



胡丹,郝燕青,陈渠,等. 饲料中添加复合胆汁酸对皮质酮诱导的肉鸡脂肪肝综合症的缓解作用研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):44-51.

HU Dan,HAO Yanqing,CHEN Qu,et al. Effect of dietary bile acids supplementation on alleviating fatty liver syndrome induced by corticosterone in broilers[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):44-51.

饲料中添加复合胆汁酸对皮质酮诱导的肉鸡脂肪肝综合症的缓解作用研究

胡丹,郝燕青,陈渠,邬晓婷,倪迎冬*

(南京农业大学动物医学院/农业农村部动物生理生化重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在探究饲料中添加胆汁酸(bile acid,BA)对皮质酮(corticosterone,CORT)诱导的肉鸡脂肪肝综合症的缓解作用。[方法]试验选取了120只1日龄雄性AA肉鸡,随机分为2组,分别饲喂基础日粮和含BA日粮。BA添加分为前期、中期、后期3个阶段,剂量依次递增。28日龄时,从基础日粮组中选取肉鸡20只,随机分为对照组(control,CON)、皮质酮处理组(CORT);从胆汁添加组中随机选取10只设为皮质酮+胆汁酸组(CORT+BA)。CON组颈部皮下注射乙醇PBS溶液(15%乙醇),CORT组和CORT+BA组注射4 mg·kg⁻¹ CORT,连续注射7 d。肉鸡40日龄屠宰采样,记录器官与组织质量,采集血清和肝脏组织以测定生化指标、脂代谢相关基因和蛋白表达水平。[结果]饲料中添加BA可显著缓解由CORT处理引起的腹脂率升高及腿肌重降低($P<0.05$)。生化测定结果表明,CORT处理显著降低了40日龄肉鸡血清中高密度脂蛋白(HDLC)水平、增加游离脂肪酸(NEFA)水平,而BA处理显著升高血清HDLC水平($P<0.05$)。与CON组相比,CORT组肉鸡肝脏内甘油三酯(TG)水平显著升高($P<0.01$),肝细胞内脂滴显著富集且出现空泡化现象,而BA处理可显著缓解肝脏内的TG沉积($P<0.01$)。CORT处理显著上调肝脏中硬脂酰辅酶A去饱和酶(*scd1*)和乙酰辅酶A羧化酶(*acc*)基因表达水平($P<0.05$),显著上调ACC和脂肪酸合成酶(FASN)蛋白表达水平($P<0.05$),同时下调过氧化物增殖激活受体(PPAR α)蛋白的表达水平($P<0.05$);BA处理可显著逆转皮质酮引起的以上基因和蛋白表达变化,并显著增加肉毒碱棕榈酰基转移酶1A(*cpt1a*)基因表达水平,显著降低脂肪酸转位酶(CD36)蛋白表达水平($P<0.05$)。[结论]日粮中添加胆汁酸可减少肝脏内甘油三酯合成,促进其分解,抑制肝细胞对脂肪酸的摄取,从而缓解皮质酮诱导的肉鸡脂肪肝综合症。

关键词:胆汁酸;皮质酮;脂肪肝综合症;肉鸡

中图分类号:S831.5

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0044-08

Effect of dietary bile acids supplementation on alleviating fatty liver syndrome induced by corticosterone in broilers

HU Dan,HAO Yanqing,CHEN Qu,WU Xiaoting,NI Yingdong*

(College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Physiologic and Biochemistry, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China)

Abstract:[Objectives] This study aimed to investigate the effect of dietary bile acids (BA) supplementation on alleviating fatty liver syndrome (FLS) induced by corticosterone (CORT) in broilers, and the mechanism involving in this process. [Methods] One hundred and twenty 1-day-old AA male broilers were randomly divided into two groups and fed a basal diet or a BA containing diet respectively. BA were periodically added to the diet using the dose-escalation strategy including early, middle and late stages. At 28 days of age, twenty broilers were randomly selected from the basal diet group and divided into control group (CON) and corticosterone treatment group (CORT). Ten broilers fed BA were randomly picked up and set as corticosterone plus bile acids group (CORT+BA). The broilers were slaughtered at 40 days of age. The weight of organs and tissues was recorded. The serum and liver tissues were sampled for biochemical analysis and hepatic genes or proteins expression analysis. [Results] BA treatment significantly alleviated the deposition of abdominal fat and the decrease of leg muscle weight induced by CORT injection, and also increased leg muscle percentage ($P<0.05$). The results of biochemical analysis showed that CORT treatment significantly decreased serum high-density lipoprotein (HDLC) concentration, but increased serum non-esterified fatty acid (NEFA) level, while BA significantly increased the

收稿日期:2022-12-10

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFE0114400)

*通信作者:倪迎冬,教授,博士,主要从事消化道生理与免疫研究,E-mail:niyingdong@njau.edu.cn。

level of serum HDLC ($P < 0.05$). The level of hepatic triglyceride (TG) was significantly increased by CORT ($P < 0.01$) and the lipid droplets in liver were significantly enriched and vacuolated. However, these changes were markedly alleviated by BA treatment ($P < 0.05$). Compared to the CON group, CORT significantly up-regulated the mRNA expression of stearoyl-CoA desaturase 1 (*scd1*) and acetyl CoA carboxylase (*acc*) genes, and also significantly up-regulated the protein expression of ACC and fatty acid synthase (FASN) but down-regulated peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) protein expression in the liver ($P < 0.05$). BA supplementation ameliorated the disorders of hepatic lipid metabolism caused by CORT and increased the mRNA expression of carnitine palmitoyl-transferase 1A (*cpt1a*) and decreased protein expression of fatty acid translocase (CD36) ($P < 0.05$). [Conclusions] Dietary BA supplementation can significantly alleviate hepatic TG deposition induced by CORT through decreasing hepatic TG synthesis, promoting fatty acid decomposition, as well as inhibiting hepatic fatty acids uptake in broilers.

