

doi: 10.7541/2019.013

急性冷胁迫对中华鳖幼鳖肠道黏膜组织的影响

邢潇¹ 宋如昕¹ 王兰¹ 牛翠娟² 张左兵¹

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 北京师范大学生命科学院, 北京 100875)

摘要: 为了探究急性冷胁迫对中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)幼鳖肠道不同区段黏膜组织学特征的影响, 实验检测了急性冷胁迫前后血清二胺氧化酶(Diamine oxidase, DAO)的活性, 同时观察了急性冷胁迫前后中华鳖肠道黏膜的相关组织形态的差异。DAO活性显示: (1)在第一次急性冷胁迫实验中, 中华鳖血清DAO活性随急性冷胁迫时间的增加而呈现降低趋势, 并在冷胁迫到达48h降到了最低水平; (2)在急性冷胁迫及复温实验中, 中华鳖血清DAO的活性, 在冷胁迫3d后显著降低, 但随着温度的恢复, DAO活性又恢复到正常水平。组织病理结果显示: (1)急性冷胁迫对中华鳖肠道(回肠后段和大肠)黏膜上皮的形态没有明显影响; (2)急性冷胁迫对回肠后段的杯状细胞数目、肠绒毛长度和绒毛长度/隐窝深度的比值没有显著影响, 但会使回肠后段黏膜厚度显著降低; (3)急性冷胁迫会使大肠的杯状细胞数目降低。这表明急性冷胁迫会改变中华鳖肠道黏膜的结构, 但在不同的肠段, 这种改变是不同的。回肠后段和大肠在同样的冷胁迫方式下黏膜机械屏障的不同变化情况, 提示中华鳖肠道各段对急性冷胁迫具有特殊的应对方式。

关键词: 中华鳖; 急性冷胁迫; 二胺氧化酶; 肠道黏膜组织形态

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)01-0102-07

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)属于脊索动物门、脊索动物亚门、爬行纲、无孔亚纲、龟鳖目、曲颈龟亚目、鳖科。中华鳖是一种外温动物, 水陆两栖, 在我国广泛分布(除青海、西藏、新疆地区), 其中以长江流域和华南地区较为多见, 国外主要分布于朝鲜、日本和越南等地^[1]。由于中华鳖具有极高的营养价值、经济价值和科研价值^[2], 其养殖逐步形成了适度规模化的地方优势特色产业, 但随着该产业的快速发展, 疾病已成为制约其健康可持续发展的重要因素。

在中华鳖大规模分布的区域, 经常会出现气温骤然变化的情况, 且多发生于5月和10月。这种气温骤然变冷会造成养殖中华鳖出现“感冒”症状, 并呈暴发性死亡, 给中华鳖养殖产业带来重大损失。但目前尚不清楚, 病原是如何造成这种死亡的。肠道是机体长期与外界直接接触的器官, 在正常的生理情况下肠道黏膜的多种屏障可以有效阻止肠腔内的病原体侵入机体, 但在应激状态下, 肠黏膜通

透性增加, 肠腔内的病原体透过肠黏膜侵入机体, 诱发炎症反应^[3-5]。因此, 中华鳖肠道可能是病原入侵的潜在门户。肠道黏膜屏障主要是由机械屏障、化学屏障、免疫和生物屏障构成。其中机械屏障属于机体第一道防线。该防线由肠黏膜表面的黏液层、黏膜上皮细胞和细胞间紧密连接构成, 能有效阻止细菌透过黏膜进入组织^[6-8]。因此, 维持正常的肠道黏膜机械屏障的功能对保证动物肠道生态系统的稳定性具有重要意义。

监测肠道黏膜机械屏障功能是判断肠道黏膜屏障完整性的重要依据之一, 但目前很难直接观察肠道黏膜机械屏障的功能, 多通过间接的方法进行检测。临床上常用以下几种方法进行检测: 肠黏膜通透性测定、血浆内毒素检测、肠黏膜pH测定及二胺氧化酶测定。二胺氧化酶(Diamine oxidase, DAO)是主要存在于小肠的黏膜或纤毛上皮细胞中催化二胺的细胞内酶, 小肠黏膜屏障功能衰竭时或肠黏膜细胞坏死时血清DAO活性升高^[9, 10]。因此,

收稿日期: 2017-12-28; 修订日期: 2018-05-17

基金项目: 国家自然科学基金(31400343); 山西省高等学校优秀学术青年带头人支持计划资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400343); the Shanxi Provincial Higher Education Excellent Academic Youth Leadership Program]

