

奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型的构建

孔令联¹, 崔艳军¹, 杨金勇², 李东平¹, 刘东鑫¹, 王 翀^{1*}, 茅慧玲^{1*}

(1. 浙江农林大学动物科技学院, 动物营养研究所, 浙江杭州 311300;

2. 浙江省畜牧技术推广总站, 浙江杭州 310021)

摘要: 本试验旨在构建奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型, 为研究氧化应激状态下的肠道养分吸收机制提供平台和基础。采用不同浓度的 H₂O₂ (0、50、100、200、400、800 μmol/L) 处理奶牛小肠上皮细胞不同时间 (2、4、6 h), 用噻唑蓝 (MTT) 法测定细胞存活率, 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 法测定细胞内活性氧 (ROS) 含量, 比色法测定乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。结果表明: 与对照组相比, 200 μmol/L H₂O₂ 作用奶牛小肠上皮细胞 2 h 的细胞存活率 (64.03%) 显著降低 (P<0.05), 细胞内 ROS 含量和培养液中 LDH 活性显著上升 (P<0.05), 细胞内 SOD 和 GSH-Px 活性均显著降低 (P<0.05)。综上所述, 200 μmol/L H₂O₂ 作用奶牛小肠上皮细胞 2 h, 可构建奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型。

关键词: 过氧化氢; 奶牛; 肠上皮细胞; 氧化应激

中图分类号: S823.5

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.2018-11-079

氧化应激是机体内氧化-抗氧化平衡状态的一种失衡, 会导致细胞损伤。大多数细胞能够承受一定程度的氧化应激, 这是由于它具有足够的抗氧化防御能力和修复系统, 能够识别和清除被氧化损伤的分子^[1]。当体内高活性分子如活性氧 (ROS) 产生过多且超出机体的防御能力时, 就会导致氧化应激, 从而导致诸如脂类、DNA 和蛋白质等生物大分子的损伤, 并可导致疾病^[2]。

小肠上皮细胞是体内更新速度最快的一类细胞, 消化食物、吸收营养的同时防止有害物质侵入体内, 其结构和功能的完整性对奶牛的健康状况和生产性能有重要影响。引起奶牛氧化应激的因素有很多, 包括高强度代谢、环境因素、日粮结构等^[3]。肠上皮细胞容易受到氧化应激的影响, 在多种生理、病理及饮食不当过程中都可能产生氧化损伤, 如炎性肠病、断奶

应激、热应激等^[4]。目前, 在细胞水平上关于奶牛氧化应激的报道主要集中在乳腺, 对奶牛肠细胞氧化损伤机制的研究甚少, 因此建立奶牛小肠上皮细胞氧化应激模型, 对于揭示细胞氧化应激机制、研究开发抗氧化型日粮, 提高机体抗氧化能力和肠道营养物质吸收能力具有重要的意义。过氧化氢 (H₂O₂) 是一种氧化作用较强的 ROS, 可诱导细胞产生氧化应激, 由于其性质相对稳定且易于获得, 被广泛应用于各类细胞氧化应激损伤的研究^[5]。本试验利用奶牛小肠上皮细胞系, 以 H₂O₂ 为诱导剂, 建立奶牛小肠上皮细胞体外氧化应激模型, 为进一步研究奶牛肠道的氧化损伤机制及氧化应激下的营养物质吸收规律提供平台和基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 永生奶牛小肠上皮细胞系 (取自空肠段) 购自上海赛齐生物工程有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; PBS、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液购自上海生工生物工程有限公司; 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO)、氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)、甲醇、氢氧化钾均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 3% H₂O₂、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物

收稿日期: 2018-06-15; 修回日期: 2018-08-27

资助项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (自然科学基金 LY18 C170002); 杨胜先生门生社群项目 (B2016017、C2016042)

作者简介: 孔令联 (1990-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为反刍动物营养, E-mail: 1070637758@qq.com; 并列第一作者: 崔艳军 (1986-), 男, 山西吕梁人, 博士, 研究方向为动物营养与应激, E-mail: cuiyanjun196@163.com

