基酸的生成,其衍生介质能加剧机体的炎症反应,然而过度的炎症反应会影响奶牛健康,增加其产后的患病风险^[2]。由于奶牛在围产期采食量的降低,导致机体能量负平衡,使得血液中非酯化脂肪酸(NEFA)含量升高,而 NEFA 含量的增加可能会加剧炎症反应^[3]。血液中 NEFA 的积累会增加肝脏的代谢负荷,使得血液中酮体含量升高,这样会增加酮病等代谢性疾病的患病风险。

有研究指出,围产期饲喂硒能降低奶牛产后乳房炎、子宫炎、胎衣不下和代谢性疾病的患病风险^[4]。目前硒制品分为无机硒(亚硒酸钠)和有机硒(酵母硒),相比于无机硒,有机硒更易吸收代谢,而且安全性高,在提高免疫力和繁殖性能方面优于无机硒,因此在奶牛日粮硒添加中较多使用有机硒^[5-6]。在饲喂剂量上,根据研究报道和 NRC (2001)指出,硒的饲喂剂量为 0.3 mg/kg (以日粮干物质(DM)计)。硒的缺乏将增大患病风险,但是高剂量饲喂也将引起硒中毒^[7-9]。饲喂酵母硒能够提高产后奶牛血液中谷胱甘肽过氧化物酶和总超氧化物歧化酶的水平,增强总抗氧化能力,减少活性氧自由基(ROS)的生成,从而降低机体氧化应激反应^[10]。ROS 不仅能够激活 NF- κ B 信号通路促进炎症的发生,而且能与 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸作用发生

脂质过氧化反应,衍生成具有促炎作用的脂质介质^[11]。但目前,关于硒对围产期奶牛血浆中代谢物的影响尚不清楚。

随着质谱技术的成熟和广泛应用,基于质谱的代谢组学已应用于诸多领域,如发病机制研究、疾病诊断标志物的筛选、药物作用机理和靶向治疗药物的研发等。代谢组学是后基因组时代的研究热点,通过寻找差异代谢物能解释机体在某种特定条件下生物学变化的意义。本研究从代谢物变化的角度研究围产前期饲喂酵母硒对奶牛在分娩后的影响,旨在为酵母硒在奶牛饲料中使用提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物的饲养管理与样品采集

选择体况、年龄、胎次、体质量和预产期相近的 24 头围产前期(根据预产期计算产前 21 d)奶牛,随机分为对照组和试验组 2 组,每组 12 头,其中对照组饲喂基础日粮,试验组在基础日粮中添加 0.3 mg/kg 硒(SEL-PLEX[®] 2000,其中硒含量为 $2\,000 \text{ mg/kg}$,换算成酵母硒添加量为 0.15 g/kg (DM),巴西奥特奇公司惠赠)。产前 21 d 开始饲喂,分娩后停止饲喂。饲喂的基础日粮成分和营养水平见表 1 和表 2。在产前 21 d 和分娩后挤完初乳 6 h 内分别经尾静脉采集 5 mL 全血,EDTA 抗凝, $3\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,收集血浆, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。根据分组和采血时间点对样品进行编组:T21 和 T0 分别表示试验组产前 21 d 及分娩当天样品,C21 和 C0 分别

表示对照组产前 21 d 及分娩当天样品。

表 1 试验奶牛基础日粮的组成(干物质基础)
Table 1 Composition of basal diet (DM basis) for dairy cow g/kg

组成 Composition	含量 Content	组成 Composition	含量 Content
全株玉米青贮 Whole corn silage	54.8	棉粕 Cottonseed meal	3.7
燕麦草 Oat grass	19.6	玉米 Corn grain	8.2
银杏叶 Folium ginkgo	2.7	碳酸钙 CaCO ₃	0.3
菜粕 Rapeseed meal	2.7	氯化胆碱 Choline chloride	0.2
豆粕 Soybean grain	2.3	预混料 Premix	1.8
麦麸 Wheat bran	3.7	合计 Total	100.0

注:每公斤预混料含有维生素 A 800 000 IU,维生素 D₃ 180 000 IU,维生素 E 15 000 IU,维生素 B₁ 920 mg,维生素 B₂ 1 200 mg,维生素 B₁₂ 10 mg,烟酸 30 000 mg,铁 1 000 mg,铜 680 mg,锰 1 350 mg,锌 1 800 mg,镁 198 400 mg,钴 20 mg。
Note:One kg of premix contained the following: V_A 800 000 IU, V_{D₃} 180 000 IU, V_E 15 000 IU, V_{B₁} 920 mg, V_{B₂} 1 200 mg, V_{B₁₂} 10 mg, Nicotinic acid 30 000 mg, Fe 1 000 mg, Cu 680 mg, Mn 1 350 mg, Zn 1 800 mg, Mg 198 400 mg, Co 20 mg.

表 2 试验奶牛基础日粮的营养水平(干物质基础)
Table 2 Nutrient levels of the basal diet (DM basis) for dairy cow

项目 Item	营养水平 Nutrient levels	项目 Item	营养水平 Nutrient levels
泌乳净能/(MJ·kg ⁻¹) NE _L	5.49	酸性洗涤纤维/(g·kg ⁻¹) ADF	208.6
粗蛋白质/(g·kg ⁻¹) CP	209.7	钙/(g·kg ⁻¹) Ca	3.9
中性洗涤纤维/(g·kg ⁻¹) NDF	399.7	磷/(g·kg ⁻¹) P	3.1
淀粉/(g·kg ⁻¹) ST	251.6	干物质/(g·kg) DM	509.0

注:营养水平中泌乳净能为计算值,其他为实测值。
Note:NE_L is calculated,while others are measured.