作者简介: 邢潇(1992—), 女, 山西大同人; 硕士研究生; 主要从事应激免疫学研究。E-mail: 1902105984@qq.com

通信作者: 张左兵(1981—), 男, 安徽池州人; 副教授; E-mail: zbzhang@sxu.edu.cn

血液中的DAO活性能够很好的反映肠道损伤状态。

DAO活性和肠道黏膜组织结构是反应肠道黏膜机械屏障结构和功能的完整性的重要指标。应激反应会造成大鼠肠道黏膜受损,光镜观察发现应激会造成大鼠肠黏膜绒毛肿胀变短,顶端脱落并伴有炎性渗出物,电镜观察亦可见绒毛倒伏、脱落,形态结构不清等类似现象,呈现时间依赖性^[11]。并伴随着血清二胺氧化酶DAO浓度的显著升高。

鉴于此,本文以中华鳖幼鳖为动物模型,系统的探讨冷胁迫对DAO活性、肠道黏膜组织形态的影响,初步探讨了急性冷胁迫对肠道黏膜组织学特征的影响,旨在为经常遭受急性冷胁迫的中华鳖正常生理机能维持提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与驯养

健康中华鳖幼鳖购自河北省玉田县中华鳖良种场。急性冷胁迫实验先后进行了2次,其中第一次急性冷胁迫实验用32只,体重(116.5±25.30)g;急性冷胁迫及复温实验用45只,体重(128.4±15.72)g。实验前适应性喂养2周,养殖期间每日投喂商品化饲料并换水,水温维持在(25±1)℃。降温前12h,对照组和实验组动物均开始禁食,直至实验结束。

1.2 实验方法

动物分组和组织标本取材 实验分为两部分。第一部分为第一次急性冷胁迫实验:驯化后的中华鳖随机分为4组,每组8只。分别在冷胁迫开始后的0、6h、24h和48h取血,其中0组为对照组。

第二部分为急性冷胁迫及复温实验:驯化后的中华鳖随机分成5组,每组9只。其中冷胁迫前25℃对照组为C₀组,冷胁迫3d 25℃对照组为C_{3d}组,冷胁迫3d 15℃组为T_{3d}组,冷胁迫11d 25℃对照组为C_{11d}组,15℃冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d为T_{8d+3d}组,其中温度维持在25℃的组别为对照组。在断头法处死中华鳖后,取血。迅速开腹,于回肠后端和大肠处取0.5 cm肠段置于4%中性多聚甲醛中固定,以备PAS染色观察病理变化。

在实验过程中,使用冷水机将水温从25℃迅速降至15℃,各组中华鳖于各相应时间点进行标本取材。

血清DAO活性检测 用断头法取血2 mL,37℃放置1h后,4℃过夜,3000 r/min于4℃离心10min,取上层血清置于-80℃冰箱保存待测。用活性比色法测定DAO(南京建成生物工程研究所)的活性。

肠黏膜的病理学观察 组织标本取材经4%多聚甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制成3 μm厚切片。将切片依次浸入二甲苯10min,二甲苯10min,无水乙醇,95%乙醇,75%乙醇,蒸馏水各5min,0.5%高碘酸10min,流水冲洗2min,Schiff氏液避光染色40min,流水冲洗5min,苏木精染色3min,流水冲洗5min,1%盐酸酒精分色1s,酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,光镜观察。图像分析采用ImageJ2x专业图像分析软件(Broken Symmetry Software公司)。每个肠管取5张切片,每张切片选取5个最长肠绒毛的长度、最深隐窝深度和最厚黏膜厚度以及单位面积内杯状细胞数目进行测量。

统计学分析 数据以均数±标准差(Mean±SD)表示,应用SPSS 17.0统计软件,多组间样本比较采用单因素方差分析,两组间样本比较采用最小显著差异 t 检验(LSD- t),对各组均数进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清DAO活性

第一次急性冷胁迫对中华鳖血清DAO活性的影响 由图1可知,中华鳖血清DAO活性随急性冷胁迫时间的增加而呈现降低趋势。急性冷胁迫48h组的血清DAO活性显著低于对照组($P=0.0289$),急性冷胁迫6h组的血清DAO活性显著高于急性冷胁迫48h组($P=0.0315$),急性冷胁迫24h组的血清DAO活性极显著高于急性冷胁迫48h组($P=0.0081$)。

急性冷胁迫及复温对中华鳖血清DAO的影响

急性冷胁迫3d组T_{3d}的血清DAO活性显著低于其他各组(图2)。急性冷胁迫前对照组C₀的DAO活性显著高于冷胁迫3d组T_{3d}($P=0.049$),急性冷胁迫3d对照组C_{3d}的DAO活性极显著高于急性冷胁迫3d组T_{3d}($P=0.0044$),急性冷胁迫11d对照组C_{11d}和冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d组T_{8d+3d}的DAO活性均显著高于冷胁迫3d组T_{3d}($P=0.0381$)。