Keywords: bile acid; corticosterone; fatty liver syndrome; broiler

脂肪肝综合征 (fatty liver syndrome, FLS) 是一种常见的家禽代谢性疾病, 其发病机制与病理症状与哺乳动物非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 十分相似^[1]。为了增加肉鸡生长性能和养殖效益, 近年来肉鸡饲料中油脂添加量有增加趋势, 更易发生脂肪肝综合征。患病鸡肝脏出现严重的脂肪沉积, 导致肝脏破裂出血, 从而出现突然死亡现象^[2-3]。脂肪肝综合征已成为笼养鸡非感染性死亡的主要原因之一, 约有 75% 的笼养肉鸡死亡与 FLS 有关^[4]。因此, 家禽脂肪肝的致病机制和防治技术研究成为热点研究之一。

皮质酮 (corticosterone, CORT) 是禽类体内一种有活性的糖皮质激素 (glucocorticoid, GC)。GC 水平过高可诱发机体代谢紊乱, 包括 II 型糖尿病、骨骼肌流失、血脂异常、向心性肥胖和肝脏中甘油三酯过度沉积等^[5-6]。作为调控机体脂代谢的重要激素, CORT 通过糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptors, GR) 动员组织从头合成脂肪酸, 增加外周循环中的游离脂肪酸水平^[7]。肝脏摄入的脂肪酸增多, 促进甘油三酯的合成, 产生脂质沉积, 最终诱发脂肪肝。慢性应激或长期高水平 CORT 暴露与脂肪肝进展和炎症反应密切相关^[8]。

胆汁酸 (bile acid, BA) 是由肝脏合成后分泌到消化道中的一类物质, 在十二指肠中促进脂类物质及脂溶性维生素的吸收。此外, BA 作为信号分子可通过与法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 和 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1/TGR5) 来调节机体葡萄糖和脂质代谢^[9-10]。临床研究表明, NAFLD 的发生伴随着胆汁酸稳态及其相关信号通路的紊乱, 通常表现为初级胆汁酸增加, 而次级胆汁酸减少^[11-12]。因此, 与 BA 相关的信号通路被认为是治疗哺乳动物 NAFLD 的靶点。近年来, 对家禽的研究表明, 饲料中添加 BA 可促进肉鸡生长, 可能与肠上皮细胞消化酶的活性升高有关^[13-14]。在摄入不同能量水平日粮的情况下, 饲喂 BA 能显著降低肉鸡的料重比, 降低血清中甘油三酯水平, 并改善肝脏中的脂代谢状态^[15]。然而, 目前有关饲喂胆汁酸对家禽 FLS 缓解作用与机制的研究尚未见报道。因此, 本研究以 AA 肉鸡为动物模型, 通过注射 CORT 诱导 FLS, 以探索饲料中添加 BA 对 FLS 的缓解作用及机制, 为家禽脂肪肝综合征研究与防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂 胆汁酸由山东龙昌动物保健品技术有限公司生产, 组成成分主要是猪脱氧胆酸 (70.67%)、鹅脱氧胆酸 (19.61%) 和猪胆酸 (8%)^[13]。组织甘油三酯检测试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司; 血液生化检测试剂盒购于美康生物科技股份有限公司; 4% 多聚甲醛购自南京建成科技有限公司; TRIzol 试剂购于北京擎科生物科技有限公司; RT-qPCR 试剂盒和反转录试剂盒均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; 引物由北京擎科生物科技有限公司合成; 细胞组织 RIPA 裂解液、增强型 ECL 化学发光液、蛋白酶抑制剂均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; BCA 蛋白检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; 硝酸纤维素膜购于南京迈博生物科技有限公司。

1.1.2 试验仪器 试验仪器包括: 全自动生化分析仪 (7020, HITACHI); 全波长多功能酶标仪 (Synergy 2, BioTek); 全自动化学发光图像分析系统 (5200, Tanon); 微量核酸检测仪 (Nanodrop 2000, Thermo); 实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems); 光学显微镜 (Olympus-BX53)。

1.2 试验设计与日粮

1.2.1 动物饲养与管理 试验选取 120 只 1 日龄雄性 AA 肉鸡, 随机分为 2 组, 分别饲喂基础日粮和添加

BA的日粮。胆汁酸的添加分为3个阶段:3~7日龄(前期),剂量(每只鸡)为4、7、10、13、16 mg·d⁻¹;17~21日龄(中期),剂量为18、19、20、21、22 mg·d⁻¹;31~35日龄(后期),剂量为28、29、30、31、32 mg·d⁻¹。采用笼养方式饲养,1~3日龄,饲养室内温度为32~34℃,随后以每周2~3℃的速度降低温度,直到第35天的21~22℃。按常规程序进行免疫接种。全天光照,自由饮水和采食。

1.2.2 皮质酮处理 28日龄时从饲喂基础日粮的肉鸡中随机选取20只,随机分为对照组(CON),皮质酮注射组(CORT);从胆汁酸组随机选取10只进行皮质酮注射(CORT+BA)。CORT组和CORT+BA组肉鸡皮下注射4 mg·kg⁻¹皮质酮(溶解于含15%乙醇的PBS溶液中),连续注射7 d,CON组注射等量含15%乙醇的PBS溶液。于40日龄时结束试验,进行采样。