1.2 血浆样品预处理

将采集的 48 份血浆样品在 4 ℃ 环境下缓慢解冻后,每份样品分别取 100 μL 血浆加入到 400 μL 预冷的甲醇-乙腈溶液(V(甲醇):V(乙腈)=1:1)中,涡旋混合,-20 ℃ 静置 60 min,10 000 r/min,4 ℃ 离心 20 min,取上清真空干燥,质谱分析时加入 100 μL 乙腈水溶液(V(乙腈):V(水)=1:1)复溶,涡旋,10 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,取上清液进样分析。样品预处理完成后送至上海中科新生命生物科技有限公司进行色谱-质谱分析。取等量样品混合用于制备质控(quality control, QC)样本,共设 6 个重复。通过对比 QC 样本经色谱-质谱系统检测后各代谢物的峰形状、分离度、保留时间和强度分布相似性,用以评价整个试验过程中仪器的稳定性和检测重复性。

1.3 UPLC-TOF/MS 分析

1.3.1 色谱条件 样品采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(UPLC)HILIC 色谱柱进行分离;柱温 25 ℃;流速 0.3 mL/min;进样量 2 μL;流动相 A:水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水,流动相 B:乙腈。梯度洗脱程序如下:0~1 min,95%B 相;1~14 min,B 相从 95%线性变化至 65%;14~16 min,B 相从 65%线性变化至 40%;16~18 min,B 相维持 40%;18.0~18.1 min,B 相

从 40%线性变化至 95%;18.1~23 min,B 相维持在 95%;整个分析过程中样品置于 4 ℃ 自动进样器中。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾电离,在正离子(ESI+)和负离子(ESI-)模式下进行检测。样品经 UPLC 分离后用 Triple TOF 5600 质谱仪(AB SCIEX)进行质谱分析。色谱分离后的 ESI 源条件如下:喷雾气(Gas1)0.41 MPa,辅助加热气(Gas2)0.41 MPa,气帘气(CUR)0.21 MPa,离子源温度 600 ℃,离子化电压±5 500 V(正负 2 种模式),TOF-MS 质量扫描范围 60~1 000 *m/z*,每 0.2 s 采集 1 次图谱,前体离子扫描范围 25~1 000 *m/z*,每 0.05 s 采集 1 次图谱,二级质谱由信息关联数据采集(IDA)获得,并采用高灵敏度模式,去簇电压±60 V(正负 2 种模式),碰撞能量(35±15) V。

1.4 数据处理与分析

原始数据经 ProteoWizard 转换成 mzXML 格式,然后采用 XCMS 程序进行峰对齐、保留时间校正并提取峰面积。对 XCMS 提取得到的数据,删除组内缺失值>50%的离子峰,应用 SIMCA-P 14.1 (Umetrics,Umea,Sweden)进行模式识别。数据经 Pareto-scaling 预处理后,进行无监督主成分分析(PCA)、有监督偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等多维

统计分析,以第 1 主成分和第 2 主成分为横、纵坐标绘制 PCA 得分图,用以判别组内样本聚集情况和组间样本分离趋势。建立 PLS-DA 模型,经 7 次循环交互验证得到模型评价参数 R_2Y 和 Q^2 (R_2Y 和 Q^2 分别为模型解释率和模型预测能力,是评估监督模型的重要参数),当 R_2Y 、 $Q^2 \geq 0.5$ 时,可判定模型稳定可靠。OPLS-DA 是在 PLS-DA 的基础上进行修正,滤除与分类信息无关的噪音,提高了模型的解析能力和有效性。用 OPLS-DA 对第 1、第 2 主成分进行建模,以第 1 主成分(预测主成分)和第 2 主成分(正交主成分)为横、纵坐标绘制 OPLS-DA 得分图,其中组间的差异最大化反映在预测主成分上,组内的变异反映在正交主成分上。使用单变量统计分析(t -检验和差异倍数(fold change,FC)分析)进行 2 组样本间的差异代谢物分析,显示两样本间代谢物变化的显著性。

