

饲料添加V_C对腹水肉鸡缺氧诱导因子-1 α 基因表达及机体氧化与抗氧化能力的影响

曾秋凤, 陈代文*, 张克英, 余冰, 丁雪梅 (四川农业大学 动物营养研究所, 四川 雅安 625014)

摘要: 通过饲料添加1.5 mg/kg 三碘甲状原氨酸(3,3',5'-triiodo-L-thyronine, T₃)诱导肉鸡产生腹水综合征(AS), 研究了饲料中添加不同剂量的V_C对肉鸡机体氧化与抗氧化能力、肺脏缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因表达及AS发病率的影响。结果表明: 饲料中添加不同剂量的V_C可不同程度降低肉鸡心脏指数和AS发病率, 1 000 mg/kg V_C可显著降低肉鸡心脏指数($P < 0.05$); 饲料V_C可增加AS肉鸡肝脏和血液的总抗氧化能力, 降低MDA的含量, 饲料添加100、1 000和10 000 mg/kg V_C可显著降低AS肉鸡肝脏和血液MDA的浓度($P < 0.05$), 添加100、500和10 000 mg/kg V_C可显著提高血液T-AOC活性($P < 0.05$); V_C可以显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)降低AS肉鸡肺脏HIF-1 α mRNA和蛋白质表达水平, 在1 000 mg/kg时, HIF-1 α 蛋白的表达量达到极显著性差异($P < 0.01$); 从血液生化指标来看, V_C可降低AS肉鸡血液中乳酸的水平和乳酸脱氢酶(LDH)的活力, 在500、1 000 mg/kg时达到显著性差异($P < 0.05$)。以上结果表明饲料中添加1 000 mg/kg V_C对肉鸡AS有较好的防治效果。

关键词: 腹水综合征; 缺氧诱导因子-1 α V_C; 总抗氧化能力; 丙二醛; 肉鸡

中图分类号: S856; S831.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-4545(2007)01-0106-05

Effects of dietary vitamin C on oxidative and anti-oxidative capacity and hypoxia-inducible factor-1 α gene expression in ascitic broilers

ZENG Qiu-feng, CHEN Dai-wen*, ZHANG Ke-ying, YU Bing, DING Xue-mei (*Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China*)

Abstract The experiment aimed to set up an ascites syndrome (AS) model with 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T₃, 1.5 mg/kg) to investigate the effects of dietary V_C on oxidative and anti-oxidative capacity and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene expression. The results showed that: Dietary V_C could decrease the heart indexes and incidence of ascites of broilers. The dose of 1 000 mg V_C/kg significantly decreased the heart indexes of AS broilers ($P < 0.05$); Dietary V_C increased the total antioxidant capacity (T-AOC) and decreased malondialdehyde (MDA) content in liver and blood of AS broilers to different extent. The dose of 100, 1 000 and 10 000 mg/kg V_C significantly decreased MDA content in the hepatic and blood ($P < 0.05$) and 100, 500 and 10 000 mg/kg V_C significantly increased T-AOC activities in the blood ($P < 0.05$); Dietary V_C decreased significantly HIF-1 α mRNA and protein expression level ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) in broilers of AS. The supplement of 500 and 1 000 mg/kg V_C in diets decreased significantly the content of serum lactate and the activity of LDH. The present experiment suggests that supplementation of V_C at 900 mg/kg in diet can alleviate the incidence of ascites of broilers. Its possible mechanism is believed to be related with the improvement of antioxidant capacity and the decline of HIF-1 α gene expression.

