

谷氨酰胺对动物肠道结构及机能影响的研究进展

张柏林, 刘宁, 李春涛, 何臻, 宋培勇, 王庆容 (遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义 563006)

摘要 肠道不仅是养分消化吸收的重要场所,也是机体重要的免疫屏障,肠道的健康水平决定着动物的机能状态。谷氨酰胺(Gln)是肠道能量代谢基质,在促进肠道上皮细胞增殖、维持肠道结构和功能完整性方面发挥重要作用。综述了Gln对动物肠道生长发育及功能的影响,为进一步研究Gln对肠道健康和功能的调控机制提供参考依据。

关键词 谷氨酰胺;肠道健康;生长发育;调控机制

中图分类号 S816.11 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)31-0106-03

Research Progress on the Effects of Glutamine on Intestinal Structure and Function of Animal

ZHANG Bo-lin, LIU ning, LI Chun-tao et al (College of Biological and Agricultural Technology, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563006)

Abstract Intestine is not only an important site responsible for digestion and absorption of nutrients, but also an important immune barrier. The function state of animals is determined by intestine health. Glutamine(Gln), a substrate for intestine metabolism, plays an important roles in promoting intestinal epithelial proliferation and maintaining the structure and functions of intestinal mucosa. This paper reviewed the effects of Gln on intestinal development and functions, which will provide references for further investigation for the regulation and mechanism of Gln on intestine tract health and functions.

Key words Glutamine; Intestine health; Development; Regulation mechanism

肠道不仅是机体养分消化吸收的主要场所,也是机体重要的免疫器官^[1]。肠黏膜屏障由肠道黏膜上皮细胞、细胞间紧密连接等构成,使日粮养分、电解质及水分能够通过肠腔进入血液循环,而阻止外源致病菌和毒素的侵入^[2]。谷氨酰胺(glutamine, Gln)是血液中含量最丰富的氨基酸,占整个机体氨基酸氮源的30%~35%^[3]。传统营养理论认为Gln是营养性非必需氨基酸。但在应激条件下,机体合成Gln水平下降,Gln成为机体的条件性必需氨基酸^[4]。Gln是肠道的主要能量代谢基质,在组织器官代谢及养分转运过程起着重要的作用^[5]。前期大量研究表明,日粮中添加Gln能够促进肠道黏膜上皮细胞的增殖和分化,维持仔猪肠道发育和结构完整,提高机体营养物质吸收及肠道免疫机能^[6-8]。因此,综述了Gln在肠道中的代谢、Gln对动物肠道生长发育的调控、消化吸收及免疫功能的影响,为下一步研究提供思路。

1 Gln在肠道中的代谢

在鼠空肠制备液中研究发现,大约有40%的CO₂来源于Gln氧化代谢产生^[9]。当日粮蛋白进入肠道后,日粮中的Gln被肠上皮细胞吸收,并且大量的Gln被肠道上皮细胞利用^[10],只有极少数的Gln能够进入血液循环。Wu等^[11]研究表明,大约70%的Gln在肠道首过代谢中被小肠上皮细胞分解代谢。Gln为肠道供能主要是由于2个方面:一方面是肠上皮细胞中存在对Gln具有高亲和性的转运系统;另一方面是肠道细胞中谷氨酰胺酶(glutaminase, GA)的活性较高,因而能够快速利用Gln^[12]。Gln在GA及谷氨酸脱氢酶的作用

下生成 α -酮戊二酸。 α -酮戊二酸经三羧酸循环产生苹果酸,苹果酸再在苹果酸酶的作用下生成丙酮酸,后在谷丙转氨酶的作用下生成丙氨酸,而丙氨酸主要通过肝门静脉进入肝脏^[9]。除了作为肠道上皮细胞能量来源,Gln还是嘌呤及嘧啶合成的前体,从而为上皮细胞中核酸的合成提供原料。