2.2 肠道黏膜病理学观察

肠道黏膜上皮的形态学变化 光镜下观察发现,急性冷胁迫后各组中华鳖的肠黏膜结构完整,层次分明,肠黏膜上皮细胞的轮廓清晰,染色鲜明,排列规则,杯状细胞清晰(图3、图4)。肠黏膜表面的纹状缘结构整齐均匀。固有层结构清晰,上皮细胞呈正常生长更新状态。急性冷胁迫后,中华鳖回肠后段和大肠的黏膜形态并未发生明显变化。

回肠后段和大肠杯状细胞数目变化 通过

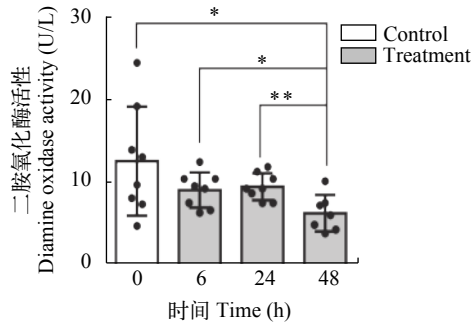


图1 第一次急性冷胁迫后中华鳖血清DAO活性

Fig. 1 The DAO activity of Chinese soft-shelled turtle during the first acute cold stress experiment

*表示48h组与其他各组之间血清DAO活性的显著性分析, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

* Indicates a significant difference between the 48h group and the other groups, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

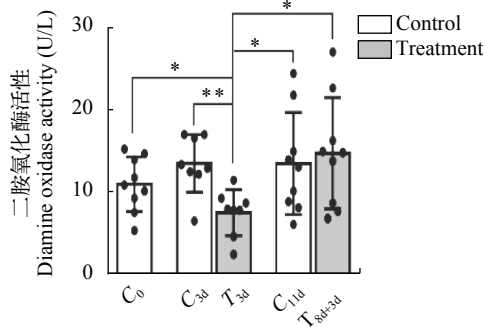


图2 急性冷胁迫及复温实验中各组中华鳖血清DAO活性

Fig. 2 The DAO activity of Chinese soft-shelled turtle in acute cold stress and rewarming experiments

C₀. 急性冷胁迫前对照组; C_{3d}. 急性冷胁迫3d对照组; T_{3d}. 急性冷胁迫3d组; C_{11d}. 急性冷胁迫11d对照组; T_{8d+3d}. 急性冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d组; *表示T_{3d}组与其他各组之间血清DAO活性的显著性分析, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 下同

C₀. control group before acute cold stress; C_{3d}. 3 days of control group; T_{3d}. 3 days of acute cold stress group; C_{11d}. 11 days of control group; T_{8d+3d}. 8 days of acute cold stress at 15℃ and maintained at 25℃ for 3 days; * Indicates a significant difference between T_{3d} group and the other groups, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; the same applies below

ImageJ2x软件计算单位面积/像素内杯状细胞的数目可得表1和图5, 可知: 在急性冷胁迫后, 各组中华鳖回肠后段杯状细胞数与对照组相比没有显著变化($P=0.098$), 急性冷胁迫3d组杯状细胞数目显著低于急性冷胁迫3d对照组大肠的杯状细胞数目($P < 0.001$).

中华鳖回肠后段绒毛长度、肠壁厚度/大肠肠壁厚度变化 急性冷胁迫对中华鳖回肠后段绒毛长度、黏膜厚度和大肠黏膜厚度的影响见表2和

图6—8。由图4可知, 大肠由于没有肠绒毛, 因此不对其绒毛长度进行统计。由表2和图6可知, 急性冷胁迫3d组的回肠后段绒毛长度要低于急性冷胁迫3d对照组, 但总体来说没有显著影响($P=0.077$)。由图7可知: 中华鳖回肠后段急性冷胁迫3d组黏膜厚度显著低于急性冷胁迫3d对照组($P=0.0015$), 中华鳖回肠后段急性冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d组黏膜厚度显著高于急性冷胁迫11d对照组($P=0.009$); 急性冷胁迫对中华鳖大肠黏膜厚度没有显著影响($P=0.3626$)。由图8可知: 急性冷胁迫对中华鳖回肠后段绒毛长度和隐窝深度的比值没有显著影响($P=0.079$)。

