

乳酸锌和硫酸锌对猪肠上皮细胞锌转载体和屏障功能影响的比较研究

侯若鑫^{1,2} 龙静^{1,3} 彭灿¹ 何流琴^{1,3*} 李铁军^{1,2*}
汤文杰^{4,5} 邝声耀⁵ 印遇龙^{1,2}

(1.中国科学院亚热带农业生态研究所,动物营养生理与代谢过程湖南省重点实验室,长沙 410125;2.中国科学院大学现代农业科学学院,北京 100049;3.湖南师范大学生命科学学院,动物肠道功能调控湖南省重点实验室,长沙 410081;4.湖南农业大学动物科学技术学院,长沙 410128;5.四川省畜牧科学研究院,动物遗传育种四川省重点实验室,畜禽生物制品四川省重点实验室,四川省畜科饲料有限公司,成都 610066)

摘要:本研究旨在比较乳酸锌和硫酸锌对仔猪肠上皮细胞 IPEC-J2 锌转运功能、物理屏障和免疫屏障的影响。将 IPEC-J2 细胞分别用 0、1.0、5.0、7.5、10.0 和 20.0 mg/mL 的乳酸锌或硫酸锌(以锌计)培养 36 h,筛选出细胞增殖的最适浓度。根据筛选结果将 IPEC-J2 细胞随机分为对照组、乳酸锌组和硫酸锌组,每组 3 个重复。结果表明:1)与对照组相比,7.5 mg/mL 乳酸锌和硫酸锌均可显著提高细胞活力($P<0.05$),且同等浓度条件下乳酸锌的促进效果更显著。2)与对照组相比,乳酸锌组和硫酸锌组细胞内白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)含量均显著降低($P<0.05$),且硫酸锌组细胞内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量显著降低($P<0.05$),乳酸锌组细胞内 TNF- α mRNA 相对表达量显著降低($P<0.05$)。3)与对照组相比,乳酸锌组细胞内封闭蛋白-1(claudin-1)的蛋白相对表达量显著提高($P<0.05$),细胞内 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的蛋白相对表达量无显著差异($P>0.05$)。4)与对照组相比,硫酸锌组细胞内富含半胱氨酸肠蛋白 1(CRIP1)和富含半胱氨酸肠蛋白 2(CRIP2)含量显著提高($P<0.05$),乳酸锌组细胞内 CRIP1 和 CRIP2 mRNA 相对表达量显著提高($P<0.05$),乳酸锌和硫酸锌组细胞内锌转运蛋白-1(ZNT-1) mRNA 相对表达量显著提高($P<0.05$)。由此可见,乳酸锌和硫酸锌可抑制 IPEC-J2 细胞炎性细胞因子的分泌和表达,促进锌的转运,增强肠道紧密连接,从而提高肠道免疫功能 and 黏膜结构的完整性,改善肠道屏障功能,且乳酸锌效果优于硫酸锌。

关键词: 乳酸锌; IPEC-J2 细胞; 屏障功能; 免疫; 锌转载体

中图分类号: S811

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2022)04-2626-10

肠道是动物机体内消化吸收营养物质的主要器官,也是最大的免疫器官,是阻止病原微生物感染的第 1 道屏障,具有重要的防御功能。进入肠道中的营养物质首先与肠道黏膜直接接触,肠道黏膜屏障主要由健康完整的肠道上皮细胞和细胞

间的紧密连接构成,故肠道上皮细胞是维持肠道屏障功能和免疫调节功能的主要执行者^[1]。研究表明,肠道屏障功能紊乱会造成肠道上皮细胞通透性的增加,导致有害物质进入细胞后促进炎症因子的表达和分泌,加速动物机体的炎症反

收稿日期: 2021-08-25

基金项目: 广西桂林技术创新引导计划(2020010901); 广西重点研发计划(桂科 AB192559012); 国家自然科学基金面上项目(31872371); 四川省应用基础研究(2018JY0641); 湖南省科技领军人才项目(2019RS3022); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2019A1515110852)

作者简介: 侯若鑫(1997—),男,湖北襄阳人,硕士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: 919387379@qq.com

* 通信作者: 何流琴,教授,博士生导师, E-mail: heliuqin@hunnu.edu.cn; 李铁军,研究员,博士生导师, E-mail: tjli@isa.ac.cn