2 Gln对肠道的作用及机制

2.1 肠道上皮细胞增殖 哺乳动物肠道上皮细胞每2~3 d进行一次更新和周转,从而维持肠黏膜的稳态^[13]。肠道细胞这种持续快速的更新过程需要机体较高养分及能量供应。Gln是小肠上皮细胞的“燃料”,产生ATP用以维持小肠细胞生长和增殖。上皮细胞的增殖表现为细胞数量的增多、蛋白质及DNA含量增加等。Demarco等^[14]研究表明,体外培养液中添加0.06~1.06 mmol/L Gln可显著增加细胞数量、蛋白质含量和DNA含量。利用³[H]胸苷进一步研究发现,与0.06 mmol/L Gln添加组相比,0.46 mmol/L Gln添加显著增加了细胞DNA中³[H]胸苷,表明一定范围内较高浓度的Gln有利于提高细胞的增殖速率。谢建新等^[15]研究也得到了类似的结果,其研究发现,Gln促进了小肠上皮黏膜细胞DNA含量的增加和S期细胞的增多,提高了增殖细胞核抗原(DNA多聚酶 σ 的辅酶蛋白,反映细胞增殖程度)的表达,促进了肠黏膜上皮细胞的增殖。

细胞生长依赖于蛋白合成与降解的平衡。临床研究表明,日粮添加适当浓度的Gln或Gln二肽有助于改善机体的蛋白平衡状态,表现为蛋白合成的增加或蛋白降解的降低^[3]。Xi等^[16]体外试验研究结果表明,在培养液中添加0.5和2.0 mmol/L Gln均能显著增加猪小肠上皮细胞的蛋白合成。利用蛋白免疫印迹进一步研究显示,Gln激活了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路,增加了磷酸化mTOR,磷酸化真核生物起始因子4E结合蛋白-1及磷酸化核糖体蛋白激酶1的蛋白表达丰度,

基金项目 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2016]258);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2017]1205);遵义师范学院博士启动基金(遵师BS[2015]11号);贵州省普通高等学校产学研合作示范基地(黔教科合KY[2015]343号);贵州省科技厅联合基金项目(黔科合LH字[2015]7040号)。

作者简介 张柏林(1981—),男,山东烟台人,副教授,博士,从事动物营养调控研究。

收稿日期 2017-09-28

引发肽链合成起始,促进蛋白合成的增加^[17]。体外试验研究表明,添加 Gln 能够显著降低肠上皮细胞蛋白降解。机体蛋白降解的途径主要为溶酶体途径、钙蛋白酶途径及泛素-蛋白酶体途径^[18]。Coëffier 等^[19]研究表明,静脉注射 Gln 显著降低了泛素蛋白的 mRNA 表达水平,但对组织蛋白酶-D(溶酶体系统主要的天冬氨酸蛋白酶)和 m-钙蛋白酶却没有影响。表明 Gln 可能通过泛素-蛋白酶体途径介导了肠道黏膜上皮细胞的降解过程。

2.2 肠道形态 小肠是机体营养物质消化吸收的主要器官。肠道黏膜上皮层和固有膜向肠腔凸起形成许多突出的皱襞,皱襞上许多伸向肠腔的绒毛。小肠的吸收能力很大程度上依赖于肠道绒毛的存在^[20]。小肠肠绒毛高度、隐窝深度及绒毛高度/隐窝深度比值可以反映黏膜细胞的代谢水平,是衡量小肠细胞功能的重要指标^[21]。关于 Gln 对仔猪肠道绒毛发育影响的研究结果较为一致。Lee 等^[22]对 21 日龄断奶仔猪研究发现,日粮添加 Gln 显著增加了仔猪十二指肠绒毛高度,降低了绒毛高度/隐窝深度比值,这与 Kitt 等^[23]、Wang 等^[24]的研究结果相一致。但 Gln 在肉鸡上的研究结果却并不一致。早期在肉鸡上的研究证实,日粮添加 Gln 能够显著促进肉鸡肠道的生长发育,表现为肠道绒毛高度的增加,隐窝深度降低^[8,25]。戴四发等^[26]的研究却得到了不同的结果,其选用艾维茵肉仔鸡为研究对象,分别在其日粮中添加 0%、0.4% 及 0.8% Gln,饲喂 28 d 后发现,日粮添加 0.4% Gln 显著增加了 4 周龄时肠道绒毛高度,降低了隐窝深度,但 0.8% Gln 对 4 周龄肉鸡的绒毛高度却没有影响。这意味着较低浓度的 Gln 可能更有利于促进早期肉仔鸡肠道的生长发育,而高剂量的 Gln 反而影响了肠道的生长。