3 讨论

3.1 急性冷胁迫引起的肠道黏膜屏障组织化学损伤

研究表明: 胁迫可引起肠黏膜屏障通透性升高, 导致胃肠功能紊乱和病变。DAO可通过调节细胞内的离子平衡、影响传导通路、促进细胞修复, 对肠黏膜具有保护作用^[12]。DAO最初在小肠黏膜绒毛上皮细胞中被发现, 主要分布在小肠黏膜绒毛

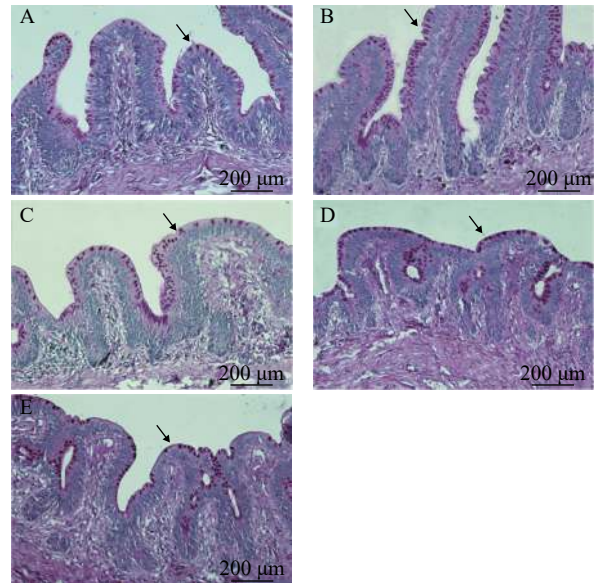


图3 急性冷胁迫对中华鳖回肠后段黏膜上皮组织形态影响的显微照片(PAS染色×400)

Fig. 3 Micrograph of acute cold stress on the mucosal epithelial tissue morphology of the posterior ileum of Chinese soft-shelled turtle (PAS staining×400)

A. 冷胁迫前对照组; B. 冷胁迫3d对照组; C. 冷胁迫3d组; D. 冷胁迫11d对照组; E. 冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d组; 箭头所指为杯状细胞

A. control group before acute cold stress; B. 3 days of control group; C. 3 days of acute cold stress group; D. 11 days of control group; E. 8 days of acute cold stress at 15℃ and maintained at 25℃ for 3 days. The arrows refer to goblet cells

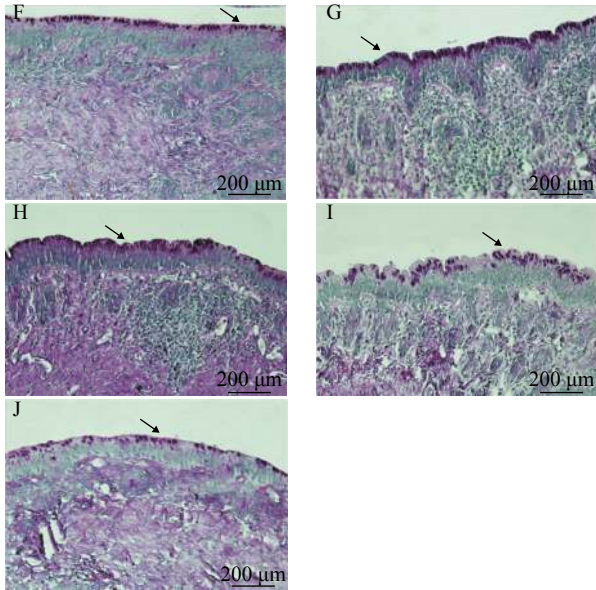


图4 急性冷胁迫对中华鳖大肠黏膜上皮组织形态影响的显微照片(PAS染色 $\times 400$)

Fig. 4 Micrograph of acute cold stress on the mucosal epithelial tissue morphology of the large intestine of Chinese soft-shelled turtle (PAS staining $\times 400$)

F. 冷胁迫前对照组; G. 冷胁迫3d对照组; H. 冷胁迫3d组; I. 冷胁迫11d对照组; J. 冷胁迫8d后迅速升温至 25°C 并维持3d组; 箭头所指为杯状细胞

F. control group before cold stress; G. control group at day 3 after acute cold stress; H. cold stress group at day 3 day; I. control group at day 11 after acute cold stress; J. cold stress group at day 8 and maintained at 25°C for 3 days. The arrows refer to goblet cells

表1 急性冷胁迫对中华鳖回肠后段/大肠杯状细胞数的影响

Tab. 1 Effects of acute cold stress on the number of goblet cells in the posterior segment of ileum/the large intestine in *Pelodiscus sinensis*