* 通讯作者: 王翀, E-mail: wangcong992@163.com; 茅慧玲, E-mail: yangcaimei2012@163.com

物酶 (GSH-Px) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 96孔板和6孔板购自 Corning 公司。CO₂ 培养箱 (Thermo)、倒置显微镜 (Motic)、酶标仪 (Thermo)、T6 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 试剂配制 H₂O₂ 贮备液的配制: 3% H₂O₂ 浓度约为 882 mmol/L, 分别加入无菌双蒸水稀释至 50、100、200、400、800 mmol/L 作为贮备液备用。

处理培养液的配制: 分别取 20 μL 不同浓度的 H₂O₂ 贮备液加入到 19.98 mL 的 DMEM 培养基中^[6], 使处理培养液中 H₂O₂ 浓度分别为 0、50、100、200、400、800 μmol/L。配制好的培养基过滤除菌, H₂O₂ 贮备液现用现配。

氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 反应液的配制: 准确称取 10 mg NBT, 加无菌 PBS 溶解定容至 10 mL, 配制浓度为 1 mg/mL 的 NBT 反应液过滤除菌备用。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养与试验分组 将奶牛小肠上皮细胞按 3×10⁵ 个/mL 接种在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素、10 mmol/L HEPES 缓冲液、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基中, 放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中温育, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期的第 3 代贴壁生长的细胞用于试验, 对数期为 2~4 d。试验一: 采用单因子完全随机试验设计, 将细胞随机分为 6 组, 每组 6 个重复, 试验重复 3 次。试验组培养液中分别添加 0、50、100、200、400、800 μmol/L 的 H₂O₂ (0 μmol/L 为对照组), 分别作用细胞 2、4、6 h, 测定细胞存活率, 初步筛选适宜的 H₂O₂ 作用时间。试验二: 在筛选出适宜 H₂O₂ 作用时间 (2 h) 的基础上, 采用单因子完全随机试验设计, 用不同浓度 (0、50、100、200、400、800 μmol/L) 的 H₂O₂ 分别作用细胞 2 h, 收集细胞和培养液, 测定抗氧化指标, 进一步筛选出建立奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型的适宜 H₂O₂ 浓度。

1.3.2 细胞存活率检测 采用 MTT 比色法检测细胞存活率^[7], 取对数生长期奶牛小肠上皮细胞以 5×10⁴ 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板上, 共设 6 组, 每组 6 个重复孔, 试验重复 3 次, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 去除培养液, 每孔分别加入 100 μL 的 0、50、100、200、400、800 μmol/L H₂O₂ 浓度的处理培养液, 分别处理细胞 2、4、6 h, 去除处理培养液, 换新鲜培

养液, 同时每孔加入 20 μL 5 g/L 的 MTT, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 去除培养液及 MTT, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 震荡 5 min, 用酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处的吸光度。根据下列公式计算存活率。

$$\text{存活率} = (\text{处理组 OD} / \text{对照组 OD}) \times 100\%$$

1.3.3 ROS 检测 采用 NBT 还原法检测 ROS^[8]。NBT 法通常作为超氧化物的检测方法, 可生成难溶的蓝色结晶甲瓩, 同样也可用于 ROS 检测^[9]。将对数生长期的奶牛小肠上皮细胞以 5×10⁴ 个/mL 细胞密度制成细胞悬液, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板上, 加入 H₂O₂ 处理 2 h, 去除含 H₂O₂ 的培养液, PBS 洗 3 遍, 加入 NBT 反应液, 每孔 100 μL, 37°C、5% CO₂ 孵育 2 h, 去除 NBT 反应液, 每孔加入 200 μL 甲醇, 5 min 后用 70% 甲醇洗 2 次, 去除液体、吹干, 每孔加入 120 μL 2 mol/L 的氢氧化钾 (KOH) 和 140 μL DMSO。待结晶物充分溶解后, 用酶标仪测定各孔在波长 620 nm 处的吸光度值。