Key words: ascites syndrome; hypoxia-inducible factor-1 α V_C; total antioxidant capacity; malondialdehyde; broilers

* Corresponding author, Tel: 0835-2885065, Email: chendwz@sicau.edu.cn

HIF-1 α 基因是转录因子缺氧诱导因子-1(HIF-1)的一个亚基, HIF-1 α 表达增加可激活并丰富细胞

中的HIF-1 α ^[1], 当细胞O₂浓度下降时, HIF-1 α 表达增加, 诱导其靶基因如VEGF、EPO、NOS、糖酵解酶、IGF-1和IGF-2等基因的表达, 从而产生一系列的病理生理变化^[2]。肉鸡腹水综合征(AS)又称肉鸡肺动脉高压综合征(pulmonary hypertension syndrome, PHS), 其最终引发因素是机体系统缺氧^[3]。

在有氧细胞中HIF-1 α 在泛素蛋白酶系统介导下迅速降解, 缺氧时降解受到抑制, HIF-1 α 积聚, 含

收稿日期: 2005-03-08

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IR-TO555)

作者简介: 曾秋凤(1974-), 女, 博士。

* 通讯作者, Tel: 0835-2885065, Email: chendwz@sicau.edu.cn

量增高。有研究表明,在人类肿瘤细胞培养液中添加 V_c 可以降低 HIF-1 α 蛋白的积聚,增加 HIF-1 α 的降解,因为 V_c 是降解 HIF-1 α 的关键酶活性得以发挥的必需营养成分^[4]。但因禽类可自身合成 V_c , 所以外源性 V_c 对最适条件下生长的健康鸡群而言并不是一种基本的和必需的营养物质,但当恶劣环境、病理状态和营养不平衡等因素妨碍到机体合成 V_c 时,利用外源性 V_c 就可调节这些不利因素所致的鸡群应激情况^[3], 如有试验表明, 饲料中添加 500 mg/kg V_c 可显著降低肉鸡 AS 的发病率^[5]。但在饲料中添加 V_c , 可被肠道分解为 CO_2 , 过量的 V_c 会随尿液排出体外, 仅仅只有一少部分外源 V_c 被平衡到体内^[6]。因此, 本试验考察饲料添加不同水平 V_c 对肉鸡 AS 的影响, 并进一步从血液生化指标、血液和组织氧化和抗氧化功能、基因表达水平等方面来探讨 V_c 预防肉鸡 AS 发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试验设计与样品收集 1 日龄健康 AA 肉鸡 180 只, 随机分为 6 个处理, 每个处理 3 个重复, 每个重复 10 只。处理 1: T_3 (0 mg/kg) + V_c (0 mg/kg); 处理 2: T_3 (1.5 mg/kg) + V_c (0 mg/kg); 处理 3: T_3 (1.5 mg/kg) + V_c (100 mg/kg); 处理 4: T_3 (1.5 mg/kg) + V_c (500 mg/kg); 处理 5: T_3 (1.5 mg/kg) + V_c (1 000 mg/kg); 处理 6: T_3 (1.5 mg/kg) + V_c (10 000 mg/kg)。所用 V_c 是含 90% V_c 的商品, 饲料添加 T_3 是为了诱导肉鸡发生 AS。试鸡均自由采食和饮水, 试验期为 21 d。21 日龄时, 每处理组随机选 6 只鸡屠宰, 心脏采血后, 迅速剖开腹腔及胸腔, 取出肺脏, 用 DEPC 处理的、预冷的生理盐水洗涤, 液氮冷冻, -70℃ 保存。再取肝脏和心脏, -20℃ 保存备用。

血样 3 000 r/min 离心, 分离血清, 于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 抽提 取 100 mg 冷冻的肺脏组织, 用一步法提取组织总 RNA。

1.3 HIF-1 α mRNA RT-PCR 反转录 (RT), 利用 AMV 逆转录酶在 20 μ L 反应体系中于 PCR 仪上进行反应, 条件为 30℃, 3 min; 42℃, 2 h; 70℃, 10 min。根据 GenBank 鸡胚 HIF-1 α cDNA 序列 (NM 204297) 设计特异性引物, 通过 cDNA 克隆, 确认为 AS 肉鸡 HIF-1 α 基因, 其序列登陆号为 DQ 166204, HIF-1 α 上游引物, 5'-CCTGGGTCGTTCAA TCTATG-3'; 下游引物, 5'-TCTGTTGCCTT