组别 Group	回肠后段杯状 细胞数(个/ cm^2) The number of goblet cells in the posterior segment of ileum	大肠杯状细 胞数(个/ cm) The number of goblet cells in the large intestine
C_0	4.1 ± 1.3^a	5.5 ± 1.6^a
C_{3d}	3.9 ± 0.8^a	5.1 ± 1.6^a
T_{3d}	3.7 ± 0.8^{ab}	3.7 ± 1.0^b
C_{11d}	3.6 ± 0.7^{ab}	3.7 ± 1.1^b
T_{8d+11d}	3.3 ± 1.0^b	4.1 ± 1.6^b
F值	3.038	8.602

上皮细胞中, 占95%, 少量分布在胎盘和肾脏, 其他组织和细胞中含量较少^[13]。正常机体血清DAO活性很低, 当肠黏膜损伤受伤时, 导致血清DAO活性增高^[14]。DAO酶活的变化是研究创伤后肠屏障功能损伤的理想指标, 尤其是血清中DAO酶活变化^[15], 因此血清DAO活性是反映肠黏膜损伤的理想指

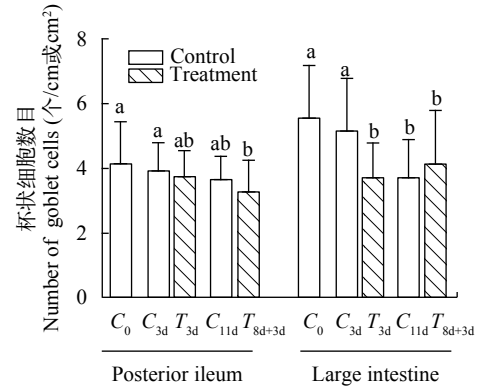


图5 急性冷胁迫及复温实验中回肠后段/大肠杯状细胞数目变化

Fig. 5 The number of goblet cells in the posterior segment of ileum/the large intestine in acute cold stress and rewarming experiments

a与ab/b与ab表示组间无显著性差异($P > 0.05$), a与b表示组间差异显著($P < 0.05$)

a and ab/b and ab showed no significant difference between the groups ($P > 0.05$), a and b showed significant differences between the groups ($P < 0.05$)

标。本实验结果显示: 无论是在第一次急性冷胁迫实验, 还是急性冷胁迫及复温实验中, 急性冷胁迫均会使中华鳖血清DAO活性显著低于各对照组, 且随着温度的恢复, 血清DAO的活性也显著升高, 这与黎友军等^[16]的研究结果相反。在本研究中, DAO活性的降低会随温度的升高而恢复。由于DAO主要分布在小肠黏膜绒毛上皮细胞中, 这提示我们急性冷胁迫未造成小肠黏膜屏障功能破坏。另一个可能原因是, 低温造成DAO在小肠合成减少, 在小肠屏障功能没有受到破坏的情况下, 进入血清DAO减少。

肠道黏膜上皮杯状细胞分泌的黏液在黏膜表面形成疏水的黏液凝胶层, 主要成分是黏液糖蛋白, 它覆盖肠上皮表面, 可抑制消化道中的消化酶和有害物质对上皮细胞的损害^[17]。有研究表明: 应激会使猪黏液IgA蛋白的表达发生紊乱^[18]。黏液层的不断更新和维持对于机体肠道屏障十分重要, 黏液层的维持主要由部分肠杯状细胞中的单个细胞定期进行基础分泌完成^[19]。因此, 肠道上皮中的杯状细胞的数目在一定程度上可以间接反映黏液层的状况, 对于判断机体肠道黏膜屏障的完整性具有重要意义。在本实验中: 在急性冷胁迫后, 中华鳖各组回肠后段杯状细胞数目没有显著变化, 急性冷胁迫3d组杯状细胞数目显著低于急性冷胁迫3d对照组大肠的杯状细胞数目, 提示急性冷胁迫可能会使中华鳖大肠黏液层稳定性发生改变, 从而破坏大肠黏膜机械屏障。

表 2 急性冷胁迫及复温对中华鳖回肠后段绒毛长度、肠壁厚度、大肠肠壁厚度及绒毛长度隐窝深度的影响

Tab. 2 Effects of acute cold stress and rewarming on villus length, intestinal wall thickness in the posterior segment of ileum, intestinal wall thickness in the large intestine and the villi length/crypt depth of Chinese soft-shelled turtle