表1 日粮营养成分

Table 1 The nutrient component of the diet

组成 Ingredients	日龄 Days of age		营养成分 Nutrition composition	日龄 Days of age	
	1~21 d	22~40 d		1~21 d	22~40 d
玉米 Corn	559.6	613.7	干物质 Dry matter	909.70	889.80
豆粕 Soybean meal	374.0	324.0	粗蛋白 Crude protein	227.20	194.80
豆油 Soybean oil	25.0	25.0	总脂肪 Total fat	55.90	58.10
磷酸二氢 Dicalcium phosphate	13.0	12.4	灰分 Ash	64.10	55.80
碳酸钙 Calcium carbonate	11.5	11.2	代谢能 Metabolic energy ³⁾	12.36	12.58
氯化钠 Sodium chloride	2.3	2.2			
碳酸氢钠 Sodium bicarbonate	1.3	1.5			
DL-甲硫氨酸 DL-methionine	3.9	2.5			
L-赖氨酸 L-lysine	2.0				
L-苏氨酸 L-threonine	0.8	1.1			
前期预混料 Starter premix ¹⁾	5.0				
氯化胆碱 Choline chloride ²⁾	0.4	0.2			
后期预混料 Finisher premix		5.0			

注:1)前期预混料(每千克预混料中的营养水平):维生素A 3 500 000 IU;维生素E 6 000 IU;维生素K₃ 1 000 mg;维生素B1 600 mg;维生素B2 1 200 mg;维生素B6 500 mg;维生素B12 6 mg;生物素 40 mg;泛酸钙 4 000 mg;叶酸 150 mg;维生素C 1 500 mg;维生素B3 8 000 mg;锌 1 500 mg;铁 15 800 mg;锰 14 230 mg;铜 5 500 mg;碘 185 mg;钴 70 mg;硒 54 mg;钼 40 mg;胆碱 25 000 mg;丁羟甲苯 25 000 mg。2)后期预混料(每千克预混料中营养水平):维生素A 2 500 000 IU;维生素D3 1000 000 IU;维生素E 10 000 IU;维生素K3 700 mg;维生素B1 400 mg;维生素B2 800 mg;维生素B6 400 mg;维生素B12 4 mg;生物素 30 mg;泛酸钙 2 800 mg;叶酸 100 mg;维生素C 15 000 mg;维生素B3 5 600 mg;锌 10 500 mg;铁 10 920 mg;锰 9 950 mg;铜 3 550 mg;碘 137 mg;钴 70 mg;硒 70 mg;钼 30 mg;胆碱 25 000 mg;丁羟甲苯 25 000 mg。3)代谢能单位是 MJ·kg⁻¹。

Note: 1) Starter premix (nutrient level per kilogram): 3 500 000 IU of vitamin A; 6 000 IU of vitamin E; 1 000 mg of vitamin K₃; 600 mg of vitamin B1; 1 200 mg of vitamin B2; 500 mg of vitamin B6; 6 mg of vitamin B12; 40 mg of biotin; 4 000 mg of Ca pantothenate acid; 150 mg of folic acid; 1 500 mg of vitamin C; 8 000 mg of vitamin B3; 1 500 mg of Zn; 15 800 mg of Fe; 14 230 mg of Mn; 5 500 mg of Cu; 185 mg of I; 70 mg of Co; 54 mg of Se; 40 mg of Mo; 25 000 mg of choline; 25 000 mg butylated hydroxytoluene. 2) Finisher premix (nutrient level per kilogram): 2 500 000 IU of vitamin A; 1 000 000 IU of vitamin D3; 10 000 IU of vitamin E; 700 mg of vitamin K3; 400 mg of vitamin B1; 800 mg of vitamin B2; 400 mg of vitamin B6; 4 mg of vitamin B12; 30 mg of biotin; 2 800 mg of Ca pantothenate acid; 100 mg of folic acid; 15 000 mg of vitamin C; 5 600 mg of vitamin B3; 10 500 mg of Zn; 10 920 mg of Fe; 9 950 mg of Mn; 3 550 mg of Cu; 137 mg of I; 70 mg of Co; 70 mg of Se; 30 mg of Mo; 25 000 mg of choline; 25 000 mg of butylated hydroxytoluene. 3) The unit of metabolic energy is MJ·kg⁻¹.

1.3 测定指标与方法

1.3.1 生长情况与样品采集 采样前(40 d)称肉鸡体重,禁食12 h后屠宰采样。采集颈部动静脉混合血液,在4℃条件下3 500 r·min⁻¹离心20 min,将分离的血清置于EP管中,于20℃冰箱内储存。采集肝脏组织样及分子样,使用4%多聚甲醛缓冲液固定组织样,分子样迅速放入液氮中,采样结束后转移至-80℃冷冻保存。

1.3.2 组织器官发育 采集完整的肝脏称重,以器官重占肉鸡活体重的相对量来表示器官指数(g·kg⁻¹)。采集全部的腹部脂肪组织、腿肌组织称重,以组织重占肉鸡活体重的相对量来表示组织所占百分比(%)。

1.3.3 血液生化指标检测 血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TCHO)、高密度脂蛋白(HDLC)、低密度脂蛋白(LDLC)、游离脂肪酸(NEFA)、甘油三酯(TG)使用全自动生化分析仪以及相对应的试剂盒检测。

1.3.4 HE染色和油红O染色 对部分肝脏组织使用4%多聚甲醛缓冲液进行固定,切片,进行HE和油红O染色,每组6个。使用光学显微镜对切片进行观察和拍摄,观察组织形态与脂滴分布和大小。

1.3.5 总RNA提取 提取肉鸡肝脏组织总RNA,检测并统一浓度后反转录为cDNA,通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测肝脏中脂肪合成、分解和转运相关mRNA的相对表达量。引物序列见表2。

表 2 荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Sequence used for real-time PCR