1.3.4 LDH、SOD、GSH-Px 测定 将奶牛小肠上皮细胞以 2×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板, 试验重复 3 次, 倒置显微镜下观察细胞长至 70%~80%, 换含 H₂O₂ 的处理培养液, H₂O₂ 处理 2 h 后, 收集细胞培养液于 2 mL Eppendorf 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用于 LDH 活性测定。取细胞, 无菌 PBS 洗 2 遍, 加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 收集细胞悬液于 10 mL 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入无菌 PBS 洗 1 次再离心 5 min, 弃上清后加入 1 mL PBS 制成细胞悬液, 细胞破碎机破碎 (冰水浴, 功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 4 s, 超声 5 min), 参照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书, 测定细胞内 SOD 和 GSH-Px 活性。LDH 活性采用微板法测定, 单位定义为 1 000 mL 细胞培养液 37°C 与基质作用 15 min, 在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 单位; SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定, 单位定义为每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U); GSH-Px 活性采用比色法测定, 单位定义为每 0.1 mL 反应液在 37°C 反应 5 min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

1.4 统计分析 试验采用 SPSS 22.0 统计软件, 选择单因素 ANOVA 程序对数据进行方差分析, 两两比较采用 LSD 法。结果表示为平均值 ± 标准差。P<0.05 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 对奶牛小肠上皮细胞存活率的影响 由表 1 可见, 随着 H₂O₂ 浓度增加, H₂O₂ 处理组细胞存活率较对照组显著降低 ($P<0.05$)。50 μmol/L 组存活率均在 80% 以上, 细胞损伤较小; 100 μmol/L 组处理细胞 6 h 后, 细胞存活率降低至 55%, 2 h 和 4 h 组存活率均大于 70%; 200 μmol/L 组处理细胞 2 h 后, 细胞存活率相对于对照组显著降低至 64.03% ($P<0.05$), 符合建立氧化应激模型的条件; 400、800 μmol/L 组存活率进一步降至 30% 左右, 细胞存活率较低。

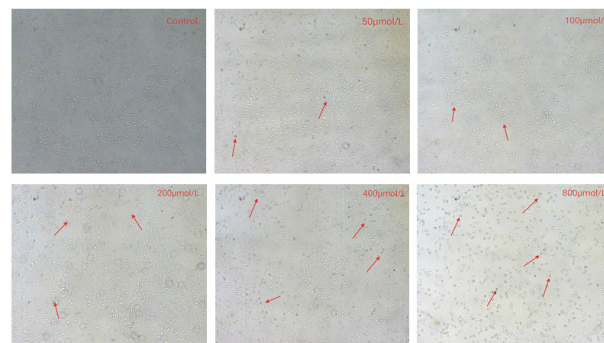
表 1 H₂O₂ 对奶牛小肠上皮细胞存活率的影响 (n=6) %

组别	2 h 组存活率	4 h 组存活率	6 h 组存活率
对照组	100 ^a	100 ^a	100 ^a
50 μmol/L	86.72±1.58 ^b	82.87±2.54 ^b	76.85±1.44 ^b
100 μmol/L	76.21±2.32 ^c	72.74±3.23 ^c	55.04±3.59 ^c
200 μmol/L	64.03±1.79 ^d	42.62±2.39 ^d	44.72±0.67 ^d
400 μmol/L	57.11±0.76 ^e	38.32±1.29 ^e	31.82±0.40 ^e
800 μmol/L	32.43±2.03 ^f	36.38±1.95 ^e	32.62±2.51 ^e