组别 Group	回肠后段绒毛长度 The villus length in the posterior segment of ileum (μm)	回肠后段黏膜厚度 The intestinal mucosa thickness in the posterior segment of ileum (μm)	大肠黏膜厚度 The intestinal mucosa thickness in the large intestine (μm)	绒毛长度/隐窝深度 The villi length/ crypt depth (V/C)
C ₀	416.8±132.0	617.1±142.1 ^{ab}	331.0±79.3 ^a	2.4±0.8 ^a
C _{3d}	478.7±153.7	667.9±141.9 ^a	330.2±96.4 ^a	2.3±0.8 ^a
T _{3d}	417.2±211.4	524.2±152.7 ^{cd}	299.2±72.1 ^{ab}	2.1±0.9 ^{ab}
C _{11d}	397.6±92.2	490.6±110.9 ^d	293.7±59.3 ^{ab}	1.8±0.5 ^b
T _{8d+3d}	402.4±68.7	574.5±93.4 ^{bc}	272.3±41.1 ^b	2.1±0.8 ^{ab}
F值	1.287	7.126	2.934	2.150

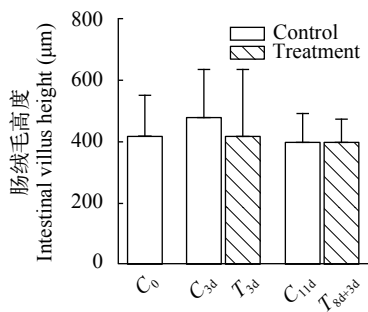


图 6 急性冷胁迫及复温实验中回肠后段肠绒毛高度变化

Fig. 6 Intestinal villus height in the posterior segment of ileum during acute cold stress and rewarming experiments

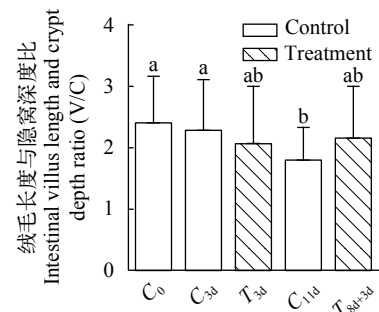


图 8 急性冷胁迫及复温实验中回肠后段绒毛长度/隐窝深度 (V/C) 变化

Fig. 8 Ratios of villus length/crypt depth (V/C) in posterior segment of ileum during acute cold stress and rewarming experiment

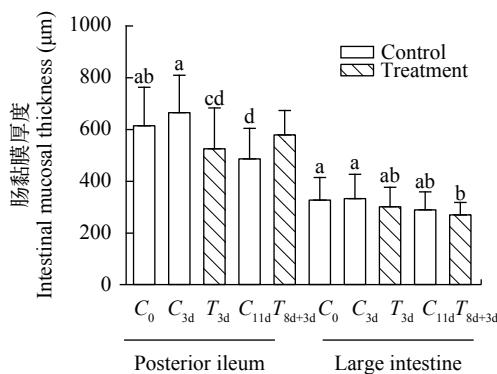


图 7 急性冷胁迫及复温实验中回肠后段/大肠黏膜厚度变化

Fig. 7 Changes of colorectal mucosa in the posterior segment of ileum/large intestine during acute cold stress and rewarming experiment

3.2 急性冷胁迫引起的肠道黏膜组织形态损伤

有研究表明胁迫会引起肠道黏膜上皮结构发生改变。如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在急性胁迫后,肠道紧密连接减少,肠道上皮通透性增加^[20];山齿鹑(*Colinus virginianus*)在冷胁迫后,观察到肠道上皮发生损伤^[21]。胁迫引起的糖皮质激素释放因子、P物质等神经肽能够造成小鼠肠道黏膜通透性增加,会使增加病原菌入侵的机会^[22, 23]。张雯等^[24]

通过光镜对雏鸡(*Gallus gallus*)肠黏膜进行形态学观察,发现急性、慢性冷应激均对肠黏膜的形态有显著的影响。他发现在冷胁迫后,观察雏鸡空肠HE切片可见与对照组相比应激组绒毛高度明显降低,出现绒毛断裂、稀疏,肠黏膜充血、出血、白细胞浸润等现象。本实验结果显示,通过光镜对肠黏膜进行形态学观察,发现急性冷胁迫对中华鳖肠黏膜组织形态并无显著影响。观察回肠后段和大肠PAS染色切片可见,回肠后段肠绒毛排列整齐,并未出现断裂和缺失等现象,大肠肠黏膜结构完整。绒毛长度和隐窝深度反映了小肠的功能状态,比值下降,表示黏膜受损,消化吸收功能降低,常伴有腹泻的发生,动物生长发育受阻;比值上升,则黏膜改善,消化吸收功能增强,腹泻率降低,生长发育加快,应激反应会使绒毛长度和隐窝深度比值降低^[25]。在本实验中冷胁迫3d后,绒毛长度/隐窝深度的比值低于常温对照组,但没有显著性变化。中华鳖回肠后段急性冷胁迫3d组黏膜厚度显著低于急性冷胁迫3d对照组,中华鳖回肠后段急性冷胁迫8d后迅速升温至25℃并维持3d组黏膜厚度显著高于急性