2.3 肠道吸收功能和消化酶活性 D-木糖是一种能被小肠吸收、但不能被消化利用的戊糖。D-木糖吸收试验是用来评价肠道吸收功能的一项常规试验^[27]。研究发现,小肠绒毛高度降低、隐窝深度增加及肠道消化酶活性下降往往伴随着仔猪对 D-木糖吸收能力的下降^[28]。Hsu 等^[29]研究发现,日粮添加 1% 及 2% Gln 均显著增加了仔猪十二指肠及空肠绒毛高度。进一步进行木糖吸收试验发现,1% 及 2% Gln 添加增加了血浆中木糖的浓度,改善了肠道的吸收功能。刘艳芬等^[8]的研究也得到相似的结果,其研究发现,日粮添加 0.2% Gln 显著增加了肉仔鸡血浆木糖浓度,改善肠道吸收功能。

外分泌腺分泌的酶对于消化道中大分子营养物质消化具有重要的作用。去除胰腺易引起机体消化不良及严重的营养问题。研究表明,日粮成分改变影响胰腺胰蛋白酶的合成及分泌^[30]。Gln 是胰腺外分泌细胞重要的底物,在维持和促进胰腺功能方面发挥重要的作用。前期研究表明,Gln 或 Ala-Gln 能够增加胰腺中胰蛋白酶含量^[31-32]及空肠胰蛋白酶活性^[33]。黄晓亮等^[34]在肉鸡上的试验表明,日粮添加 0.2% Gln 显著提高了肉鸡十二指肠蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性及胰蛋白酶活性。以上研究结果表明,Gln 对胰腺分泌及肠道消化酶活性具有一定的促进作用。

2.4 肠道黏膜屏障 肠道结构和功能的完整性由肠道黏膜屏障来维持。肠黏膜屏障能够防止毒素、过敏原及病原菌从肠腔进入血液,从而有效地维持肠道健康^[35]。肠黏膜机械屏障主要由肠上皮细胞及相邻上皮细胞间的连接结构组成。相邻上皮细胞间的连接方式包括紧密连接、缝隙连接、黏附连接和桥粒等^[36]。紧密连接蛋白包括一系列跨膜蛋白如闭锁蛋白(Occludin)、Claudin 家族蛋白、连接粘附分子(Junctional adhesion molecules, JAMS)及紧密连接蛋白-1(Zonula occludens protein-1, ZO-1)、紧密连接蛋白-2(Zonula occludens protein-2, ZO-2)及紧密连接蛋白-3(Zonula occludens protein-3, ZO-3),这些紧密连接蛋白在维持黏膜功能方面发挥重要作用^[37]。O'Dwyer 等^[38]研究发现,在全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)液中添加 Gln 显著抑制由于饥饿引起的肠道重量的下降及肠道上皮细胞自吞噬的发生。进一步的研究发现,Gln 可能通过增加应激条件下肠道黏膜紧密连接蛋白的表达而参与应激条件下肠道黏膜的修复^[39]。Wang 等^[24]在猪小肠上皮细胞培养基中添加 2 mmol/L Gln,进行蛋白免疫印迹试验后发现,Gln 显著增加了 claudin-3、claudin-4、连接粘附分子 A(Junctional adhesion molecule A, JAM-A)及外周膜蛋白(ZO-1、ZO-2 及 ZO-3)等紧密连接蛋白的表达水平,并且 Gln 的这种作用受钙调蛋白激酶-腺苷酸活化蛋白激酶(Calcium/calmodulin dependent protein kinase 2-AMP-activated protein kinase, CaMKK2-AMPK)信号的介导。