应^[2-3]。因此,调节肠上皮细胞的紧密连接蛋白表达和细胞因子含量对维持肠道屏障功能具有十分重要的意义^[3]。

锌是哺乳动物必需的微量元素之一,是机体多种酶的重要组成成分和激活因子,参与细胞内信号传导和代谢增殖,在细胞生长、免疫功能和营养代谢等生理或病理过程中起着关键作用。锌还是猪饲料中使用的一种促生长添加剂,能调节肠道菌群和减少组胺释放,有效缓解仔猪断奶应激^[4-7]。研究表明,饲料中添加锌可以降低断奶后仔猪腹泻的发生率,改善肠道屏障的结构和功能^[8]。动物缺锌则会损害消化、免疫、神经、内分泌和皮肤系统,导致 T 淋巴细胞数量减少、氧化应激、肠道功能障碍和炎症细胞浸润等^[9-10]。此外,饲料中添加有机锌对动物生长性能的作用效果要优于无机锌。俞成浩等^[11]研究发现,同等剂量的乳酸锌对肉兔生长性能的提高效果要好于硫酸锌。王荣蛟等^[12]研究表明,饲料中添加乳酸锌可极显著提高仔猪小肠绒毛高度,降低隐窝深度,改善养分消化利用率,提高仔猪的生长性能。王彬等^[13]研究表明,饲料中添加纳米氧化锌和普通氧化锌能显著提高生长育肥猪血清中免疫球蛋白 A (IgA) 含量,显著提高血清中白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量,提高生长性能,降低腹泻率。目前关于乳酸锌和硫酸锌对动物肠道健康的作用更多是体现在一些表观指标上,作用机制与效果的对比研究甚少。因此,本研究以仔猪空肠上皮细胞系 IPEC-J2 细胞为模型,探讨乳酸锌和硫酸锌对猪小肠上皮细胞紧密连接蛋白、炎症细胞因子及锌转运载体的影响,旨在了解两者在调节仔猪小肠细胞屏障和炎症反应方面可能发挥的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

IPEC-J2 细胞由中国农业大学农业农村部饲料工业中心惠赠。

1.2 试验材料

乳酸锌(锌含量 21.5%)、硫酸锌(锌含量 21.5%)由四川省某饲料有限公司提供;硫酸锌配制时用基础培养基 DMEM 溶解,0.22 μm 除菌过滤器过滤除菌,现用现配。细胞基础培养基 DMEM/F-12 (1:1)、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶

(2.5 g/L)以及青(链)霉素均购自 Gibco 公司,总 RNA 提取反转录试剂盒以及荧光定量试剂盒均购于北京 TaKaRa 公司,细胞活力试剂盒与炎症因子酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒均购于苏州科铭生物技术有限公司。

1.3 IPEC-J2 细胞培养

将复苏的 IPEC-J2 细胞接种于含有 1% 双抗和 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的二氧化碳 (CO_2) 培养箱 (Thermo 公司,美国) 中培养,当细胞密度达到 80%~90% 时消化传代,进行后续试验。

1.4 细胞活力检测

使用细胞计数试剂盒 (8 肽胆囊收缩素, CCK-8) 检测细胞活力 (Dojindo, 日本)。IPEC-J2 细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,生长至融合度为 80%;然后分别用含 0 (对照)、1.0、5.0、7.5、10.0 和 20.0 mg/mL 乳酸锌或硫酸锌 (以锌计) 的 DMEM 处理细胞,处理时间选择 36 h^[14],每个浓度水平设置 8 孔重复。处理完成后,将 10 mol/L CCK-8 溶液加入 96 孔板培养的细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (OD) 值,并计算细胞活力。计算公式如下:

$$\text{细胞活力} = 100 \times [A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{加药}) - A(\text{空白})]$$

式中:A(加药)表示具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的 OD 值;A(空白)表示具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的 OD 值;A(0 加药)表示具有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的 OD 值。

1.5 IPEC-J2 细胞处理

试验共分为 3 组:对照组、乳酸锌组和硫酸锌组,每组 3 个重复。将消化后的 IPEC-J2 细胞以均等的浓度接种至 6 孔板中,共接种 6 板,待细胞生长至约 80% 时,弃培养液,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 1 次,更换为筛选出的 7.5 mg/mL 乳酸锌和硫酸锌培养基处理 36 h。每孔加入 2 mL 处理液,收集细胞培养上清液及细胞,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 细胞因子含量测定

收集培养基于离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,取上清待测。根据 IL-6、TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、富含半胱氨酸肠蛋白 1 (CRIP1)、富含半胱氨酸肠蛋白 2 (CRIP2) 试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 操作步骤,将标准

品工作液和待测样品加入酶标板中,每孔 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 90 min。弃去液体,每孔加入 100 μL 的生物素化抗体工作液,覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 60 min。洗板 3 次。每孔中加入酶结合工作液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min,重复洗板 3 次。每孔加入底物溶液 90 μL ,覆膜置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 15 min。最后向每孔加入终止液 50 μL ,终止反应后 30 min 之内用酶标仪在波长 450 nm 处测量各孔的 OD 值。计算炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

1.7 mRNA 相对表达量测定

采用实时荧光定量 PCR 法测定 IPEC-J2 细胞 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、锌转运蛋白-1 (ZNT-1)、CRIP1、CRIP2、封闭蛋白-1 (claudin-1) 和闭合蛋白 (occludin) 的 mRNA 相对表达量。根据