目的基因 Target genes	序列号 GenBank number	序列 Sequences (5'→3')
<i>scd1</i>	NM_204890.1	F:TCAGCGTCAGCCCAATAAT/R:CAAGCCCCCTCTGCGATA
<i>acc</i>	NM_205505.2	F:CACCTCCCACCCAAACAGAA/R:TACGTGGACCATCCCGTAGT
<i>fasn</i>	NM_205155.4	F:CAAGCAAACGTGACTGCGAA/R:ACACTGAGCGAATCCTGGTG
<i>srebf1</i>	NM_204126.3	F:CTACCGCTCATCCATCAACG/R:CTGCTTCAGCTTCTGGTTGC
<i>pparα</i>	NM_001001464.1	F:TAGTAAGCTCTCAGAAACTTTGTTG/R:GCTGGTTTTCAGTGTCCACC
<i>cpt1a</i>	XM_040700879.1	F:AGCCGTAATGCACTCCCAAA/R:TACAAGCTGACCACCAGCTC
<i>lpl</i>	XM_046934870.1	F:GACAGCTTGGCACAGTGCAA/R:CACCCATGGATCACCACAAA
<i>ppia</i>	NM_001166326.2	F:GTGACTTACGCGCCACAAC/R:TTGCTCGTCTTGCCGTCTTT

注:*scd1*:硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因 Stearoyl-CoA desaturase 1 gene;*acc*:乙酰辅酶 A 羧化酶基因 Acetyl CoA carboxylase gene;*fasn*:脂肪酸合成酶基因 Fatty acid synthase gene;*srebf1*:固醇调节元件结合转录因子基因 Sterol regulatory element binding transcription factor 1 gene;*pparα*:过氧化物增殖激活受体基因 Peroxisome proliferator activated receptor alpha gene;*cpt1a*:肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A 基因 Carnitine palmitoyl-transferase 1A gene;*lpl*:脂蛋白脂肪酶基因 Lipoprotein lipase gene;*ppia*:肽酰脯氨酰异构酶 A 基因 Peptidylprolyl isomerase A gene.

1.3.6 Western blot 检测 称取肝脏样品约 30 mg,按 1:10 的比例加入 RIPA 裂解缓冲液后匀浆。匀浆后样品在 4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。收集上清液,使用 Pierce BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。变性蛋白样品(30 μg 蛋白)经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。随后将蛋白转印至硝化纤维素膜上,以 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗膜后与二抗反应 2 h。洗涤后,使用增强化学发光试剂,避光孵育后放入全自动化学发光图像分析系统中进行图像采集。以 GAPDH 作为内参。利用 Image J 软件对条带灰度进行量化分析。抗体信息见表 3。

表 3 Western blot 检测所用抗体信息

Table 3 Information of antibody used for Western bolt

抗体名称 Antibody	来源 Source	货号 Catalogue No.	抗体名称 Antibody	来源 Source	货号 Catalogue No.
FASN	Proteintech	10624-2-AP	CD36	Bioworld	BS7861
CPT1a	Proteintech	15184-I-AP	GAPDH	Bioworld	MB001H
PPARα	Proteintech	15540-I-AP			

注:FASN:脂肪酸合成酶 Fatty acid synthase;CPT1a:肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A Carnitine palmitoyl-transferase 1A;PPARα:过氧化物增殖激活受体 Peroxisome proliferator activated receptor alpha;CD36:脂肪酸转位酶 fatty acid translocase;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

1.3.7 数据统计与分析 所有结果以平均值±标准误表示,各组间显著性差异采用 SPASS 19.0 软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 肉鸡体重、器官重及器官指数变化

由表 4 可知:与对照组相比,CORT 注射对肉鸡体重、肝重和肝脏指数无显著影响($P>0.05$),但显著降低肉鸡的腿肌重,显著增加了腹脂重及腹脂率($P<0.05$)。BA 能缓解由 CORT 引起的腿肌重的减少和腹部脂肪的增加($P<0.01$),同时显著增加腿肌率($P<0.05$)。提示 BA 可改善 CORT 引起的肉鸡腹部脂肪沉积和腿部肌肉流失。

表 4 不同处理肉鸡体重、器官重和器官指数变化

Table 4 Changes of body weight, organ weight and organ index in broilers under different treatments

项目 Items	对照 CON	皮质酮 CORT	皮质酮+胆汁酸 CORT+BA
体重/g Body weight	1 817.00±53.48	1 765.00±49.52	1 826.00±117.89
肝重/g Liver weight	38.20±2.57	37.27±1.92	39.69±1.75
肝指数/(g·kg ⁻¹) Liver index	20.95±1.04	22.24±1.01	21.96±1.02
腿肌重/g Leg muscle weight	60.13±2.95 ^a	50.47±1.68 ^b	59.46±2.55 ^a
腿肌率/% Percentage of leg muscle	3.27±0.13 ^{ab}	2.84±0.12 ^b	3.30±0.17 ^a
腹脂重/g Abdominal fat weight	6.18±1.44 ^b	15.59±1.86 ^a	11.74±1.57 ^a
腹脂率/% Percentage of abdominal fat	0.34±0.08 ^c	0.92±0.10 ^a	0.64±0.07 ^b

注:1) CON:Control;CORT:Corticosterone;BA;Bile acid. 2) 不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$). 下同。The same below.