1.5 差异代谢物筛选和鉴定

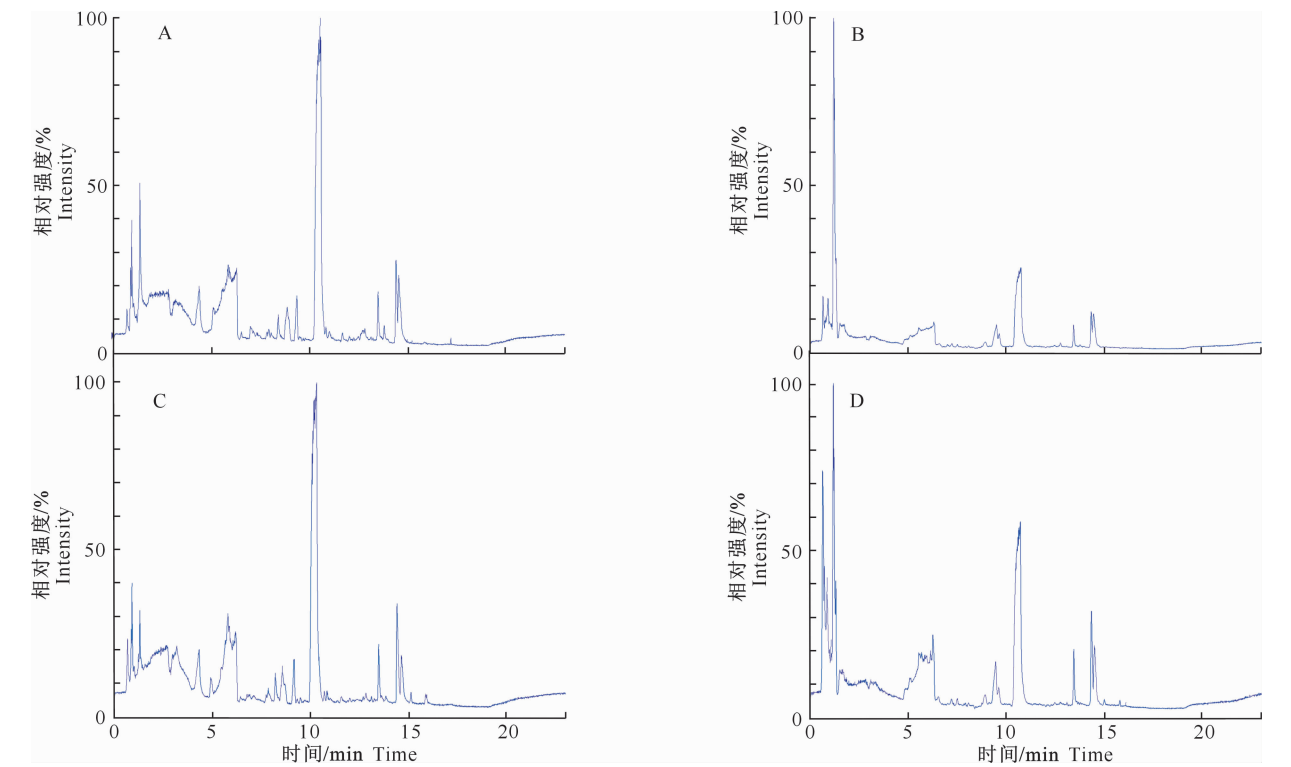
根据 OPLS-DA 模型得到的变量权重值(Variable Importance for the Projection,VIP),衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异代谢物。本试验以 $VIP>1$ 为筛选标准,初步筛选出各组间的

差异物。进一步采用单变量统计分析,验证差异代谢物是否具有显著性。选取 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的代谢物,作为显著性差异的代谢物;以 $VIP>1$ 且 $0.05<P<0.1$ 的代谢物,作为差异趋势性代谢物。采用精确质量数匹配(误差小于 2.5×10^{-5} (25 ppm))和二级谱图与自建本地库匹配的方法鉴定差异代谢物^[12]。