注: 同列数据肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。下表同

2.2 H₂O₂ 作用 2 h 对奶牛小肠上皮细胞形态的影响 由图 1 可见, 不同浓度 H₂O₂ 处理奶牛小肠上皮细胞 2 h 后, 对照组细胞贴壁良好, 形态正常且分布均匀; 50、100 μmol/L 组细胞形态无明显变化, 细胞间隙变大, 少量细胞变圆脱落; 200 μmol/L 组细胞体积缩小, 细胞间隙增大并出现小部分脱落, 少量细胞变圆死亡; 400、800 μmol/L 组细胞形态显著改变, 细胞变圆变亮, 死亡数量较多; 800 μmol/L 组大量细胞脱落, 细胞核突出, 产生了 DNA 损伤。

2.3 细胞内 ROS 和培养液中 LDH 含量 由表 2 可见, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 100~800 μmol/L 组细胞内 ROS 含量相对于对照组和 50 μmol/L 组显著上升 ($P<0.05$)。细胞培养液中 LDH 含量随着 H₂O₂ 浓度的增加逐渐升高, 当浓度达到 200 μmol/L 时, LDH 的含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。



箭头表示该处细胞形态变化显著

图 1 H₂O₂ 作用 2 h 对奶牛小肠上皮细胞形态的影响 (×100)

2.4 H₂O₂ 作用 2 h 对奶牛小肠上皮细胞 ROS、LDH、SOD、GSH-Px 活性的影响 由表 2 可见, 50 μmol/L 组细胞内 T-SOD 活性较对照组无显著变化 ($P>0.05$), 100 μmol/L 组 T-SOD 活性上升 ($P>0.05$); 相对于对照组, 200、400、800 μmol/L 组 T-SOD 活性显著降低 ($P<0.05$)。随着 H₂O₂ 浓度增加, 细胞内 GSH-Px 活性呈降低趋势, 当 H₂O₂ 浓度达到 200 μmol/L 时, 与对照组相比细胞内 GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.05$)。

3 讨论

氧化应激是 ROS 在体内产生的一种负面作用, 机体在受到外界刺激及生理代谢过程中会产生很多具有潜在毒性的自由基^[10], 这些物质具有高度的活性, 可以修改蛋白质、脂类和核酸 (DNA 和 RNA) 等多种生物

表 2 H₂O₂ 作用 2 h 对奶牛小肠上皮细胞 ROS、LDH、SOD、GSH-Px 活性的影响 (n=3)

组别	ROS 含量 (相对于对照组), %	LDH 含量, U/L	SOD 活性, U/mgprot	GSH-Px 活性, U/mgprot
对照组	100 ^a	257.04±20.35 ^a	22.19±0.37 ^a	161.98±10.26 ^a
50 μmol/L	110.59±1.65 ^a	327.58±34.23 ^{ab}	21.82±1.17 ^{ab}	153.13±13.83 ^a
100 μmol/L	120.54±4.09 ^b	330.67±13.53 ^{ab}	22.81±0.67 ^{ab}	142.14±13.12 ^a
200 μmol/L	131.58±1.40 ^c	374.33±22.73 ^b	20.23±0.37 ^c	116.51±11.42 ^b
400 μmol/L	143.79±2.94 ^d	391.56±31.82 ^{bc}	19.82±0.18 ^c	102.10±8.05 ^{bc}
800 μmol/L	146.57±5.67 ^d	416.24±28.16 ^c	18.60±0.31 ^d	80.74±10.43 ^c

大分子, 导致细胞氧化应激, 引发功能障碍, 导致细胞死亡。高产奶牛代谢旺盛, 肠道作为消化和吸收的主要部位容易发生氧化应激并产生损伤。 H_2O_2 可穿过细胞膜与细胞内 Fe^{2+} 反应生成高活性的自由基, 且由于 H_2O_2 性质相对稳定且易于获得, 已经成为研究细胞氧化损伤的重要工具^[11]。不同细胞建立氧化应激模型的条件存在显著差异, 这可能与细胞本身的耐受性有关, 但选用的存活率大都在 50%~70%。细胞存活率过高说明细胞氧化应激不明显; 细胞存活率低说明细胞产生了不可逆损伤, 细胞大量死亡。ROS 包括超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基 ($\cdot OH$) 和 H_2O_2 等, 对细胞有很强的破坏性, 即使 ROS 是正常呼吸过程中产生的, 也会造成累积的损伤, 最终导致细胞和组织功能丧失。本试验选用 200 $\mu mol/L$ 的 H_2O_2 作用奶牛小肠上皮细胞 2 h, 细胞存活率显著降低至 64.03% 且 ROS 产量相对于对照组显著上升, 说明细胞产生了一定程度的氧化损伤, 同时又保持了较理想的存活率, 符合建立模型的条件。