2.5 肠道免疫机能 肠道不仅是养分消化吸收和利用的主要器官,也是机体重要的免疫器官。研究表明,Gln 是免疫细胞如淋巴细胞及肥大细胞必需的能量来源,鼠免疫细胞所需能量大约有 40% 来源于 Gln。Gln 能够提高免疫细胞的功能,如 T 淋巴细胞增殖、B 淋巴细胞分化及肥大细胞自吞噬^[4,40]。Gln 在免疫细胞中氧化的机率很低。大部分的 Gln 通过三羧酸循环转化为谷氨酸、天冬氨酸及乳酸,从而促进淋巴细胞增殖^[41]。此外,Gln 还是嘌呤及嘧啶合成的前体,这些物质为上皮细胞快速增殖中核酸的合成提供原料。周荣艳^[42]利用肠道淋巴结细胞为研究对象,在体外培养液中添加 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mol/L Gln 后发现,当 Gln 浓度在 0.25~2.00 mol/L 时,淋巴细胞的增殖与 Gln 浓度呈剂量-效应增强的关系。邹晓庭^[43]研究发现,日粮添加 1% Gln 显著促进仔猪 T 淋巴细胞分化,显著增加了仔猪断奶 20 d 后肠淋巴细胞中白介素-2(Interleukin-2, IL-2)含量。这些结果表明,Gln 可能通过促进肠道淋巴细胞等的增殖,增强肠道黏膜免疫功能。

肠道免疫功能中起主要作用的是浆细胞分泌的免疫球蛋白 A(Immunoglobulin A, IgA)。其中,分泌型免疫球蛋白 A(Secretory immunoglobulin A, SIgA)是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白,对抵御病原菌在肠道上皮的定植,抑制细菌增殖和中和毒素,调节肠道的炎症反应,维持肠道的稳态有着重要的作用^[44]。Fan 等^[45]在小鼠上的试验结果表明,与注射生理盐水组相比,尾静脉注射 Gln 有效提高了肠道固

有层 IgA 浆细胞数量。Gln 缺乏能明显降低肠黏膜细胞中 SIgA 含量,影响肠黏膜固有层和肠系膜淋巴结细胞的增殖,进而降低肠道的免疫功能^[46]。另外,免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 和免疫球蛋白 M (Immunoglobulin G, IgM) 也能与肠道中补体、溶酶体等一起共同完成肠道的免疫保护作用。在免疫刺激条件下, Gln 在维持和促进淋巴细胞功能中发挥重要作用。前期研究表明, Gln 或 Ala - Gln 能够显著增加 LPS 应激仔猪肠道黏膜中 IgG 和 IgM 含量^[47], 增加仔猪空肠黏膜 SIgA 含量^[48]。SIgA 的作用是阻止细菌对肠上皮细胞表面的粘附和定植。因此, Gln 可能通过促进 SIgA 分泌来完成减少细胞易位的发生。

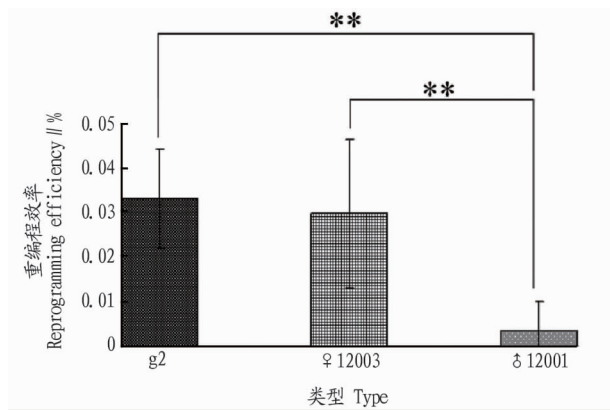
3 结语

综上所述, Gln 通过在肠道中代谢为上皮细胞的生长提供能量,在维持肠道结构和功能、提高肠道消化酶活性、参与肠道黏膜损伤后的修复及增强机体的免疫机能等方面发挥重要作用。但工业合成的 Gln 的价格较高,限制其在畜禽饲料中的广泛应用,因而开发一种价格低廉的饲料级 Gln 是推动 Gln 在畜禽饲料中大量应用的重要前提。目前有关 Gln 对肠道生长发育和功能影响的研究主要集中在单一 Gln 添加水平上,而对 Gln 与其他功能性氨基酸联合添加的研究还较少。因此,研究 Gln 与其他功能性氨基酸联合添加是否具有协同或拮抗作用,并深入到分子水平进一步揭示其作用机制应成为该领域科研工作者关注的目标。