2.2 肉鸡血清中相关生化指标变化

由表 5 可知:对照组相比,CORT 组肉鸡血清中 ALT 活性、GLU、TCHO 和 TG 水平均无显著变化

($P>0.05$), 但 HDLC 和 LDLC 水平显著降低, 而 NEFA 水平显著升高($P<0.05$)。BA 处理显著提高了血液 HDLC 水平($P<0.05$)。以上结果表明, CORT 处理引起机体脂质代谢的紊乱, 而 BA 处理可改善脂代谢。

表 5 不同处理肉鸡血清中相关生化指标变化

Table 5 Changes of biochemical indexes in serum of broilers under different treatments

项目 Items	对照 CON	皮质酮 CORT	皮质酮+胆汁酸 CORT+BA
谷丙转氨酶活性/($U \cdot L^{-1}$) ALT activity	9.50±1.04	10.29±0.64	9.50±0.50
葡萄糖水平/($mmol \cdot L^{-1}$) GLU level	7.29±2.31	9.66±0.62	10.22±0.22
总胆固醇水平/($mmol \cdot L^{-1}$) TCHO level	3.06±0.57	2.92±0.17	3.06±0.14
高密度脂蛋白水平/($mmol \cdot L^{-1}$) HDLC level	2.58±0.04 ^a	1.99±0.16 ^b	2.41±0.02 ^a
低密度脂蛋白水平/($mmol \cdot L^{-1}$) LDLC level	1.22±0.09 ^a	0.72±0.04 ^b	0.71±0.06 ^b
游离脂肪酸水平/($mmol \cdot L^{-1}$) NEFA level	0.34±0.07 ^b	0.66±0.08 ^a	0.71±0.06 ^a
甘油三酯水平/($mmol \cdot L^{-1}$) TG level	0.49±0.07	0.55±0.04	0.52±0.02

Note: ALT: Alanine transaminase; GLU: Glucose; TCHO: Total cholesterol; HDLC: High-density lipoprotein; LDLC: Low-density lipoprotein; NEFA: Non-esterified fatty acid; TG: Triglyceride.

2.3 肉鸡肝脏 TG 含量变化

由图 1 可知: HE 染色结果表明 CORT 处理组肉鸡肝脏组织松散, 存在明显的脂滴空泡; 油红染色结果进一步显示 CORT 处理组肝脏内有大面积的脂滴分布, 生化检测结果显示肝脏 TG 水平显著上升($P<0.01$)。而 BA 添加显著降低了肝脏中 TG 水平, 改善了肝脏脂肪沉积现象($P<0.05$)。表明胆汁酸可缓解皮质酮引起的肉鸡脂肪肝综合征现象。

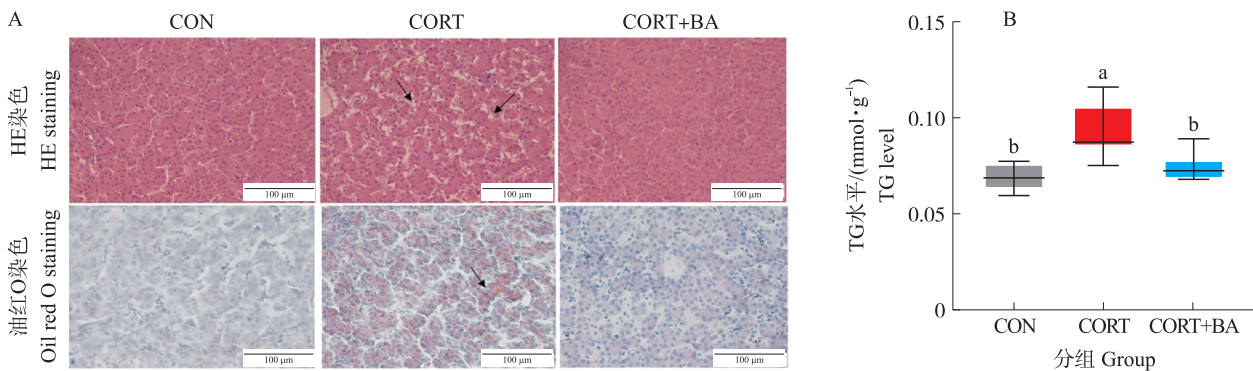


图 1 不同处理肉鸡肝脏内甘油三酯水平的变化

Fig. 1 HE and oil red O staining of liver tissue and hepatic TG level in broilers under different treatments

2.4 肉鸡肝脏脂代谢相关基因表达变化

由图 2 可知: CORT 显著上调肉鸡肝脏中脂肪合成关键酶硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(*cd1*)和乙酰辅酶 A 羧化酶(*acc*)的基因表达($P<0.05$)。BA 添加后降低了 *scd1* 及 *acc* 的基因表达量($P<0.05$), 且显著增加了脂肪酸 β 氧化关键酶肉毒碱棕榈酰基转移酶(*cpt1a*)基因表达量($P<0.05$)。与对照组相比, CORT 和 CORT+BA 组肝脏中脂肪酸合成酶(*fasn*)、固醇调节元件结合转录因子 1(*srebf1*)、过氧化物增殖激活受体(*ppar α*)及脂蛋白脂肪酶(*lpl*)的 mRNA 表达量无显著差异($P>0.05$)。提示饲料中添加 BA 显著抑制由 CORT 诱导的肝脏 TG 合成。

2.5 肉鸡肝脏脂代谢相关蛋白表达变化

由图 3 可知: BA 显著缓解了由 CORT 引起的肝脏脂肪合成有关蛋白 FASN 和 ACC 的表达上调, 以及脂肪酸氧化分解相关转录因子 PPAR α 的蛋白表达水平下调($P<0.05$); 与 CORT 组相比, CORT+BA 组肝脏中脂肪酸转移酶(CD36)的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。提示: CORT 处理促进肉鸡肝脏中脂肪酸从头合成蛋白的表达, 抑制脂肪酸的 β 氧化, 而胆汁酸处理能抵抗 CORT 的上述作用, 并抑制肝脏对外周游离脂肪酸的吸收。