GenBank提供的猪基因序列,用 Primer Express 5.0 软件设计引物。引物序列见表 1,引物由上海生物工程公司合成。

按照 Trizol 试剂盒 (TaKaRa 公司,日本) 使用说明提取总 RNA。RNA 质量和浓度使用超微量核酸分析仪 (Biodrop 公司,英国) 进行检测,其纯度以 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 值介于 1.8~2.0 为使用标准。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参基因,根据逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司,日本) 将 RNA 反转录为 cDNA。以反转录产物 cDNA 为模板使用荧光定量 PCR (CFX96, Bio-Rad 公司,英国) 进行基因扩增。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性;58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸;40 个循环。各基因的 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Genes	序列号 Serial number	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物长度 Product length/bp
β -肌动蛋白 β -actin	XM_003124280.3	F:CTGCGGCATCCACGAAACT R:AGGGCCGTGATCTCCTTCTG	147
肿瘤坏死因子- α TNF- α	NM_214022.1	F:CCACGTTGTAGCCAATGTCA R:CAGCAAAGTCCAGATAGTCC	395
锌转运蛋白-1 ZNT-1	NM_001139470.1	F:GGCTGAAATTGGACCGGACA R:ACGGAACCCAAAGCATCTCC	181
富含半胱氨酸肠蛋白 1 CRIP1	XM_021081650.1	F:TACTTTGCTGAGCGGGTGAC R:GAAGGTGTGACTCTCGGCTC	195
富含半胱氨酸肠蛋白 2 CRIP2	XM_021081648.1	F:CGCTGCAACAAGAGGGTCTA R:ATTCCGTAGCAGGGCTTGTG	161
白细胞介素-1 β IL-1 β	XM_021085847.1	F:GCTAACTACGGTGACAACAA R:TCTTCATCGGCTTCTCCACT	196
白细胞介素-6 IL-6	NM_001252429.1	F:CAAAGCCACCACCCCTAAC R:TCGTTCTGTGACTGCAGCTT	66
闭合蛋白 Occludin	NM_001163647.2	F:CAGGTGCACCCTCCAGATTG R:TGGACTTCAAGAGGCCTGG	111
封闭蛋白-1 Claudin-1	FM205928.1	F:CTGCTTCTCTCTGCCTTCTG R:GGAAGGCGAAGGTTTTGGAT	91

1.8 蛋白质免疫印迹检测

当 IPEC-J2 细胞融合处理完成后,弃去细胞培养板中的培养基,用 PBS 冲洗 3 次,冰上裂解 10 min,收集细胞于 1.5 mL 的 EP 管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,取上清置于新的 EP 管中备用;根据样品数量,按 50 体积二喹啉甲酸

(BCA) 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液,充分混匀;完全溶解蛋白标准品,浓度为 2 mg/mL,将标准品分别按 0 (对照)、1、2、4、8、12、16 和 20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中,加标准品稀释液补足到 20 μL 。加 25 μL 样品到 96 孔板的样品孔中;各孔加入 200 μL BCA 工

作液,37 ℃放置 30 min;测定 550 nm 波长的 OD 值。根据标准曲线计算出蛋白浓度。采用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定 550 nm 波长的 OD 值。根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。取 60 μ L 蛋白上清,加入 15 μ L 5 \times

loading buffer 混匀,沸水煮 5 min,放入冰盒中速冷备用。制胶电泳后转膜封闭,一抗二抗依次孵育(表 2),增强化学发光(ECL)显色曝光,扫描胶片,用凝胶成像处理系统分析 claudin-1 和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)条带灰度值。

表 2 抗体孵育比例

Table 2 Incubation ratio of antibodies

项目 Items	抗体货号 Antibody article number	第一抗体来源 Primary antibody source	稀释比例 Dilution rate	抗体公司 Antibody company
封闭蛋白-1 Claudin-1	13255S	兔源	1 : 1 000	CST
E-钙黏蛋白 E-cadherin	14472S	兔源	1 : 1 000	CST
β -肌动蛋白 β -actin	66009-1-Ig	鼠源	1 : 5 000	Proteintech

1.9 数据统计分析

试验数据先用 Excel 2019 软件进行整理和分析,然后使用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA, LSD),单因素方差分析显著时,采用 Duncan 氏法对数据进行多重比较,结果数据以平均值(mean) \pm 标准误(standard error, SE)表示,以 $P > 0.05$ 为差异不显著, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, $0.05 < P < 0.10$ 为有差异显著趋势。

2 结果与分析

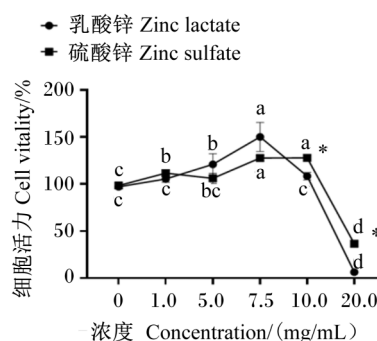
2.1 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞活力的影响

由图 1 可知,与对照组相比,5.0 和 7.5 mg/mL 乳酸锌组细胞活力均显著升高 ($P < 0.05$),且 7.5 mg/mL 乳酸锌组细胞活力较对照组提高近 50%;1.0、7.5 和 10.0 mg/mL 硫酸锌组细胞活力均显著升高 ($P < 0.05$);当浓度为 7.5 mg/mL 时,乳酸锌组和硫酸锌组细胞活力均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。综合考虑,选择 7.5 mg/mL 乳酸锌或硫酸锌处理 36 h 进行后续试验。

2.2 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞炎症因子分泌和表达的影响

由表 3 可知,与对照组相比,乳酸锌组细胞内促炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$),分别下降了 21.72% 和 50.37%,而细胞内 TNF- α 含量无显著影响 ($P > 0.05$);硫酸锌组细胞内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$),

分别下降了 40.62%、38.23% 和 31.30%。



同一折线数据点标注相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); * 表示同一浓度不同锌源差异显著 ($P < 0.05$)。

In the same broken line, value points with the same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different letters mean significant difference ($P < 0.05$). * mean significant difference between different zinc sources with the same concentration ($P < 0.05$).