LDH 存在于机体所有组织细胞的胞质内, 细胞发生氧化损伤时, 细胞膜受损, 胞质内的 LDH 外泄出来。LDH 在细胞培养液中的含量变化反映了细胞膜的损伤程度。本试验结果表明, 随着 H_2O_2 浓度提高, 培养液中 LDH 含量显著上升, 说明细胞产生了不同程度的氧化损伤。正常状态下, 机体氧化与抗氧化系统处于平衡状态, 代谢过程中产生的 ROS 能被体内的抗氧化酶及时清除, 如 SOD 和 GSH-Px。超氧化物主要通过 SOD 来调节^[12], 作为氧化磷酸化的副产物, 线粒体会产生大量 $O_2^{\cdot-}$, SOD 使其转化为 H_2O_2 , 再由 GSH-Px 将 H_2O_2 分解为 H_2O 。SOD 和 GSH-Px 活性是机体抗过氧化能力的重要指标。本试验中细胞内总 SOD 活性随着 H_2O_2 浓度的提高呈先略升高再显著降低的趋势, 这可能是细胞内氧化-抗氧化系统调控的结果, H_2O_2 浓度为 50、100 $\mu mol/L$ 时, 细胞氧化损伤较轻, 抗氧化系统通过提高 SOD 活性来缓解氧化应激损伤; H_2O_2 浓度为 200 $\mu mol/L$ 时, SOD 活性较对照组显著降低, 细胞发生了一定程度的氧化应激。GSH-Px 是抗氧化防御系统的重要组成部分^[13], 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 其活性中心为硒半胱氨酸。硒是 GSH-Px 酶系的组成成分, 它能催化 GSH 变为 GSSG, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H_2O_2 分解, 从而保护细胞膜的结构及功能不受损害。

本试验中, H_2O_2 作用细胞 2 h 后 GSH-Px 活性逐渐降低, 当 H_2O_2 浓度达到 200 $\mu mol/L$ 时, GSH-Px 活性相对于对照组显著降低, 导致细胞抗氧化防御能力下降, 干扰了氧化和抗氧化系统之间的平衡, 产生氧化损伤。

4 结论

本试验中, 200 $\mu mol/L$ H_2O_2 作用奶牛小肠上皮细胞 2 h, 可成功构建以 H_2O_2 为诱导剂的奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型, 为今后研究氧化应激下奶牛肠道养分消化吸收提供平台和基础。

参考文献:

- [1] Ha H L, Shin H J, Feitelson M A, et al. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(48): 6035-6043.
- [2] Cai X, Chen X L, Wang X C, et al. Pre-protective effect of lipoic acid on injury induced by H_2O_2 , in IPEC-J2 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 378(1-2): 73-81.
- [3] 黄华波, 禹善秋. 奶牛氧化应激与抗氧化的研究进展 [J]. 中国奶牛, 2014(22): 18-19.
- [4] 蔡旋, 王静娴, 陈小连, 等. 肠道上皮氧化应激细胞模型的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(3): 337-346.
- [5] Ryu B, Himaya S W, Qian Z J, et al. Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HDF cells by peptides derived from seaweed pipefish, *Syngnathus schlegelii*[J]. Peptides, 2011, 32(4): 639-647.
- [6] 金鹿, 闫树梅, 史彬林, 等. 过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3651-3658.
- [7] Stockert J C, Blázquezcastro A, Cañete M, et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets[J]. Acta Histochemica, 2012, 114(8): 785-796.
- [8] Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2000, 191(1): 89-107.
- [9] Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction[M]. In: Greenwald R A, editor. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, 1985: 123-132.
- [10] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean[J]. Brit J Pharmacol, 2004, 142(2): 231-255.
- [11] 郑廷松, 李源, 张珊红, 等. 用低浓度过氧化氢建立心肌细胞氧化损伤模型 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(20): 1849-1851.
- [12] Schatzman S S, Culotta V C. Chemical warfare at the microorganismal level: A closer look at the superoxide dismutase enzymes of pathogens[J]. ACS Infectious Diseases, 2018, 4(6): 893-903.
- [13] Wang J, Yang R W, Liu J B, et al. Effects of soybean antioxidant peptides (SAP) on SOD, GSH-Px, CAT activity and MDA level in vivo[J]. Adv Mat Res, 2014, 1025-1026: 476-481.