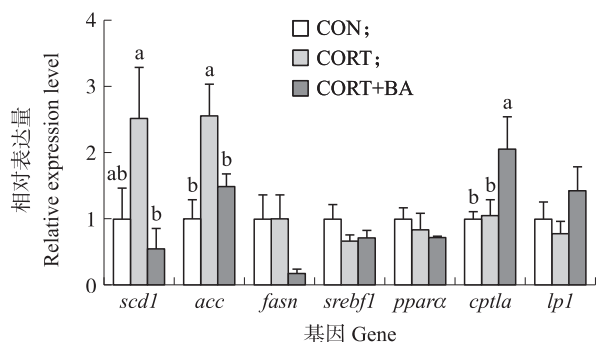


图 2 不同处理肉鸡肝脏脂代谢关键基因表达变化

Fig. 2 Changes of gene expression involving in hepatic lipid metabolism in broilers under different treatments

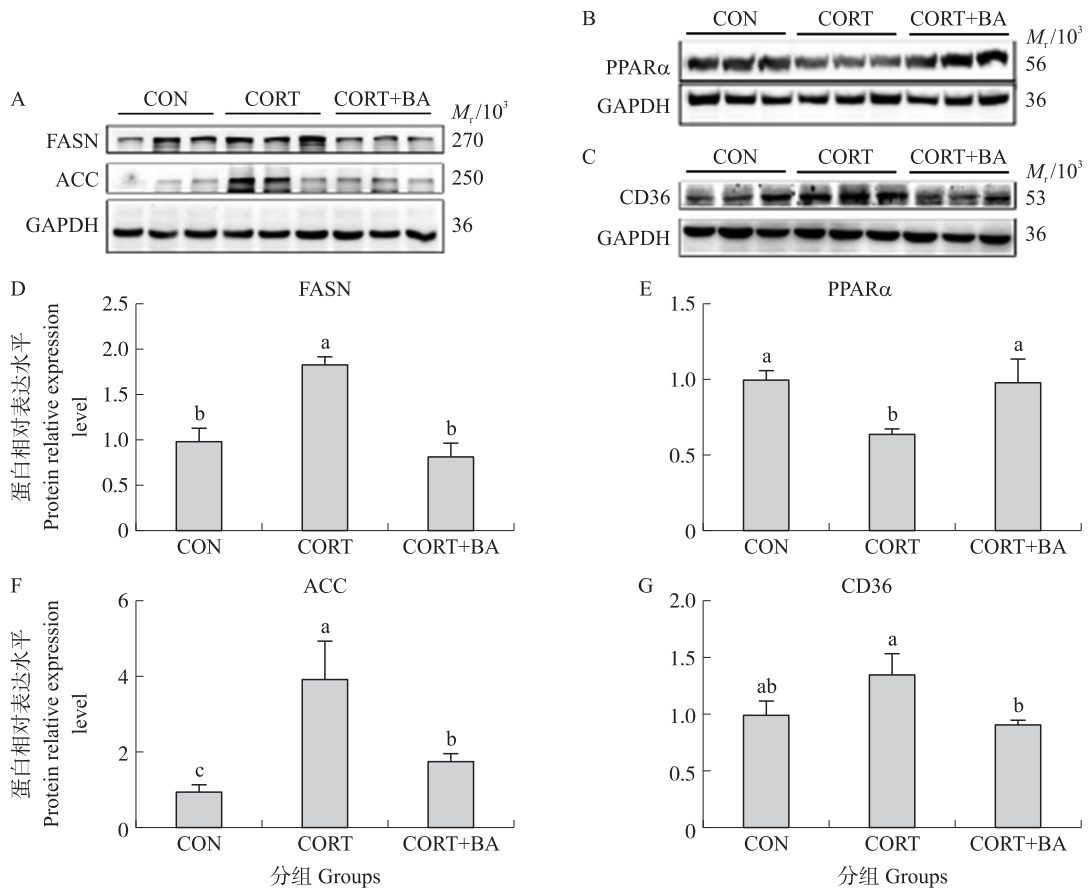


图 3 不同处理肉鸡肝脏脂代谢关键蛋白表达变化

Fig. 3 Changes of protein expression involving in hepatic lipid metabolism in broilers under different treatments

A—C. 蛋白免疫印迹条带 Protein blotting; D—G. 肝脏脂代谢关键蛋白表达水平 Expression levels of key protein involving in lipid metabolism in liver.

3 讨论

外源性 CORT 注射可诱导家禽肝脏中脂质异常积聚和炎症反应,从而发展为脂肪肝综合征^[8,16]。CORT 通过 GR 动员组织从头合成脂肪酸,增加循环中的游离脂肪酸水平引发肝脏脂肪沉积增加。机体中糖皮质激素水平过高会促进肝外组织,尤其是肌肉组织蛋白的分解,导致肌肉萎缩。本研究采用皮质酮注射后同样引起了肉鸡腹部脂肪堆积,腹脂重和腹脂率显著升高,外周血液中游离脂肪酸水平显著升高,同时腿肌重显著降低,与之前的研究结果相吻合^[17-18]。已有研究^[13,15]表明,饲料中添加 BA 可减少腹脂沉积并增加胸肌重。本研究结果显示,饲料中添加 BA 不影响皮质酮引起的脂肪酸动员,但可显著缓解由皮质酮诱导的腹脂沉积和肉鸡的腿肌重和腿肌率降低,因此可能加速了肌肉组织而非脂肪组织对脂质的储存及转化。此外,BA 添加使血清中 HDLC 水平显著升高,提示对脂类代谢的有益作用。