2 结果与分析

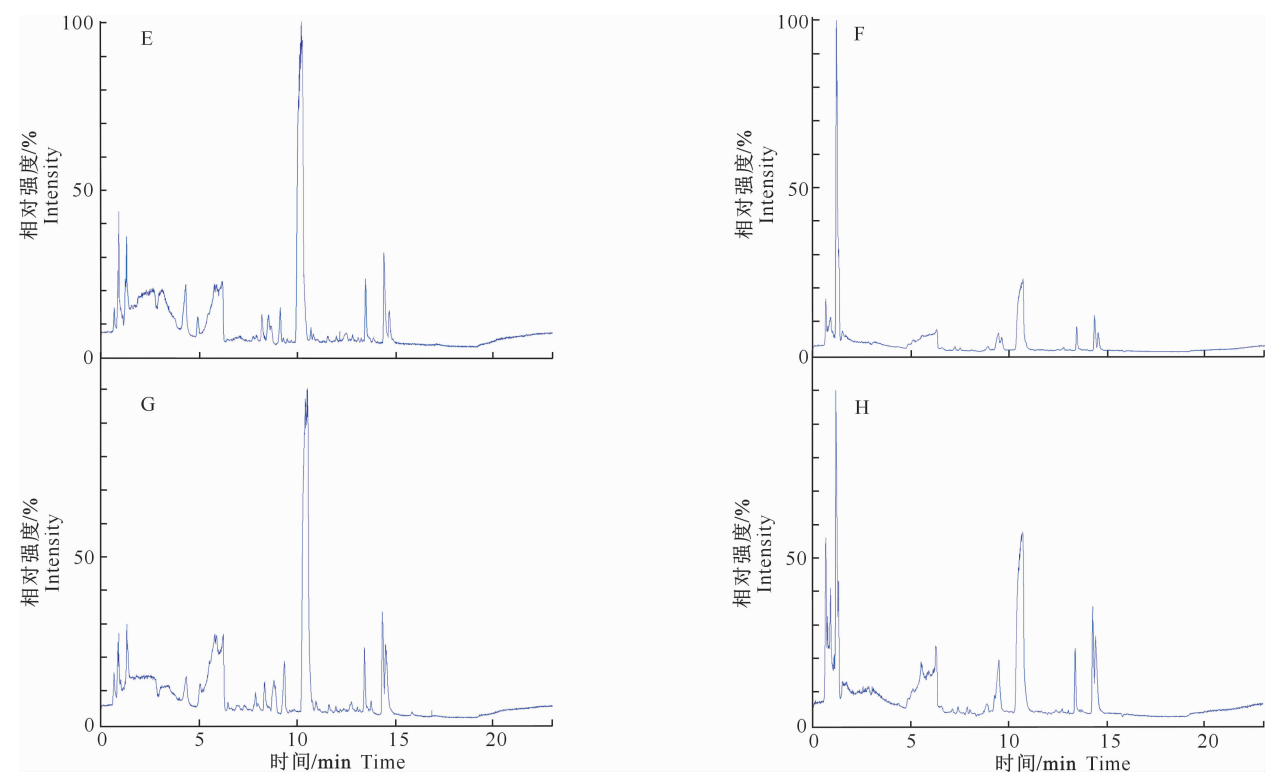
2.1 试验检测质量控制

将 QC 样本在正负模式下得到的总离子流图进行谱图重叠比较,可知各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠,说明在整个试验过程中仪器误差引起的变异较小。采用 XCMS 软件对代谢物离子峰进行提取,将所有试验样本和 QC 样本提取得到的峰,经 Pareto-scaling 预处理后进行主成分分析,发现本试验 QC 样本在正、负离子模式下紧密聚集在一起,表明本试验重复性好。由图 1 和 2 中各组样品在正负模式下总离子色谱图可知,每一个代谢物的离子峰形状完整且每个离子峰能够很好被分隔开,说明试验的色谱和质谱条件适合样品的检测与分析。



A,C. 正模式下 C0 组和 C21 组;B,D. 负模式下 C0 组和 C21 组
A,C. Group C0 and group C21 at positive mode;B,D. Group C0 and group C21 at negative mode

图 1 C0 和 C21 组在正负模式下的总离子色谱图
Fig. 1 Total ion chromatograms of group C0 or C21 at positive mode(ESI+) and negative mode(ESI-)



E、G. 正模式下 T0 组和 T21 组;F、H. 负模式下 T0 组和 T21 组
E、G. Group T0 and group T21 at positive mode;F、H. Group T0 and group T21 at negative mode

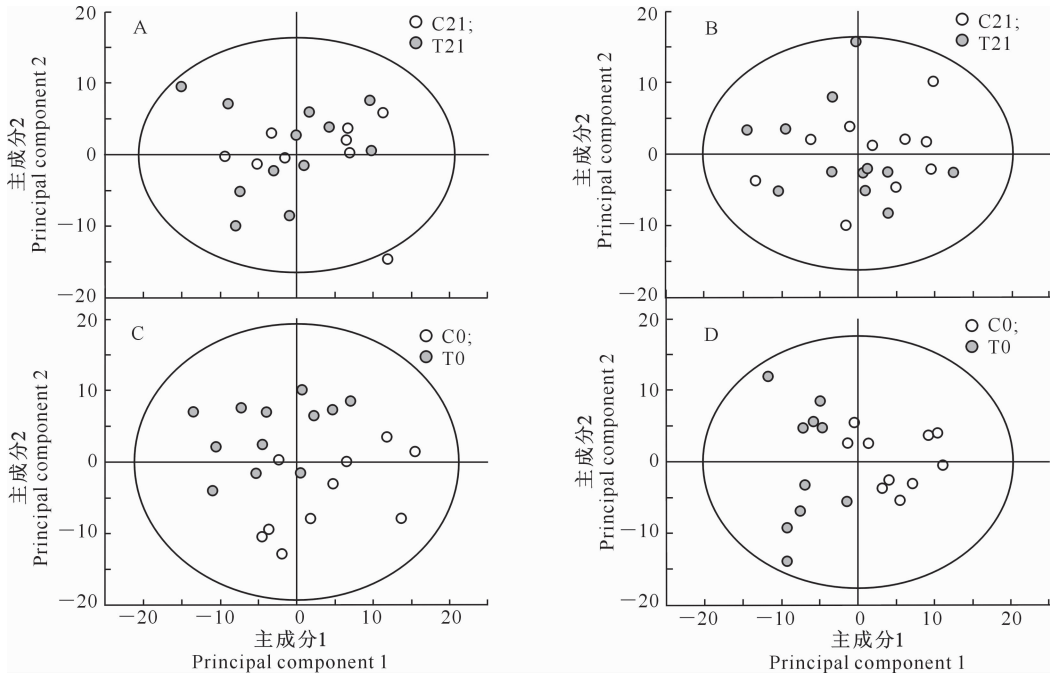
图 2 T0 和 T21 组在正负模式下的总离子色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of group T0 or T21 at positive mode(ESI+) and negative mode(ESI-)

2.2 多元统计学分析

PCA 得分图见图 3。

T21 和 C21 组及 T0 和 C0 组在正负模式下的



A、C. 正模式;B、D. 负模式 A、C. Positive mode;B、D. Negative mode

图 3 T21 和 C21 组及 T0 和 C0 组在正负模式下的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plots of T21 group or C21 group and T0 group or C0 group at positive mode(ESI+)and negative mode(ESI-)

由图 3 可知,在第 1 主成分和第 2 主成分维图上,正、负离子模式下 C21 与 T21 两组样本间分离趋势不明显,C0 与 T0 两组则呈现良好的分离趋势。

由图 4 可知,在正、负离子模式下 C21 与 T21 两组 OPLS-DA 建模参数分别是 $R^2Y=0.821$, $Q^2=-0.591$ 和 $R^2Y=0.833$, $Q^2=0.296$, Q^2 均小于