冷胁迫11d对照组,提示冷胁迫可能会使中华鳖回肠后段黏膜受损,而随着温度的恢复这种损伤也会恢复。

综上所述,急性冷胁迫会改变中华鳖肠道黏膜机械屏障的结构,但在不同的肠段,这种改变是不同的,急性冷胁迫会使大肠杯状细胞数目降低,降低大肠的肠道黏膜机械屏障功能。急性冷胁迫使回肠后段黏膜厚度降低,使其通透性降低或通透性不受影响,反应在血浆(清)DAO活性降低。这提示,中华鳖肠道在相同的急性冷胁迫下,不同段对急性冷胁迫具有各自特殊的应对方式。与此同时,我们也认识到单从组织化学和形态学上,不能全面的分析急性冷胁迫对中华鳖肠道黏膜机械屏障的影响,我们下一步还需要从分子和蛋白的角度进行研究。

参考文献:

- [1] Huang L Y, He Z Y, Ding S H, *et al.* Current status and countermeasures for protecting and utilizing on soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) germplasm resources in China [J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2005, **18**(2): 183—186 [黄丽英, 何中央, 丁诗华, 等. 中华鳖种质资源的研究现状及保护利用对策. *宁波大学学报(理工版)*, 2005, **18**(2): 183—186]
- [2] Somfai-Relle S, Schauss A G, Financsek I, *et al.* Acute and subchronic toxicity studies of cryogenically-frozen, cryomilled, *Pelodiscus sinensis* (Japanese soft-shelled turtle-suppon) powder administered to the rat [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2005, **43**(4): 575—580
- [3] Li S Z, Yuan X J, Yang Y Y, *et al.* Effect of cold stress by immersing in water on some enzyme activities and digestive tract mucosal hyperemia in chicken [J]. *Applied and Environmental Biology*, 2001, **7**(3): 267—270 [李士泽, 袁学军, 杨玉英, 等. 浸水冷应激对雏鸡某些酶活性及消化道黏膜充血的影响. *应用与环境生物学报*, 2001, **7**(3): 267—270]
- [4] Kaushik S, Kaur J. Effect of chronic cold stress on intestinal epithelial cell proliferation and inflammation in rats [J]. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress*, 2005, **8**(3): 191—197
- [5] Walser E M, Nealon W H, Marroquin S, *et al.* Sterile fluid collections in acute pancreatitis: catheter drainage versus simple aspiration [J]. *Cardiovascular & Interventional Radiology*, 2006, **29**(1): 102—107
- [6] Niu H J, Wang B M. Intestinal mucosal barrier and its function [J]. *Anatomy and Clinics*, 2007, **12**(2): 138—140 [牛海静, 汪邦茂. 肠黏膜屏障与功能. *解剖与临床*, 2007, **12**(2): 138—140]
- [7] Cheng L Z. Histology (second edition) [M]. Beijing: Peoples Medical Press. 1994, 1102—1125 [成令忠. 组织学(第2版). 北京: 人民卫生出版社. 1994, 1102—1125]
- [8] Reynolds J V. Gut barrier function in the surgical patients [J]. *British Journal of Surgery*, 1996, **83**(12): 1668—1671
- [9] Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, *et al.* Diamine oxidase as a maker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluourouracil treatment in rats [J]. *Medical Molecular Morphology*, 2014, **47**(2): 100—107
- [10] Karabulut K U, Narci H, Gul M, *et al.* Diamine oxidase in diagnosis of acute mesenteric ischemia [J]. *American Journal of Emergency Medicine*, 2013, **31**(2): 309—312
- [11] Wu W M, Zhang F X, Zhang P, *et al.* Influence of plateau hypoxia on the tissue injury and expression of HIF-1 α and iNOS in intestinal mucosa of rats [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2010, **35**(5): 592—594 [吴文明, 张方信, 张盼, 等. 高原缺氧条件对大鼠肠黏膜组织及缺氧诱导因子-1 α 、诱导型-一氧化氮合酶表达的影响. *解放军医学杂志*, 2010, **35**(5): 592—594]
- [12] Bonous G, Echave V, Vobecky S J, *et al.* Acute necrosis of the intestinal muesoa and high serum levels of diamine oxidase [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1984, **29**(9): 872—874
- [13] Luk G D, Bayless T M, Baylin S B. Diamine oxidase (DAO) a circulating marker for rat mucosal maturation and integrity [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1980, **66**(1): 66—70
- [14] Nakao M, Ogura Y, Satake S, *et al.* Usefulness of soluble dietary fiber for the treatment of diarrhea during enteral nutrition in elderly patients [J]. *Nutrition*, 2002, **18**(1): 35—39
- [15] Fu X B, Xing F, Yang Y H, *et al.* Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemiareperfusion injury [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, **9**(9): 2036—2039
- [16] Li J Y, Sheng Z Y, Lü Y, *et al.* Severe trauma induced intestinal barrier function injury and protection [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2000, **8**(10): 1093—1096 [黎君友, 盛志勇, 吕艺, 等. 严重创伤后肠屏障功能损伤及谷氨酰胺的保护. *世界华人消化杂志*, 2000, **8**(10): 1093—1096]
- [17] Mantis N J, Cheung M C, Chintalcharuvu K R, *et al.* Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor [J]. *Journal of Immunology*, 2002, **169**(4): 1844—1851
- [18] Wang Z L, Yu T Q, Zhu X Y, *et al.* Effects of complex prescriptions of Chinese herbs on the concentration of IL-2, IL-10 and IgA in porcine intestines after heat stress [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, **43**(9): 83—85 [王自力, 于同泉, 朱晓宇, 等. 中药复方对热应激下猪肠道组织IL-2 IL-10和黏液IgA含量影响. *中国*