当肝脏中脂质的合成速率超过其分解速率时,肝脏中出现脂质过载,产生脂质沉积,最终诱发脂肪肝^[19]。在本研究中,尽管 CORT 处理组肉鸡肝重和肝指数无显著变化,但肝脏内出现了较多的脂滴空泡,油红 O 染色显示有大面积的脂滴分布,同时肝脏 TG 水平显著上升。而添加 BA 显著改善了肝脏中脂肪变性,降低了 TG 沉积。研究表明 GR 可以靶向结合到脂代谢相关基因启动子区域调节其转录表达,GC 处理导致大鼠肝脏 TG 升高,主要是因为促进了脂肪酸从头合成过程^[20-21]。在家禽中,CORT 处理可以通过促进脂肪酸合成关键基因 *acc*、*fasn*、*scd1* 和 *sredf1* 的去甲基化修饰来促进其表达^[22]。因此,为了进一步探究 BA 缓解肉鸡肝脏脂肪沉积的作用机制,我们检测了肝脏中与脂质合成、分解及转运有关的基因和蛋白的表达。

FASN、ACC、SCD1 是调控肝脏中脂肪酸从头合成的关键酶,分别催化脂肪酸从头合成、长链脂肪合成

以及单不饱和脂肪酸的合成。研究表明利用药物或者基因缺失等方式抑制这3种关键酶的合成,可有效改善糖尿病或基因模型小鼠的肝脏脂肪变性以及脂质代谢紊乱^[23-25]。因此,抑制肝脏脂肪生成可能是缓解肝脏脂肪变性相关疾病的有效手段。本研究结果显示,饲料中添加BA显著抑制皮质酮引起的肝脏中*scd1*和*scc*基因表达及FASN和ACC蛋白表达的上调,从而抑制肝脏的脂质合成。BA对脂代谢的调控主要是通过激活受体实现的,其中FXR受体的激活在BA诱导的糖脂代谢调控中起关键作用。FXR可通过调节下游靶点PPAR α 来促进肝脏脂肪酸 β 氧化^[10]。PPAR α 是一种转录因子核受体,对脂肪合成、脂肪酸氧化及运输等代谢途径具有转录调节活性^[26-27]。研究发现PPAR α 的下游靶点包括CPT1a、SCD1和CD36等^[28]。PPAR α 对CPT1a和CD36基因的表达具有正向调控作用,从而影响脂肪酸转运和吸收过程。CPT1a位于线粒体外膜,将脂肪酸从细胞质转移到线粒体中进行 β 氧化,是脂肪酸氧化分解的限速酶^[29]。CD36为脂肪酸转位酶在大部分组织都有表达,在促进长链脂肪酸的摄取和细胞内运输中起着重要作用^[30]。在脂肪肝患者和动物脂肪肝模型中CD36表达显著增加,而CD36敲除鼠对高脂引起的肝脏脂肪沉积具有抵抗作用^[31-32]。本研究结果显示,饲料中添加BA显著上调了肉鸡肝脏中PPAR α 蛋白的表达和*cpt1a* mRNA的表达。相对于CORT组,CORT+BA组中肝脏CD36蛋白的表达显著下调。因此,BA对肝脏脂肪沉积的缓解作用是通过抑制脂肪酸合成、促进脂肪酸氧化分解并抑制肝脏对外周脂肪酸的吸收实现。

BA可直接激活蛋白激酶诱导小异源二聚体伴侣受体(SHP)发生磷酸化,经过一系列分子级联反应导致代谢靶基因的抑制性修饰,降低肝脏中TG水平^[33]。此外,BA还可激活磷酸鞘氨醇受体(S1PR2)调控脂代谢,喂食HFD的*s1pr2*敲除小鼠的肝脏脂质积累增加^[34]。在肠道中,BA受体FXR的激活,可通过FXR-FGF15/19-SHP轴使肝脏中FASN发生DNA甲基化修饰,抑制脂肪合成^[35]。因此,在CORT处理下,BA所引起变化的相关机制还有待进一步研究。

总之,本研究表明日粮中添加BA可通过对肝脏脂代谢关键基因和蛋白表达的调控,通过减少脂质合成,促进脂肪酸分解,抑制肝脏对脂肪酸摄取,缓解由皮质酮注射引起的肉鸡肝脏脂肪沉积。本研究为BA在家禽养殖中的合理使用提供了试验依据,对改善肉鸡健康,提升动物福利有重要意义。

参考文献 References:

- [1] Chen W, Shi Y, Li G Y, et al. Preparation of the peroxisome proliferator-activated receptor α polyclonal antibody: its application in fatty liver hemorrhagic syndrome[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 179-186.
- [2] Rozenboim I, Mahato J, Cohen N A, et al. Low protein and high-energy diet: a possible natural cause of fatty liver hemorrhagic syndrome in caged White Leghorn laying hens[J]. Poultry Science, 2016, 95(3): 612-621.
- [3] 徐之勇, 于树涛, 仲崇岳, 等. 肉鸡的脂肪肝综合征[J]. 山东畜牧兽医, 2008, 29(2): 12-14.
Xu Z Y, Yu S T, Zhong C Y, et al. Fatty liver syndrome in broilers[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2008, 29(2): 12-14 (in Chinese with English abstract).
- [4] Shini A, Shini S, Bryden W L. Fatty liver hemorrhagic syndrome occurrence in laying hens: impact of production system[J]. Avian Pathology, 2019, 48(1): 25-34.
- [5] Tsai S F, Hung H C, Shih M M C, et al. High-fat diet-induced increases in glucocorticoids contribute to the development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. FASEB Journal, 2022, 36(1): e22130.
- [6] Marks D L, Braum T P. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids[J]. Frontiers in Physiology, 2015, 6: 12.
- [7] Hu Y, Sun Q W, Hu Y, et al. Corticosterone-induced lipogenesis activation and lipophagy inhibition in chicken liver are alleviated by maternal betaine supplementation[J]. The Journal of Nutrition, 2018, 148(3): 316-325.
- [8] Petta I, Dejager L, Ballegeer M, et al. The interactome of the glucocorticoid receptor and its influence on the actions of glucocorticoids in combatting inflammatory and infectious diseases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(2): 495-522.
- [9] Jiao T Y, Ma Y D, Guo X Z, et al. Bile acid and receptors: biology and drug discovery for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2022, 43(5): 1103-1119.
- [10] Chow M D, Lee Y H, Guo G L. The role of bile acids in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2017, 56: 34-44.
- [11] Puri P, Daita K, Joyce A, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2018, 67(2): 534-548.
- [12] Gillard J, Clerbaux L A, Nachit M, et al. Bile acids contribute to the development of non-alcoholic steatohepatitis in mice[J]. JHEP Reports, 2022, 4(1): 100387.
- [13] Lai W Q, Huang W G, Dong B, et al. Effects of dietary supplemental bile acids on performance, carcass characteristics, serum lipid metabolites