0.5,表明模型预测能力低,则模型无效;结合 PCA 分析表明,两组血浆中的代谢物差异不明显。C0 与 T0 两组在正、负模式下 R^2Y 分别为 0.987 和 0.970, Q^2 分别为 0.833 和 0.713, R^2Y 和 Q^2 均大于 0.5,表明模型解释率和预测能力高,模型稳定可靠。

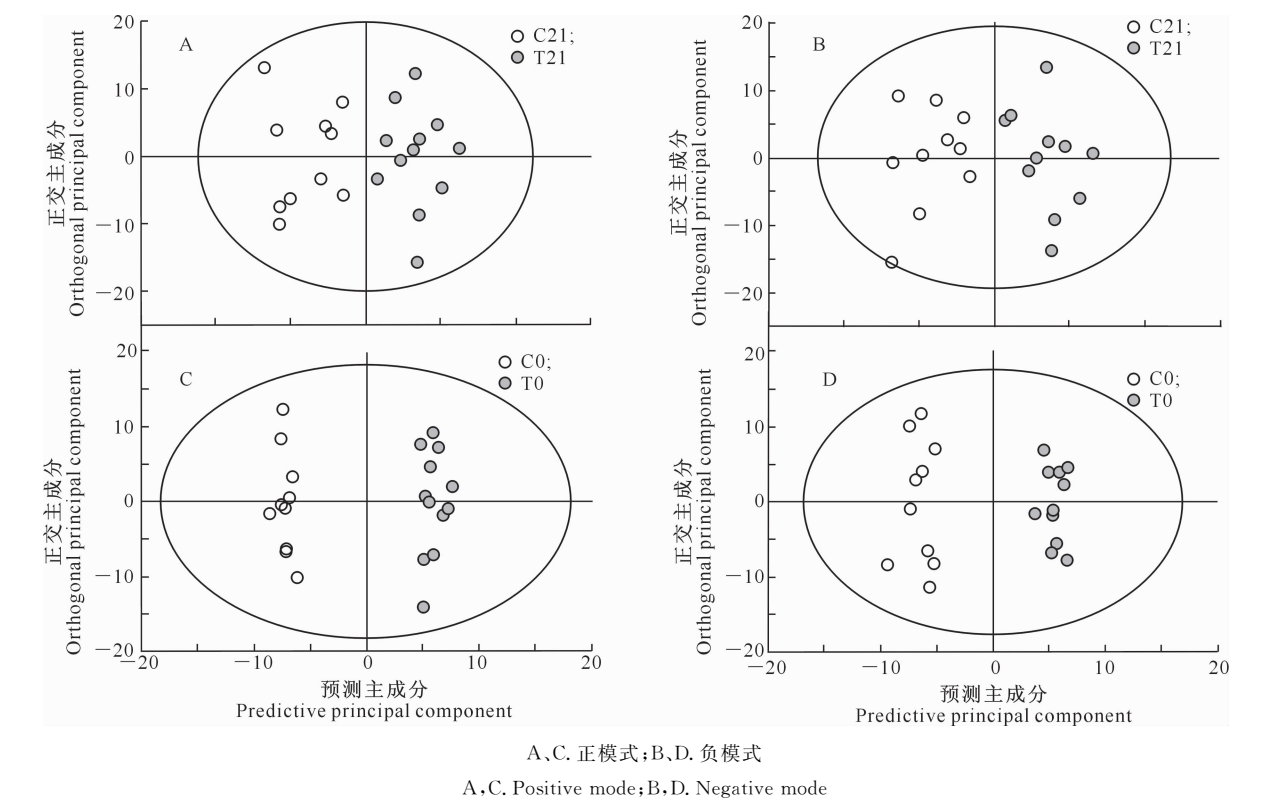


图 4 T21 和 C21 组及 T0 和 C0 组在正负模式下的 OPLS-DA 得分图
Fig. 4 OPLS-DA score plots of T21 group or C21 and group T0 group or C0 group at positive mode(ESI+)and negative mode(ESI-)

2.3 差异代谢物的筛选

根据 OPLS-DA 模型得到的 VIP 和 t 检验的 P 值,以 VIP 值 >1 且 $P<0.1$ 作为筛选差异代谢物条件,通过对筛选出的差异代谢物进行鉴定,共鉴定出 19 种差异代谢物,其中包括 13 种显著性差异代谢物。由表 3 可知,与对照组相比,饲喂酵母硒后奶牛血浆中 L -正亮氨酸、 DL -苯丙氨酸、乙二醇单乙醚和氧代己二酸呈降低趋势($0.05<P<0.1$), L -苯丙

氨酸、 L -亮氨酸、异亮氨酸、 L -谷氨酰胺、 L -缬氨酸、酪胺、酮亮氨酸和硫酸吡啶酚显著降低($P<0.05$); L -肌肽和苯乙酰甘氨酸呈升高趋势($0.05<P<0.1$),甜菜碱、7-甲基黄嘌呤、马尿酸、尿囊素和柠檬酸显著升高($P<0.05$)。这些差异代谢物涉及到氨基酸代谢、脂类代谢、尿嘌呤衍生物等生物化学反应过程。

表 3 T0 和 C0 组之间差异代谢物鉴定结果

类别 Category	代谢物 Metabolites	质荷比 m/z	保留时间/s Retention time	VIP	P	差异倍数 Fold difference	加合物 Adduct
氨基酸 Amino acid	L -正亮氨酸 L -Norleucine	263.196	501.708	1.183	0.055	0.733	(2M+H)+
	L -缬氨酸 L -Valine	116.073	560.059	2.113	0.035	0.812	(M-H)-
	L -亮氨酸 L -Leucine	130.088	483.557	5.639	0.005	0.710	(M-H)-
	异亮氨酸 L -Isoleucine	130.088	507.057	3.689	0.025	0.780	(M-H)-