- 兽药杂志, 2007, **43**(9): 83—85]
- [19] Bai X D. Intestinal mucous layer research progress [J]. *Foreign Medicine: Volumes of Trauma and Surgical Problems*, 1997, (4): 200—202 [白晓东. 肠道黏液层研究进展. 国外医学: 创伤与外科基本问题分册, 1997, (4): 200—202]
- [20] Olsen R E, Sundell K, Mayhew T M, *et al.* Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2005, **250**(1-2): 480—495
- [21] Fu J, Liu C P, Zhang Z W, *et al.* Influence of inflammatory pathway markers on oxidative stress induced by cold stress in intestine of quails [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, **95**(2): 495—501
- [22] Glaser R, Kiecoltglaser J K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, **5**(3): 243—251
- [23] Zhu G F, Chancellor-Freeland C, Berman A S, *et al.* Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages [J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of Society for Neuroscience*, 1996, **16**(11): 3745—3752
- [24] Zhang W. Effects of cold stress on chicken's barrier function of intestinal mucosa [D]. The Northeast Agricultural University. 2010 [张雯. 冷应激对雏鸡肠黏膜屏障功能的影响. 东北农业大学. 2010]
- [25] Han Z K. *Livestock Nutrition Physiology* [M]. Beijing: Agriculture Press. 1991, 16—17 [韩正康. 家畜营养生理学. 北京: 农业出版社. 1991, 16—17]

THE DIFFERENT RESPONSE OF THE INTESTINAL MUCOSAL HISTOLOGICAL FEATURES IN DIFFERENT SECTIONS OF JUVENILE CHINESE SOFT-SHELLED TURTLE UNDER ACUTE COLD STRESS

XING Xiao¹, SONG Ru-Xin¹, WANG Lan¹, NIU Cui-Juan² and ZHANG Zuo-Bing¹

(1. College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: To investigate the effects of acute cold stress on the mucosal histology in different sections of the juvenile *Pelodiscus sinensis*, the activity of serum diamine oxidase (DAO) and histological features of intestinal mucosa in Chinese soft-shelled turtle in culture temperature and acute cold stress were conducted. The first acute cold stress reduced the DAO activity with the lowest level at 48h after cold stress. In the acute cold stress and rewarming experiment, the DAO activity decreased significantly after 3 days of cold stress and then restored to normal level with the recovery of temperature. Histopathological results showed no significant difference in the morphology of mucosal epithelium in the intestine (posterior segment of ileum and large intestine) between acute cold stress group and control group. There were no significant difference in the number of goblet cells, the length of villus and the ratio of villus length to crypt depth in the posterior segment of ileum between acute cold stress group and control group, while the mucosal thickness in the posterior segment of ileum significantly decreased in the acute cold stress group in comparison to control group. Acute cold stress significantly reduced the large intestine number of goblet cells. The structures of the intestinal mucosal mechanical barrier of Chinese soft-shelled turtle under acute cold stress are an intestinal segment dependent pattern. These results suggest that the various segments of the intestine of Chinese soft-shelled turtle have a special response style to acute cold stress.

Key words: Chinese soft-shelled turtle; Cold stress; Diamine oxidase; Intestinal mucosal morphology