- and intestinal enzyme activities of broiler chickens[J]. *Poultry Science*,2018,97(1):196–202.
- [14] Hemati Matin H R,Shariatmadari F,Karimi Torshizi M A, et al. In vitro bile acid-binding capacity of dietary fibre sources and their effects with bile acid on broiler chicken performance and lipid digestibility[J]. *British Poultry Science*,2016,57(3):348–357.
- [15] Ge,X K,Wang A A,Ying Z X, et al. Effects of diets with different energy and bile acids levels on growth performance and lipid metabolism in broilers[J]. *Poultry Science*,2019,98(2):887–895.
- [16] Mehaisen G M K,Eshak M G,Elkaiaty A M, et al. Comprehensive growth performance,immune function,plasma biochemistry, gene expressions and cell death morphology responses to a daily corticosterone injection course in broiler chickens[J]. *PLoS One*,2017,12(2):e0172684.
- [17] Lin H,Sui S J,Jiao H C, et al. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*,2006,143(3):400–405.
- [18] Malheiros R,Moraes V,Collin A, et al. Free diet selection by broilers as influenced by dietary macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection,organ weights,and plasma metabolites[J]. *Poultry Science*,2003,82(1):123–131.
- [19] Chakravarthy M V,Neuschwander-Tetri B A. The metabolic basis of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*,2020,3(4):e00112.
- [20] Flynn B P,Birmie M T,Kershaw Y M, et al. Corticosterone pattern-dependent glucocorticoid receptor binding and transcriptional regulation within the liver[J]. *PLoS Genetics*,2021,17(8):e1009737.
- [21] Vasiljević A,Veličković N,Bursać B, et al. Enhanced prereceptor glucocorticoid metabolism and lipogenesis impair insulin signaling in the liver of fructose-fed rats[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*,2013,24(11):1790–1797.
- [22] 胡云. 糖皮质激素诱导的鸡脂肪肝发生机制与甜菜碱的缓解作用[D]. 南京:南京农业大学.
- Hu Y. Mechanism of glucocorticoid-induced fatty liver in chickens and the alleviating effect of betaine[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University(in Chinese with English abstract).
- [23] Zhang M Y,Tang Y,Tang E, et al. MicroRNA-103 represses hepatic de novo lipogenesis and alleviates NAFLD via targeting FASN and SCD1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2020,524(3):716–722.
- [24] Hu Y F,He W Z,Huang Y P, et al. Fatty acid synthase-suppressor screening identifies sorting nexin 8 as a therapeutic target for NAFLD[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*,2021,74(5):2508–2525.
- [25] Calle R A,Amin N B,Carvajal-Gonzalez S, et al. ACC inhibitor alone or co-administered with a DGAT2 inhibitor in patients with non-alcoholic fatty liver disease:two parallel, placebo-controlled, randomized phase 2a trials[J]. *Nature Medicine*,2021,27(10):1836–1848.
- [26] Lee Y H,Jang H J,Kim S, et al. Hepatic MIR20B promotes nonalcoholic fatty liver disease by suppressing PPARA[J]. *Elife*,2021,10:e70472.
- [27] Kersten S,Stientra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver[J]. *Biochimie*,2017,136:75–84.
- [28] Zhang Q,Kong X J,Yuan H, et al. Mangiferin improved palmitate-induced-insulin resistance by promoting free fatty acid metabolism in HepG2 and C2C12 cells via PPAR α ;mangiferin improved insulin resistance[J]. *Journal of Diabetes Research*,2019,2019:2052675.
- [29] Briant L J B,Dodd M S,Chibalina M V, et al. CPT1a-dependent long-chain fatty acid oxidation contributes to maintaining glucagon secretion from pancreatic islets[J]. *Cell Reports*,2018,23(11):3300–3311.
- [30] Zhao L,Zhang C,Luo X X, et al. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Journal of Hepatology*,2018,69(3):705–717.
- [31] Carmelo G M,Oreste L I,Javier C, et al. Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *European Journal of Clinical Investigation*,2014,44(1):65–73.
- [32] Wilson C G,Tran J L,Erion D M, et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice[J]. *Endocrinology*,2016,157(2):570–585.
- [33] Seok S,Kanamaluru D,Xiao Z, et al. Bile acid signal-induced phosphorylation of small heterodimer partner by protein kinase C ζ is critical for epigenomic regulation of liver metabolic genes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*,2013,288(32):23252–23263.
- [34] Studer E,Zhou X Q,Zhao R P, et al. Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*,2012,55(1):267–276.
- [35] Kim Y C,Seok S,Zhang Y, et al. Intestinal FGF15/19 physiologically repress hepatic lipogenesis in the late fed-state by activating SHP and DNMT3A[J]. *Nature Communications*,2020,11(1):1–14.

责任编辑:周广礼 沈波