Table 3 Identification of differential metabolites between T0 group and the C0 group

表 3(续) Continued Table 3

类别 Category	代谢物 Metabolites	质荷比 <i>m/z</i>	保留时间/s Retention time	VIP	<i>P</i>	差异倍数 Fold difference	加合物 Adduct
氨基酸衍生物 Amino acid derivatives	酮亮氨酸 Ketoleucine	129.057	74.710	7.724	0.041	0.821	(M-H)-
	<i>L</i> -肌肽 <i>L</i> -Carnosine	227.113	791.453	1.204	0.075	1.309	(M+H)+
	<i>L</i> -谷氨酰胺 <i>L</i> -Glutamine	145.063	700.169	2.669	0.028	0.838	(M-H)-
	<i>L</i> -苯丙氨酸 <i>L</i> -Phenylalanine	164.072	469.845	3.534	0.002	0.754	(M-H)-
	<i>DL</i> -苯丙氨酸 <i>DL</i> -Phenylalanine	331.164	465.454	1.325	0.055	0.811	(2M+H)+
	酪胺 Tyramine	120.080	465.700	3.250	0.037	0.832	(M+H-H ₂ O)+
	硫酸吲哚酚 Indoxyl sulfate	212.002	44.192	9.626	0.043	0.558	(M ₀ -H)-
	苯乙酰甘氨酸 Phenylacetylglycine	194.080	361.682	2.691	0.099	1.573	(M+H)+
脂类 Lipids	乙二醇单乙醚 2-Ethoxyethanol	151.095	110.646	1.196	0.094	0.784	(M+CH ₃ COO+2H)+
	氧代己二酸 2-Oxoadipic acid	181.009	623.816	1.142	0.072	0.761	(M+Na-2H)-
	柠檬酸 Citrate	210.060	892.724	1.374	0.042	1.791	(M+NH ₄)+
	马尿酸 Hippuric acid	180.065	369.522	2.670	0.027	1.387	(M+H)+
其他代谢物 Other metabolites	甜菜碱 Betaine	118.086	497.636	10.839	0.013	1.151	(M+H)+
	尿素素 Allantoin	159.050	329.215	2.067	0.041	1.204	(M+H)+
	7-甲基黄嘌呤 7-Methylxanthine	166.052	78.151	1.145	0.023	1.458	(M+H)+

注:差异倍数为 T0 组和 C0 组的均值比。当差异倍数大于 1,表示 T0 组含量高于 C0 组;差异倍数小于 1,表示 T0 组含量低于 C0 组。
Note:Fold difference was calculated as ratio of the average of T0 group to that of the C0 group. Fold difference greater than 1 indicates relatively higher concentration present in T0 group,whereas less than 1 means a relatively lower concentration as compared to the C0 group.

3 讨 论

3.1 硒对氨基酸代谢的影响

奶牛分娩过程中由于产道的损伤和微生物入侵,导致机体发生急性炎症反应,使得血液中急性期蛋白(acute phase protein,APP)水平增加,如血清淀粉样蛋白 A、结合珠蛋白和 C 反应蛋白^[2,13]。氨基酸是机体炎症反应过程中 APP、免疫球蛋白和其他促炎性蛋白合成的重要组成成分。Renko 等^[14]研究发现,硒能够减少 APP 的合成。苯丙氨酸是合成 APP 的重要氨基酸,作为一种主要的芳香族氨基酸,其代谢水平的降低可能会影响 APP 的活性。Sun 等^[15]通过代谢组学的方法发现,酮病奶牛血浆中的苯丙氨酸和谷氨酰胺含量高于健康奶牛,在肝脏代谢脂质生成 NEFA 的过程中,伴随着苯丙氨酸和谷氨酰胺代谢水平的提高。本试验发现,饲喂酵母硒后会引起奶牛血浆中苯丙氨酸和谷氨酰胺水平降低,这可能与硒具有减弱机体炎症反应和减少 NEFA 生成的作用有关^[16-17]。苯丙氨酸与酪胺参与酪氨酸和色氨酸生物合成过程,苯丙氨酸经羟化反应生成酪氨酸,酪氨酸在芳香族左旋氨基酸脱羟酶的作用下生成酪胺。王刚^[18]研究发现,产后卵巢静止奶牛血浆中苯丙氨酸和酪胺显著升高,这可能与产后 NEFA 水平升高有关,NEFA 升高对卵泡发育过程存在毒性作用。

本试验还发现,饲喂酵母硒组奶牛血浆中亮氨

酸和缬氨酸降低。亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是支链氨基酸,也是机体合成免疫球蛋白和其他免疫性蛋白的重要氨基酸,影响着免疫蛋白的活性和抗氧化能力^[19-21]。在氨基酸代谢衍生方面,本试验结果显示硒可能会促进肌肽的生成并降低硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)的代谢。肌肽是由 β-丙氨酸和 *L*-组氨酸组成的二肽,它能够抑制炎症细胞因子分泌和一氧化氮合成酶的活性^[22]。这可能与研究报道硒具有提高机体抗氧化能力有关^[23]。而 IS 是一种典型的蛋白类结合尿毒症毒素,它是在肠道菌群作用下由色氨酸生成吲哚,吲哚在肝脏中经氧化和硫酸化后生成。Yang 等^[24]和 Shimizu 等^[25]研究发现,IS 能够抑制 AMPK/UCP2 信号通路诱导氧化应激反应,并活化 NF-κB 通路促进炎症反应过程,这一过程与慢性肾病、心血管疾病发生有关。