图 1 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on cell viability of IPEC-J2 cells

由表 4 可知,与对照组相比,乳酸锌组和硫酸锌组细胞内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 相对表达量均有所降低,其中,乳酸锌组细胞内 TNF- α 的 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$),硫酸锌组细胞内 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。

表 3 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞炎症因子含量的影响

Table 3 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on inflammatory factor contents in IPEC-J2 cells pg/mg prot

项目 Items	对照组 Control group	乳酸锌组 Zinc lactate group	硫酸锌组 Zinc sulfate group	P 值 P-value
白细胞介素-1 β IL-1 β	1 053.31 \pm 82.70 ^a	824.48 \pm 41.89 ^b	625.44 \pm 32.48 ^c	0.005
白细胞介素-6 IL-6	927.42 \pm 58.25 ^a	460.25 \pm 22.97 ^b	572.89 \pm 70.23 ^b	0.002
肿瘤坏死因子- α TNF- α	348.96 \pm 20.21 ^a	314.84 \pm 10.36 ^a	239.72 \pm 8.35 ^b	0.004

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

表 4 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞炎症因子 mRNA 相对表达量的影响

Table 4 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on mRNA relative expression levels of inflammatory factors in IPEC-J2 cells

项目 Items	对照组 Control group	乳酸锌组 Zinc lactate group	硫酸锌组 Zinc sulfate group	P 值 P-value
白细胞介素-1 β IL-1 β	1.00 \pm 0.44	0.20 \pm 0.01	0.37 \pm 0.12	0.074
白细胞介素-6 IL-6	1.00 \pm 0.09 ^a	0.80 \pm 0.05 ^{ab}	0.62 \pm 0.07 ^b	0.031
肿瘤坏死因子- α TNF- α	1.00 \pm 0.07 ^a	0.11 \pm 0.02 ^b	0.23 \pm 0.13 ^b	0.001

2.3 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞锌转运载体的影响

由表 5 可知, 与对照组相比, 乳酸锌组和硫酸锌组细胞内锌转运载体 CRIP1 和 CRIP2 的含量均有所提高, 其中硫酸锌组显著提高 ($P<0.05$)。

由表 6 可知, 与对照组相比, 乳酸锌组细胞内锌转运载体 ZNT-1、CRIP1 和 CRIP2 的 mRNA 相对表达量显著提高 ($P<0.05$); 硫酸锌组细胞内仅 ZNT-1 和 CRIP2 的 mRNA 相对表达量显著提高 ($P<0.05$), 且效果都略低于乳酸锌组。

表 5 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞锌转运载体含量的影响

Table 5 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on zinc transporter contents in IPEC-J2 cells ng/mg

项目 Items	对照组 Control group	乳酸锌组 Zinc lactate group	硫酸锌组 Zinc sulfate group	P 值 P-value
富含半胱氨酸肠蛋白 1 CRIP1	7.31 \pm 0.55 ^b	9.20 \pm 0.63 ^{ab}	11.89 \pm 1.06 ^a	0.017
富含半胱氨酸肠蛋白 2 CRIP2	5.51 \pm 0.22 ^b	5.94 \pm 0.65 ^b	8.98 \pm 0.26 ^a	0.002

表 6 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞锌转运载体 mRNA 相对表达量的影响

Table 6 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on mRNA relative expression levels of zinc transporters in IPEC-J2 cells

项目 Items	对照组 Control group	乳酸锌组 Zinc lactate group	硫酸锌组 Zinc sulfate group	P 值 P-value
锌转运蛋白-1 ZNT-1	1.00 \pm 0.04 ^c	5.82 \pm 0.08 ^a	4.47 \pm 0.24 ^b	<0.001
富含半胱氨酸肠蛋白 1 CRIP1	1.00 \pm 0.10 ^b	1.38 \pm 0.08 ^a	1.10 \pm 0.01 ^{ab}	0.039
富含半胱氨酸肠蛋白 2 CRIP2	1.00 \pm 0.04 ^b	1.57 \pm 0.09 ^a	1.52 \pm 0.08 ^a	0.004