参考文献

- [1] WANG H, ZHANG C, WU G Y, et al. Glutamine enhances tight junction protein expression and modulates corticotropin releasing factor signaling in the jejunum of weanling piglets [J]. *Journal of nutrition*, 2015, 145 (1): 25 - 31.
- [2] JACOBI S K, ODLE J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3 (5): 687 - 696.
- [3] WU G Y. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition [J]. *Amino Acids*, 2009, 37 (1): 1 - 17.
- [4] NEWSHOLME P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? [J]. *Journal of nutrition*, 2001, 131 (S9): 2515 - 2522.
- [5] RHOADS J M, WU G Y. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine [J]. *Amino acids*, 2009, 37 (1): 111 - 122.
- [6] WANG W W, QIAO S Y, LI D F. Amino acids and gut function [J]. *Amino acids*, 2009, 37 (1): 105 - 110.
- [7] WANG B, WU G Y, ZHOU Z G, et al. Glutamine and intestinal barrier function [J]. *Amino acids*, 2015, 47 (10): 2143 - 2154.
- [8] 刘艳芬, 马建升, 黄晓亮. 谷氨酰胺对肉仔鸡小肠发育及吸收功能的影响 [J]. *中国农业通报*, 2006, 22 (8): 39 - 43.
- [9] NEWSHOLME P, PROCOPIO J, LLAMA M M R, et al. Glutamine and glutamate: Their central role in cell metabolism and function [J]. *Cell biochemistry and function*, 2003, 21 (1): 1 - 9.
- [10] SOUBA W W, WILMORE D W. Postoperative alteration of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract [J]. *Surgery*, 1983, 94 (2): 342 - 350.
- [11] WU G Y. Intestinal mucosal amino acid catabolism [J]. *Journal of nutrition*, 1998, 128 (8): 1249 - 1252.
- [12] SOUBA W W. Glutamine: A key substrate for the splanchnic bed [J]. *Annual review of nutrition*, 1991, 11 (1): 285 - 308.
- [13] CAMILLERI M, MADSEN K, SPILLER R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24 (6): 503 - 512.
- [14] DEMARCO V, DYESS K, STRAUSS D, et al. Inhibition of glutamine synthetase decreases proliferation of cultured rat intestinal epithelial cells [J]. *J Nutr*, 1999, 129 (1): 57 - 62.
- [15] 谢建新, 顾岩, 赵淑民, 等. GH 和附加 Gln 肠外营养联合应用对短肠