3.2 硒对脂类代谢的影响

柠檬酸是三羧酸(TCA)循环的关键组成部分,是脂肪酸和甾醇生物合成的基质,是能量代谢的关键调节剂。柠檬酸盐是一种很好的螯合剂,它具有像 Ca²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺和 Mg²⁺等二价阳离子的生物学功能,在维持机体健康和促进发育上起到至关重要的作用^[26]。李卓卿^[27]研究发现,柠檬酸能提高奶牛的采食量和奶产量,从而提高生产性能。本试验发现,饲喂酵母硒能提高血浆中的柠檬酸水平,这可能是硒通过刺激三羧酸循环,促进奶牛在围产期采食量的恢复,降低因能量负平衡导致 NEFA 升高的风

险。

除此之外,在饲喂硒后,卵磷脂、乙二醇单乙醚和氧代己二酸含量降低,马尿酸含量增加。赖氨酸经酵母氨酸和哌啶酸途径代谢生成氧代己二酸,当赖氨酸、色氨酸和羟赖氨酸代谢错误时,会大大增加氧代己二酸的生成。而马尿酸主要在线粒体中合成,是由甘氨酸与苯甲酸在氨基转移酶的作用下生成。朱玉山等^[28]研究发现,亚硒酸钠会引起马尿酸代谢异常,这与肾小球的滤过和回收功能有关。

3.3 硒对其他代谢物的影响

甜菜碱是甘氨酸的三甲基衍生物,在肝脏和肾脏内进行内源性合成,在肾脏中主要作为一种渗透保护剂,而在肝脏中作为甲基供体参与肝脏代谢,主要起到保护肝脏、抗氧化和抗炎的作用^[29]。在炎症抑制方面,其可以降低一氧化氮合成酶和环氧合酶的活性,从而降低机体过氧化反应和促炎介质(类花生酸)的生成^[30]。Monteiro 等^[31]研究表明,甜菜碱能提高产后奶牛的泌乳性能和生产性能,其在机体中的水平与采食量呈正相关。本试验结果表明,添加酵母硒可能提高奶牛产食量,从而增加甜菜碱的摄入,并发挥着抗炎和抗氧化作用。张拴林等^[32]研究指出,硒影响尿嘌呤衍生物的代谢,在饲喂硒后能促进瘤胃发酵,使得动物从肠道中所吸收的嘌呤量增加,从而提高尿囊素含量。本试验还发现,饲喂酵母硒可引起血浆中尿囊素和 7-甲基黄嘌呤升高,这可能与硒能提高奶牛表观消化率有关^[33]。

4 结 论

本试验结果表明,在围产前期饲喂酵母硒可能影响氨基酸和氨基酸衍生物的代谢,在分娩后减少炎症相关蛋白的合成和降低机体氧化应激水平;与此同时,硒可能影响柠檬酸、甜菜碱和尿嘌呤衍生物等代谢,促进分娩后采食量的恢复,降低因 NEFA 含量升高带来的影响。除此之外,在此过程中也会影响卵磷脂、乙二醇单乙醚、氧代己二酸和马尿酸的代谢。

[参考文献]

[1] 李 鹏,龙 森,张 斌,等. 围产期奶牛炎症反应与营养代谢性疾病 [J]. 中国兽医杂志,2014,50(5):62-64.
Li P, Long M, Zhang Y, et al. Inflammation response and nutrition metabolized disease of transition dairy cows [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50(5): 62-64.

[2] Bradford B J, Yuan K, Farney J K, et al. Invited review: inflammation during the transition to lactation: new adventures with

an old flame [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(10): 6631-6650.

[3] Contreras G A, O'Boyle N J, Herdt T H, et al. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(6): 2508-2516.

[4] Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in cattle: a review [J]. Molecules, 2016, 21(4): 545.

[5] Weiss W P, Hogan J S. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(12): 4366.

[6] Rutigliano H M, Lima F S, Cerri R L A, et al. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(9): 3323-3336.

[7] Wei Z, Yao M, Li Y, et al. Dietary selenium deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse mastitis models [J]. Inflammation, 2014, 37(6): 1925-1931.

[8] National Research Council (USA). Nutrient requirements of dairy cattle [M]. Washington D C: National Academies Press, 2001: 141-142.

[9] Zhao Z, Barcus M, Kim J, et al. High dietary selenium intake alters lipid metabolism and protein synthesis in liver and muscle of pigs [J]. Journal of Nutrition, 2016, 146(9): 1625-1633.

[10] 雒国彬, 赵洪波, 文奇男, 等. 酵母硒对围产前期奶牛全血硒含量和血液抗氧化能力的影响 [J]. 中国饲料, 2010(16): 34-36.
Luo G B, Zhao H B, Wen Q N, et al. Effects of diet supplementation with Se-yeast on blood Se contents and anti-oxidation performance [J]. China Feed, 2010(16): 34-36.

[11] Sies H, Berndt C, Jones D P. Oxidative stress [J]. Annual Review of Biochemistry, 2017, 86(10): 715.

[12] Benton H P, Ivanisevic J, Mahieu N, et al. Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification global profiling [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(2): 884-891.