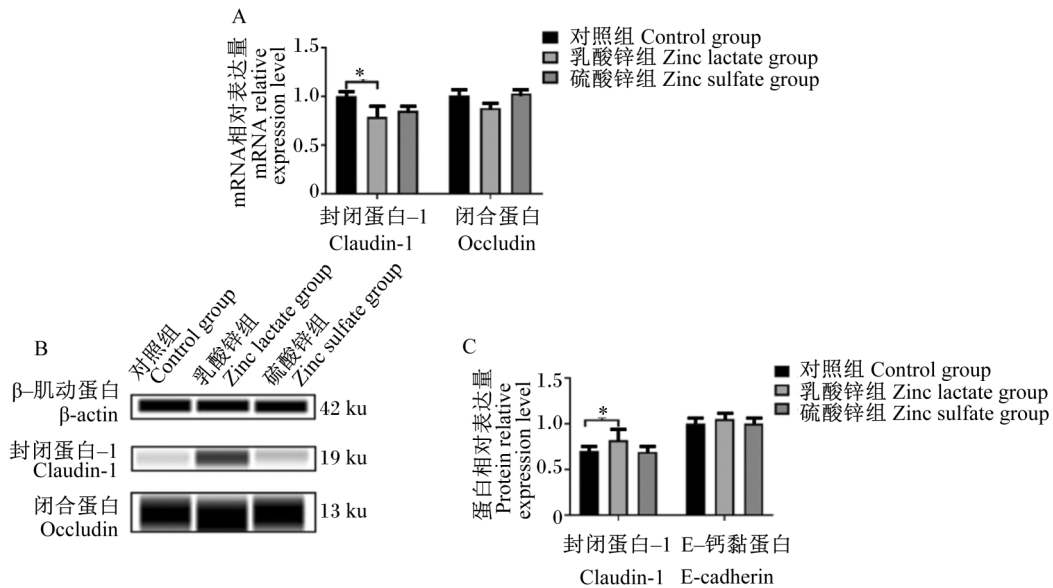
2.4 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白的影响

由图 2-A 可知, 与对照组相比, 乳酸锌组细胞

内 claudin-1 mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$), 乳酸锌组和硫酸锌组细胞内 occludin mRNA 相对表达量均无显著差异 ($P>0.05$)。由

图 2-B和图 2-C 可知,与对照组相比,乳酸锌组细胞内紧密连接蛋白 claudin-1 的蛋白相对表达量显著提高($P<0.05$),硫酸锌组细胞内 claudin-1 的蛋

白相对表达量无显著差异($P>0.05$);乳酸锌组和硫酸锌组细胞内 E-cadherin 的蛋白相对表达量均无显著差异($P>0.05$)。



* 表示差异显著($P<0.05$)。

* represented significant difference ($P<0.05$).

图 2 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白的影响

Fig.2 Effects of zinc lactate and zinc sulfate on tight junction protein in IPEC-J2 cells

3 讨论

3.1 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞活力和物理屏障功能的影响

本研究结果表明, IPEC-J2 细胞中添加 1.0~10.0 mg/mL 的乳酸锌或硫酸锌,均能不同程度地提高细胞活力,但当浓度超过 10 mg/mL 时则会严重影响 IPEC-J2 细胞活力,这可能是因为过量锌与其他元素如硒、铁、钙和铜产生拮抗性,抑制细胞的增殖并过度影响细胞的通透性,从而破坏了细胞结构^[15]。而当浓度为 7.5 mg/mL 时,细胞活力的提升均达到最高,这可能是因为此时的锌吸收转运和利用的效率最高,并协同其他元素共同促进细胞的增殖分化。

紧密连接位于上皮和内皮侧膜的最顶端,能够调节水和溶质的平衡。claudin-1 被鉴定为定位于肠道上皮细胞上紧密连接的完整膜蛋白,可通过减少细胞旁流量来影响细胞屏障功能^[16]。E-cadherin 是一种在上皮细胞中表达的黏附蛋白,

不仅会对组织内部细胞黏附状态造成影响,还能维持上皮细胞正常的组织结构和形态^[16]。当紧密连接的结构和功能被破坏的时候,肠道通透性会有所增加,肠道屏障功能受损^[17]。锌对肠道屏障功能目前已经有许多发现,万妍等^[18]研究发现,饲料中添加 2 000~3 000 mg/kg 氧化锌可以上调细胞紧密连接蛋白 claudin-1 和 occludin 的表达来维持肠道通透性和完整性。本试验结果表明,添加乳酸锌可显著上调 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白 claudin-1 的表达,维护肠道黏膜结构,从而改善小肠上皮细胞的屏障功能;而乳酸锌下调 claudin-1 mRNA 的表达可能是因为 mRNA 降解和蛋白量增加负反馈调节 mRNA 表达。同时,本研究中添加硫酸锌对 IPEC-J2 细胞 claudin-1 的表达无显著影响,这可能是由于无机锌在消化过程中释放出的金属离子易与其他物质(如植酸、草酸和磷酸根离子)结合成不溶性盐排除体外,从而降低了硫酸锌的生物利用率。有研究表明,锌缺乏会导致人结肠癌细胞 Caco-2 的 occludin 和 E-cadherin 含量大幅度降低^[19];而 Davin 等^[20]研究发现,硫酸锌能

上调 Caco-2 细胞的蛋白激酶 C 信号分子,提高 occludin 和 E-cadherin 的表达。本研究结果与上述结果都不一致,表明添加乳酸锌和硫酸锌对 occludin mRNA 和 E-cadherin 的表达均无显著影响,这可能是因为在 IPEC-J2 细胞中锌对物理屏障功能的影响不涉及此蛋白的变化,而是在其他细胞中发挥作用。