- 大鼠小肠黏膜上皮细胞分裂增殖能力的影响 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2002, 29 (3): 165 - 168.
- [16] XI P B, JIANG Z Y, DAI Z L, et al. Regulation of protein turnover by L-glutamine in porcine intestinal epithelial cells [J]. *Journal of nutritional biochemistry*, 2012, 23 (8): 1012 - 1017.
- [17] FUMAROLA C, MONICA S L, GUIDOTTI G G. Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Role of glutamine and of cell shrinkage [J]. *Journal of cellular physiology*, 2005, 204 (1): 155 - 165.
- [18] POLGE C, LEULMI R, JARZAGUET M, et al. UBE2B is implicated in myofibrillar protein loss in catabolic C2C12 myotubes [J]. *Journal of cachexia sarcopenia and muscle*, 2016, 7 (3): 377 - 387.
- [19] COËFFIER M, CLAEYSSENS S, HECKETSWEILER B, et al. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285 (2): 266 - 273.
- [20] MILLER A L. Therapeutic considerations of L-glutamine: A review of the literature [J]. *Altern Med Rev*, 1999, 4 (4): 239 - 248.
- [21] 张敏, 邹晓庭, 孙雅丽. 外源性谷氨酰胺对艾维茵肉仔鸡生长性能和肠发育的影响 [J]. *中国畜牧学报*, 2009, 45 (9): 32 - 36.
- [22] LEE D N, CHENG Y H, WU F Y, et al. Effect of dietary glutamine supplement on performance and intestinal morphology of weaned pigs [J]. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 2003, 16 (12): 1770 - 1776.
- [23] KITTS S J, MILLER P S, LEWIS A, et al. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs [R]. London: University of Nebraska, 2002: 29 - 32.
- [24] WANG B, WU Z L, JI Y, et al. L-Glutamine enhances tight junction integrity by activating caMK kinase 2-AMP-activated protein kinase signaling in intestinal porcine epithelial Cells [J]. *The journal of nutrition*, 2016, 146 (3): 501 - 508.
- [25] 路静, 李文立, 姜建阳, 等. 谷氨酰胺对肉鸡小肠组织结构和吸收能力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2012, 24 (2): 291 - 300.
- [26] 戴四发, 李如兰, 闻爱友, 等. 外源性谷氨酰胺对肉仔鸡十二指肠组织结构的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2007, 22 (2): 104 - 108.
- [27] VENNER M, OHNESORGE B. Glucose and D-xylose absorption test for diagnosis of malabsorption in the horse [J]. *Tierärztliche praxis ausgabe grosstiere nutztiere*, 2001, 29 (4): 256 - 259.
- [28] HAMPSON D J, SMITH W C. Influence of creep feeding and dietary intake after weaning on malabsorption and occurrence of diarrhoea in the newly weaned pig [J]. *Research in veterinary science*, 1986, 41 (1): 63 - 69.
- [29] HSU C B, HUANG H J, WANG C H, et al. The effect of glutamine supplement on small intestinal morphology and xylose absorptive ability of weaned piglets [J]. *African journal of biotechnology*, 2010, 9 (41): 7003 - 7008.
- [30] BRANNON P M. Adaptation of the exocrine pancreas to diet [J]. *Annual review of nutrition*, 1990, 10 (1): 85 - 105.
- [31] HELTON W S, SMITH R J, ROUNDS J, et al. Glutamine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during elemental feeding [J]. *Journal of surgical research*, 1990, 48 (4): 297 - 303.
- [32] 王连娣, 张军民, 高振川, 等. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪胰腺及小肠胰蛋白酶活性的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23 (1): 59 - 61.
- [33] 张柏林. Ala-Gln 对仔猪氨基酸营养利用的影响及其作用机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [34] 黄晓亮, 刘艳芬, 廖建财, 等. 谷氨酰胺对肉鸡肠道发育及小肠消化酶活性的影响 [J]. *中国饲料*, 2009 (14): 38 - 41.
- [35] ARRIETA M C, BISTRITZ L, MEDDINGS J B. Alterations in intestinal permeability [J]. *Gut*, 2006, 55 (10): 1512 - 1520.
- [36] 邓宸莹. Ala-Gln 对断奶仔猪小肠黏膜屏障功能和吸收功能的调控作用 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- [37] SUZUKI T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70 (4): 631 - 659.
- [38] O'DWYER S T, SMITH R J, HWANG T L, et al. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition [J]. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 1989, 13 (6): 579 - 585.
- [39] LI N, LEWIS P, SAMUELSON D, et al. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins [J]. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 2004, 287 (3): 726 - 733.
- [40] YEH S L, YEH C L, LIN M T, et al. Effects of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on cytokine production and T cell population in septic rats [J]. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 2001, 25 (5): 269 - 274.



注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$)

图 3 山羊体细胞重编程效率的比较

Fig. 3 Reprogramming efficiency comparison of goat fibroblast cells

程中,外源基因整合到体细胞的基因组中;在体外,因为核移植的操作对细胞产生伤害和应激等,会导致转基因克隆动物发生异常。因此,该研究使用慢病毒为载体将转基因克隆山羊体细胞重编程为 iPSCs,作为下一步生产克隆羊的供体细胞,以期提高克隆羊的克隆率及克隆质量。

iPSCs 有多种方法来评估重编程的效率,从实际操作角度来看,大多数研究人员使用克隆计数这种方法统计重编程的效率^[21]。该研究采用碱性磷酸酶活性染色与克隆计数相结合的方法统计重编程效率,获得了更为准确的山羊成纤维细胞的重编程效率。使用转基因克隆山羊耳成纤维细胞 (tgFs) 重编程后获得的 AKP 阳性克隆数显著低于使用奶山羊耳成纤维细胞重编程后获得的 AKP 阳性克隆数 ($P < 0.01$)。与普通奶山羊耳成纤维细胞相比,使用 tgFs 进行重编程要困难的多。大多数 tgFs 重编程后产生克隆会发生快速的分化,这可能与转基因羊的供体细胞经过基因改造,外源基因整合到体细胞的基因组中,导致其重编程机制发生改变造成的。

参考文献

- [1] REN J T, PAK Y J, HE L X Z, et al. Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming [J]. *Cell Res*, 2011, 21: 849–853.
- [2] BAO L, HE L X Z, CHEN J J, et al. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors [J]. *Cell Res*, 2011, 21(4): 600–608.