[13] 弓 剑, 晓 敏. 围产期奶牛炎症反应及其与免疫和能量代谢的关系 [J]. 动物营养学报, 2016, 28(9): 2667-2672.
Gong J, Xiao M. Inflammation periparturient dairy cows and its relationship immunity and energy metabolism [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(9): 2667-2672.

[14] Renko K, Hofmann P J, Stodter M, et al. Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice [J]. Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2009, 23(6): 1758.

[15] Sun L W, Zhang H Y, Wu L, et al. ¹H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(3): 1552-1562.

[16] 胡秀丽, 李体远, 姜熙罗, 等. 多不饱和脂肪酸对饲低硒粮大鼠血浆游离脂肪酸的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 1998(4):

- 204-205.
- Hu X L, Li T Y, Jiang X L, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on free fatty acids of rats fed on selenium deficient cereals [J]. Chinese Journal of Control of Endemic Disease, 1998(4):204-205.
- [17] 张鹏春,陈丽君,范瑞威,等. 亚硒酸钠保护游离脂肪酸诱导肝细胞功能和 Caspase 3 活性的变化研究 [J]. 中国饲料,2013(14):15-18.
- Zhang P C, Chen L J, Fan R W, et al. Effect of sodium selenite on liver function and the activity of Caspase 3 induced by free fatty acids [J]. China Feed, 2013(14):15-18.
- [18] 王 刚. 基于 LC/MS 联用技术的产后卵巢静止奶牛血浆代谢组学分析 [D]. 黑龙江大庆:黑龙江八一农垦大学,2017.
- Wang G. Plasma metabolomics analysis of postpartum inactive ovaries in dairy cows based on liquid chromatography/mass spectrometry technology [D]. Daqing, Heilongjiang: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017.
- [19] Haque M N, Rulquin H, Lemosquet S. Milk protein responses in dairy cows to changes in postruminal supplies of arginine, isoleucine, and valine [J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(1):420-430.
- [20] 苏伟鹏,徐 稳,张 昊,等. 日粮亮氨酸水平与宫内发育迟缓对断奶仔猪肝脏抗氧化功能的影响 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(19):345-351.
- Su W P, Xu W, Zhang H, et al. Effect of dietary concentrations of leucine and intrauterine growth retardation on antioxidant function in the liver of weaned piglets [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19):345-351.
- [21] 张军民,王连逸,高振川,等. 日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪抗氧化能力的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(2):105-109.
- Zhang J M, Wang L D, Gao Z C, et al. Effect of dietary glutamine supplementation on antioxidant capacity of tissue in the early-weaned piglets [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2002, 33(2):105-109.
- [22] Fleisherberkovich S, Abramovitchdahan C, Benshabat S, et al. Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation [J]. Peptides, 2009, 30(7):1306-1312.
- [23] 许宗运,张丽娟,韩俊文. 不同水平酵母硒对奶牛血液抗氧化能力的影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19(6):753-757.
- Xu Z Y, Zhang L J, Han J W. Effects of Se-yeast in dairy ration on somatic cell and anti-oxidation performance [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(6):753-757.
- [24] Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway [J]. Toxicology Letters, 2015, 234(2):110.
- [25] Shimizu H, Bolati D, Higashiyama Y, et al. Indoxyl sulfate up-regulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells [J]. Life Sciences, 2012, 90(13/14):525-530.
- [26] Westergaard N, Waagepetersen H S, Belhage B, et al. Citrate, a ubiquitous key metabolite with regulatory function in the CNS [J]. Neurochemical Research, 2017, 42(6):1583.
- [27] 李卓卿. 有机酸及甜味剂组合对奶牛生产性能的影响 [D]. 吉林长春:吉林农业大学,2005.
- Li Z Q. Effect of supplement organic acids and sweeteners on production performance of dairy cows [D]. Changchun, Jilin: Jilin Agricultural University, 2005.
- [28] 朱玉山,徐辉碧,黄开勋,等. 亚硒酸钠对大鼠代谢产物影响的核磁共振研究 [J]. 分析科学学报, 2004, 20(1):44-47.
- Zhu Y S, Xu H B, Huang K X, et al. Effect of selenite at UL on the metabolites in rat urine by ^1H NMR spectroscopy [J]. Journal of Analytical Science, 2004, 20(1):44-47.
- [29] Day C R, Kempson S A. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(6):1098-1106.
- [30] Ahn M, Park J S, Chae S, et al. Hepatoprotective effects of lycium chinense miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats [J]. Acta Histochemica, 2014, 116(6):1104-1112.
- [31] Monteiro A P A, Bernard J K, Guo J R, et al. Effects of feeding betaine-containing liquid supplement to transition dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 100(2):1063-1071.
- [32] 张拴林,袁 霞,徐亚光,等. 硒和维生素 E 对西门塔尔牛瘤胃发酵和尿嘌呤衍生物含量的影响 [J]. 动物营养学报, 2013, 25(2):326-333.
- Zhang S L, Yuan X, Xu Y G, et al. Effects of selenium and vitamin E on rumen fermentation and urinary purine derivative contents in simmental steers [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(2):326-333.
- [33] 张丽娟,姚 鹃,谭 斌,等. 奶牛日粮中不同水平酵母硒对表观消化率的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(8):66-68.
- Zhang L J, Yao J, Tan B, et al. Effects of different supplementary concentration Se-yeast in dairy ration on digestibility [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 34(8):66-68.