3.2 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞免疫屏障的影响

体内锌缺乏会导致肠黏膜免疫屏障受损并伴随炎症细胞的浸润,过度表达的促炎细胞因子如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 会损害肠道的完整性和上皮细胞的功能^[9-10]。本试验结果表明,添加乳酸锌和硫酸锌均可显著降低 IPEC-J2 细胞中 IL-1 β 和 IL-6 含量,这一结果与刁慧等^[8]研究发现饲料中补充锌可以降低促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和白细胞介素-8 (IL-8) 含量的结果相一致。马茂涛^[21]研究表明,牡蛎多糖锌配合物能显著提高断奶仔猪空肠黏膜抗炎性因子白细胞介素-2 含量,显著降低空肠黏膜 TNF- α 含量。Zhao 等^[22]研究表明,金针菇锌多糖对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞促炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达有强烈的抑制作用,提示有机锌可抑制促炎症因子的表达。本试验中,添加乳酸锌对 IPEC-J2 细胞 TNF- α mRNA 表达抑制作用较硫酸锌更加明显,这不仅说明锌可能会介导炎症信号的转导过程,降低促炎细胞因子的表达和分泌,缓解肠道炎症反应和提高肠道免疫屏障功能,还说明乳酸锌和硫酸锌可能在促炎症因子转录和翻译水平上发挥的作用并不一致,且乳酸锌的作用效果可能更佳。

3.3 乳酸锌和硫酸锌对 IPEC-J2 细胞锌转运功能的影响

锌离子是亲水性带电离子,在机体内不能以简单的被动扩散方式进行跨膜转运,因此,细胞内外锌离子转运及稳态维持主要依靠锌转运蛋白来实现。ZNT-1 是一种双功能蛋白,介导锌从细胞质出口到细胞器或细胞外,在促进胞质内锌外流的同时还可以抑制锌通过 L 型钙通道^[23]。Shusterman 等^[24]研究发现,将胚胎小鼠的纯合 ZNT-1 基因敲除,胚胎移植不久后就将死亡,表明 ZNT-1 是胎儿从母体摄取锌的一种重要蛋白分子。本试验结果表明,乳酸锌和硫酸锌处理显著上调 IPEC-J2 细胞 ZNT-1 的 mRNA 表达,表明两者可能

对锌的转运有促进作用,且乳酸锌的效果更加显著,这或是由于有机锌在转录水平上生物利用率更高的原因。富含半胱氨酸肠蛋白 (CRIP) 主要存在于小肠中,是一种饱和的锌离子转运载体,在锌离子转运吸收、维持管腔结构营养吸收等方面可发挥重要的作用^[25-26];并且 CRIP 可参与细胞因子平衡及免疫细胞的分化或成熟,在宿主的免疫防御反应中发挥重要作用^[27-29]。本研究发现,不同锌源处理均能提高 IPEC-J2 细胞 CRIP1、CRIP2 锌转运蛋白的含量,但硫酸锌的提高作用更加显著;然而,乳酸锌对 CRIP1、CRIP2 mRNA 相对表达量的上调作用则更为显著。mRNA 和蛋白水平是一个相偶联的过程,但是两者没有必然的一致趋势,这可能是由于多种影响因素影响这一过程,比如 mRNA 的降解、蛋白的降解、自身表达产生阻遏、修饰折叠等。综上所述,乳酸锌和硫酸锌均可不同程度提高锌转运载体的表达和分泌,可能对锌从肠细胞顶膜到基底膜的转运有促进作用,因而参与细胞内信号传导和细胞增殖,维持上皮细胞的生长分化,提高机体肠道免疫功能,且硫酸锌的作用效果更优。

4 结论

当乳酸锌和硫酸锌添加浓度为 7.5 mg/mL 时,可最大限度提升 IPEC-J2 细胞活力,调节炎症细胞因子的分泌和表达,一定程度上促进锌的转运,从而改善肠上皮细胞免疫功能;但仅有添加乳酸锌可上调 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白的表达,改善肠道屏障功能,故乳酸锌效果优于硫酸锌。

参考文献:

- [1] 张锦秀,李书伟,刁慧,等.有机锌对动物肠道健康的调控作用研究进展[J].中国畜牧杂志,2021,57(1):49-53.
ZHANG J X, LI S W, DIAO H, et al. Research progress on regulation of organic zinc on animal intestinal health[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(1):49-53. (in Chinese)
- [2] 尹蓝梅.高蛋白饲料对仔猪肠道免疫及屏障功能的影响研究[D].硕士学位论文.长沙:湖南师范大学,2019.
YIN L M. The effects of dietary high protein on intestinal immunity and barrier function in piglets [D]. Master's Thesis. Changsha: Hunan Normal University.