- [3] LI Y, CANG M, LEE A S, et al. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors [J]. *PLoS One*, 2011, 6: 1–8.
- [4] LIU J, BALEHOSUR D, MURRAY B, et al. Generation and characterization of reprogrammed sheep induced pluripotent stem cells [J]. *Theriogenology*, 2012, 77(2): 338–346.
- [5] DENG Y F, LIU Q Y, LUO C, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(13): 2485–2494.
- [6] HAN X P, HAN J Y, DING F R, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells [J]. *Cell Res*, 2011, 21: 1509–1512.
- [7] HUANG B, LI T, ALONSO-GONZALEZ L, et al. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): 1–14.
- [8] ESTEBAN M A, XU J Y, YANG J Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634–17640.
- [9] EZASHI T, TELUGU B P, ALEXENKO A P, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(27): 10993–10998.
- [10] FAN N N, CHEN J J, SHANG Z C, et al. Piglets cloned from induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Res*, 2013, 23: 162–166.
- [11] WU Z, CHEN J J, REN J T, et al. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system [J]. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1: 46–54.
- [12] LIU K, JI G Z, MAO J, et al. Generation of porcine-induced pluripotent stem cells by using OCT4 and KLF4 porcine factors [J]. *Cell reprogram*, 2012, 14(6): 505–513.
- [13] MONTERRAT N, DE OÑATE L, GARRETA E, et al. Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1 [J]. *Cell transplantation*, 2012, 21(5): 815–825.
- [14] RIDEOUT W M III, WAKAYAMA T, WUTZ A, et al. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning [J]. *Nat Genet*, 2000, 24: 109–110.
- [15] KEEFER C L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models [J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82/83: 5–12.
- [16] DONOVAN D M, KERR D E, WALL R J. Engineering disease resistant cattle [J]. *Transgenic Res*, 2005, 14(5): 563–567.
- [17] WALL R J, POWELL A M, PAAPE M J, et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Nat biotechnol*, 2005, 23(4): 445–451.
- [18] ZHOU S, DING C, ZHAO X, et al. Successful generation of cloned mice using nuclear transfer from induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Res*, 2010, 20: 850–853.
- [19] KOU Z H, KANG L, YUAN Y, et al. Mice cloned from induced pluripotent stem cells (iPSCs) [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(2): 238–243.
- [20] WAN Y J, ZHANG Y L, ZHOU Z R, et al. Efficiency of donor cell preparation and recipient oocyte source for production of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin [J]. *Theriogenology*, 2012, 78(3): 583–592.
- [21] MAHERALI N, AHFELDT T, RIGAMONTI A, et al. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell stem cell*, 2008, 3(3): 340–345.

(上接第 108 页)

- [41] BRAND K, LEIBOLD W, LUPPA P, et al. Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines: evaluation of glucose and glutamine metabolism [J]. *Immunobiology*, 1986, 173(1): 23–34.
- [42] 周荣艳. 谷氨酰胺及丙氨酸谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道上皮细胞增殖和肠道免疫的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [43] 邹晓庭. 谷氨酰胺对断奶仔猪生长, 免疫的影响及其机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [44] BRUNO M E C, ROGIER E W, FRANTZ A, et al. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor in intestinal epithelial cells by enterobac-

- teriacae: Implications for mucosal homeostasis [J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(4/5): 356–382.
- [45] FAN J, LI G P, WU L D, et al. Parenteral glutamine supplementation in combination with enteral nutrition improves intestinal immunity in septic rats [J]. *Nutrition*, 2015, 31(5): 766–774.
- [46] 郭焱芳, 张彬. 谷氨酰胺对肠道免疫调节作用的研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(8): 62–64.
- [47] 邢琛. 日粮添加丙氨酸谷氨酰胺对仔猪小肠黏膜屏障功能的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [48] 赵玉容, 王红权, 贺建华, 等. 谷氨酰胺对断奶仔猪肠道微生物和小肠黏膜形态的影响 [J]. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2009, 35(2): 158–161.