Establishment of Oxidative Damage Model in Cow Intestinal Epithelial Cells

KONG Ling-lian¹, CUI Yan-jun¹, YANG Jin-yong², LI Dong-ping¹, LIU Dong-xin¹, WANG Chong^{1*}, MAO Hui-ling^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Zhejiang Hangzhou 311300, China;

2. Zhejiang Animal Husbandry Techniques Extension Station, Zhejiang Hangzhou 310021, China)

Abstract: This study was conducted to establish the oxidative stress model of intestinal epithelial cells induced by hydrogen peroxide(H₂O₂) and provide a basis for the study of the intestinal nutrition absorption mechanism under oxidative stress. Cow intestinal epithelial cells were treated with H₂O₂ at different concentrations(0, 50, 100, 200, 400, 800 μmol/L) for different time(2, 4, 6 h). Cell viability was measured by methy thiazolyl tetrazolium(MTT)assay.The contents of reactive oxygen species(ROS)in cell were detected by nitro blue tetrazolium(NBT). Superoxid dismutase(SOD)activity and lactate dehydrogenase(LDH)and glutathione peroxidase(GSH-Px)were detected with spectrophotometry. Compared with the control group,the cell survival rate(64.3%) of cells treated with 200 μmol/L H₂O₂ decreased(*P*<0.05). The content of intracellular ROS and LDH activity in culture medium increased significantly(*P*<0.05). Meanwhile,the activity of SOD and GSH-Px both decreased observably. The most appropriate condition of establishing the oxidative stress model in cow intestinal epithelial cell is treatment with 200 μmol/L H₂O₂ for 2 hours.

Keywords: Hydrogen peroxide; Intestinal epithelial cells of cows; Oxidative stress

上接第 78 页

Ruminal Degradation Characteristics of Extrusion and Ensilage Pretreated Corn Stover

WANG Yu-ting^{1,2}, YU Wei², QI Hong-wei^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Jilin Changchun 130118, China;

2. Animal Science Branch, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Jilin Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Corn stover was extruded, and then ensiled by adding microbial inoculant. Afterwards, in situ rumen incubation was conducted to determine the ruminal degradation characteristics of the extrusion and ensilage pretreated corn stover (EECS) in comparison with ensiled corn stover (ECS) and corn stover (CS). Three local grassland red bulls fitted with permanent rumen fistulas were applied to determine ruminal degradation characteristics of crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) using Nylon Bag technique. As a result, , the effective degradability of CP ranked: EECS > ECS > CS(*P*<0.01); The effective degradability of NDF numerically ranked: EECS > ECS > CS, but the significant difference was observed only between EECS and CS(*P*<0.05), but there was no significant difference between ECS and CS(*P*>0.05); The lowest effective degradability of ADF occurred in corn stover (*P*<0.01), but no significant difference was found between EECS and ECS silage(*P*>0.05). In conclusion, the effective degradation results showed EECS in comparison with ECS and CS presented a higher nutrient degradability in the rumen.

Keywords: Ruminal degradability; Nylon Bag technique; Expansional and microbial corn stover silage