- ty, 2019. (in Chinese)
- [3] 叶晓琳, 孙梅. 肠上皮屏障在炎症性肠病发病机制中的作用[J]. 中国小儿急救医学, 2018, 25(9): 698-702.
- YE X L, SUN M. The role of intestinal epithelial barrier in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Chinese Pediatric Emergency Medicine, 2018, 25(9): 698-702. (in Chinese)
- [4] 郭晓波. 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞屏障功能的调控作用[D]. 硕士学位论文. 南昌: 江西农业大学, 2019.
- GUO X B. Regulation of seaweed polysaccharide on the barrier function of intestinal porcine epithelial cells [D]. Master's Thesis. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [5] IBS K H, RINK L. Zinc-altered immune function [J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(5 Suppl 1): 1452S-1456S.
- [6] MCDONALD C M, MANJI K P, KISENGE R, et al. Daily zinc but not multivitamin supplementation reduces diarrhea and upper respiratory infections in Tanzanian infants; a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. The Journal of Nutrition, 2015, 145(9): 2153-2160.
- [7] FINAMORE A, MASSIMI M, CONTI DEVIRGILIIS L, et al. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells [J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138(9): 1664-1670.
- [8] 刁慧, 张锦秀, 晏家友, 等. 锌对断奶仔猪肠道屏障功能的影响[J]. 饲料工业, 2020, 41(19): 12-17.
- DIAO H, ZHANG J X, YAN J Y, et al. Effects of zinc on intestinal barrier function of weaned piglets [J]. Feed Industry, 2020, 41(19): 12-17. (in Chinese)
- [9] SHI H N, SCOTT M E, STEVENSON M M, et al. Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection [J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(1): 20-27.
- [10] BAO S Y, KNOELL D L. Zinc modulates cytokine-induced lung epithelial cell barrier permeability [J]. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2006, 291(6): L1132-L1141.
- [11] 俞成浩, 郭志强, 雷岷, 等. 乳酸锌对断奶肉兔生长性能、肠道发育和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(2): 1055-1062.
- YU C H, GUO Z Q, LEI M, et al. Effects of zinc lactate on growth performance, intestinal development and serum biochemical indexes of weaned rabbits [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(2): 1055-1062. (in Chinese)
- [12] 王荣蛟, 信爱国, 张春勇, 等. 乳酸锌对仔猪小肠形态学、小肠黏膜金属硫蛋白 1 和组织急性期蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 1068-1076.
- WANG R J, XIN A G, ZHANG C Y, et al. Effects of zinc lactate on intestinal morphology, mRNA expressions of metallothioneins 1 in intestinal mucosa and acute phase proteins in tissues of weaner piglets [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(4): 1068-1076. (in Chinese)
- [13] 王彬, 刘路杰, 祝佳, 等. 纳米氧化锌对断奶仔猪生长性能、血清免疫和生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(11): 3626-3633.
- WANG B, LIU L, ZHU J, et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth performance, serum immune and biochemical indices of weaned piglets [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(11): 3626-3633. (in Chinese)
- [14] 韩国全, 余冰, 陈代文, 等. 乳酸锌对猪空肠上皮细胞 IPEC-J2 增殖及相关调控基因 mRNA 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(5): 740-747.
- HAN G Q, YU B, CHEN D W, et al. Effect of zinc lactate on cell proliferation and related-regulatory genes mRNA expression in porcine jejunal epithelial cells IPEC-J2 [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2012, 43(5): 740-747. (in Chinese)
- [15] 洪树涛. 在体外镉与 DNA 相互作用: 镉结合的协同性和钙、镁、锌竞争的拮抗性[J]. 国外医学(卫生学分册), 1986(1): 44-45.
- HONG S T. Cadmium-DNA interactions *in vitro*: synergism of cadmium-binding and antagonism to calcium, magnesium, and zinc competition [J]. Foreign Medical Sciences (Section Hygiene), 1986(1): 44-45. (in Chinese)
- [16] INAI T, KOBAYASHI J, SHIBATA Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells [J]. European Journal of Cell Biology, 1999, 78(12): 849-855.
- [17] MA T M, XU N, MA X D, et al. Moxibustion regulates inflammatory mediators and colonic mucosal barrier in ulcerative colitis rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(8): 2566-2575.
- [18] 万妍, 邵玉新, 张炳坤. 不同阶段日粮锌营养对肉鸡

- 生长性能及肠黏膜屏障功能的影响[J].中国家禽, 2020, 42(9):54-61.
- WAN Y, SHAO Y X, ZHANG B K. Effects of dietary zinc nutrition on growth performance and intestinal mucosal barrier function of chickens at different phase [J]. *China Poultry*, 2020, 42(9):54-61. (in Chinese)
- [19] ZHANG B K, GUO Y M. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets[J]. *British Journal of Nutrition*, 2009, 102(5):687-693.
- [20] DAVIN R, 张永刚. 猪小肠上皮细胞作用的新发现[J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(8):57-60.
- DAVIN R, ZHANG Y G. Importance of intestinal cells for gut health-IPEC studies[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(8):57-60. (in Chinese)
- [21] 马茂涛. 牡蛎多糖螯合锌的制备螯合及其对脂多糖刺激断奶仔猪小肠健康的影响[D]. 硕士学位论文. 福州:福建农林大学, 2017.
- MA M T. Preparation of zinc-oyster polysaccharide and the effect to lipid stimulation of small intestine health of weaned piglets [D]. Master's Thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017. (in Chinese)
- [22] ZHAO S W, LI B, CHEN G T, et al. Preparation, characterization, and anti-inflammatory effect of the chelate of *Flammulina velutipes* polysaccharide with Zn [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(1):162-177.
- [23] THINGHOLM T E, RÖNNSTRAND L, ROSENBERG P A. Why and how to investigate the role of protein phosphorylation in ZIP and ZnT zinc transporter activity and regulation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(16):3085-3102.
- [24] SHUSTERMAN E, BEHARIER O, LEVY S, et al. Zinc transport and the inhibition of the L-type calcium channel are two separable functions of ZnT-1[J]. *Metallomics*, 2017, 9(3):228-238.
- [25] ESCOBAR O, SANDOVAL M, VARGAS A, et al. Role of metallothionein and cysteine-rich intestinal protein in the regulation of zinc absorption by diabetic rats[J]. *Pediatric Research*, 1995, 37(3):321-327.
- [26] 李明月. CRIP1 与相关疾病关联性的研究进展[J]. *当代医药论丛*, 2019, 17(23):83-84.
- LI M Y. Research progress of CRIP1 and related diseases [J]. *Contemporary Medicine Forum*, 2019, 17(23):83-84. (in Chinese)
- [27] DAVIS B A, BLANCHARD R K, LANNINGHAM-FOSTER L, et al. Structural characterization of the rat cysteine-rich intestinal protein gene and overexpression of this LIM-only protein in transgenic mice [J]. *DNA and Cell Biology*, 1998, 17(12):1057-1064.
- [28] CAI H M, CHEN J W, LIU J, et al. CRIP1, a novel immune-related protein, activated by *Enterococcus faecalis* in porcine gastrointestinal epithelial cells [J]. *Gene*, 2017, 598:84-96.

Comparative Study on Effects of Zinc Lactate and Zinc Sulfate on Zinc Transporter and Barrier Function in Pig Intestinal Epithelial Cells

HOU Ruoxin^{1,2} LONG Jing^{1,3} PENG Can¹ HE Liuqin^{1,3*} LI Tiejun^{1,2*}
TANG Wenjie^{4,5} KUANG Shengyao⁵ YIN Yulong^{1,2}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Nutritional Physiology and Metabolic Process, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 2. College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Hunan Province Key Laboratory of Animal Intestinal Function and Regulation, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 4. School of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 5. Sichuan Animal Feed Co., Ltd., Sichuan Key Laboratory of Livestock and Poultry Biological Products, Sichuan Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Animal Husbandry Research Institute, Chengdu 610066, China)

Abstract: The aim of this study was to compare the effects of zinc lactate and zinc sulfate on zinc transport function, physical barrier and immune barrier in intestinal epithelial cells IPEC-J2 of piglets. IPEC-J2 cells were cultured with 0, 1.0, 5.0, 7.5, 10.0 and 20.0 mg/mL zinc lactate or zinc sulfate (calculated by zinc) for 36 h, respectively, to screen out the optimal concentration of cell proliferation. Then the IPEC-J2 cells were randomly divided into control group, zinc lactate group and zinc sulfate group according to screening results, with 3 replicates in each group. The results showed as follows: 1) compared with the control group, 7.5 mg/mL zinc lactate and zinc sulfate significantly increased the cell viability ($P<0.05$), and zinc lactate at the same concentration had a more significant promoting effect. 2) Compared with the control group, the contents of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in cells in zinc lactate and zinc sulfate groups were significantly decreased ($P<0.05$), the tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in cells in zinc sulfate group was significantly decreased ($P<0.05$), and the TNF- α mRNA relative expression level in cells in zinc lactate group was significantly decreased ($P<0.05$). 3) Compared with the control group, the occludin-1 protein relative expression level in cells in zinc lactate group was significantly increased ($P<0.05$), while the E-cadherin protein relative expression level in cells was not significantly different ($P>0.05$). 4) Compared with the control group, the contents of cysteine-rich intestinal protein-1 (CRIP1) and cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) in cells in zinc sulfate group were significantly increased ($P<0.05$), the mRNA relative expression levels of CRIP1 and CRIP2 in cells in zinc lactate group were significantly increased ($P<0.05$), and the mRNA relative expression level of zinc transporter 1 (ZNT-1) in cells in zinc lactate and zinc sulfate groups was significantly increased ($P<0.05$). In conclusion, zinc lactate and zinc sulfate can inhibit the secretion and expression of inflammatory cytokines in IPEC-J2 cells, promote the transport of zinc, enhance the intestinal tight junction, thus improve the intestinal immune function and mucosal structure integrity, improve the intestinal barrier function, and the effect of zinc lactate is better than that of zinc sulfate. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(4):2626-2635]

Key words: zinc lactate; IPEC-J2 cells; barrier function; immunity; zinc transporter

* Corresponding authors: HE Liuqin, professor, E-mail: heliuqin@hunnu.edu.cn; LI Tiejun, professor, E-mail: tjli@isa.ac.cn

(责任编辑 田艳明)