GTATGGGAG-3', 扩增片段为 1 576 bp。

根据鸡 β -actin cDNA 序列 (NM 205518) 设计 β -actin 引物: 上游引物, 5'-GGCCGTGATCTCCTTC TGC-3'; 下游引物, 5'-CGGGACCTGACCGACT-3', 扩增片段为 426 bp。

以 β -actin 为内参, 进行 PCR 扩增。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 45 s, 循环 35 次; 72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像。

1.4 免疫组化染色程序 按照即用型 SABC 试剂盒提供的石蜡切片免疫组化染色程序: 切片经常规脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温孵育 10 min; 蒸馏水洗 2 min \times 3 次, 切片于 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中进行抗原的热修复; PBS 洗 3 min \times 3 次, 正常兔血清封闭液封闭 20 min; 倾去血清, 滴加 HIF-1 α 一抗工作液, 4℃ 过夜; PBS 洗 2 min \times 3 次, 滴加生物素化二抗 IgG, 室温孵育 30 min; PBS 洗 2 min \times 3 次, 滴加 SABC 工作液, 室温孵育 30 min; PBS 洗 5 min \times 6 次, DAB 染色, 水洗, 苏木素轻度复染, 脱水, 封片, 显微镜观察 (计数)、照相。

1.5 血糖、乳酸和乳酸脱氢酶的测定 血糖采用 GOD-PAP 法利用日立 7020 型自动生化分析仪测定; 乳酸和乳酸脱氢酶 (LDH) 分别利用 NBT 法和 2, 4-二硝基苯肼法, 利用 721 分光光度计测定。

1.6 肝脏、肺脏、血液中总抗氧化能力、丙二醛、 V_c 的测定 总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 和 V_c 分别采用络合物比色法、硫代巴比妥酸 (TBA) 法和啡罗啉比色法, 利用 721 分光光度计测定。

1.7 心脏指数的测定 将心房、脂肪、血管及血凝块去除后, 从室中膈分离出右心室及左心室和膈, 分别称重后, 按心脏指数 = 右心室重 / (左心室重 + 膈重) 计算。从心脏指数可以间接推断肉鸡是否患有 AS^[7]。

1.8 统计分析 结果用平均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 1.00 统计软件进行单因素方差分析, 用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 饲料添加 V_c 对肉鸡 AS 的预防效果 从表 1 来看, 在 AS 肉鸡饲料中添加 100、1 000 mg/kg V_c 可以显著降低肉鸡心脏指数 ($P < 0.05$) 和 AS 发病率, 其中以 1 000 mg/kg V_c 处理组效果最好。AS 肉鸡心脏指数和发病率均显著或极显著高于正常对照组肉鸡。

表 1 饲料添加V_c对肉鸡AS的预防效果

项 目	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6
心脏指数	0.22 ± 0.06 ^a	0.31 ± 0.02 ^c	0.28 ± 0.03 ^b	0.30 ± 0.02 ^c	0.27 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.02 ^{bc}
AS 发病率/%	10.83 ± 5.83 ^a	65.56 ± 8.68 ^b	62.22 ± 23.20 ^b	55.00 ± 16.07 ^b	46.67 ± 6.67 ^b	55.67 ± 2.96 ^b

注: 同一行肩注相同字母表示差异不显著($P > 0.05$), 肩注相邻字母表示差异显著($P < 0.05$), 肩注相隔字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同

2.2 V_c对AS肉鸡机体氧化和抗氧化能力的影响

从表 2 可看出, AS 肉鸡肝脏V_c和MDA 含量、肝脏和血液MDA 的水平($P < 0.05$)均高于正常肉鸡, 而T-AOC 低于正常肉鸡。表明在AS 肉鸡饲料中添加V_c, 具有提高组织血液T-AOC 活性, 降低MDA

水平的趋势, 饲料添加 100、1 000 和 10 000 mg/kg V_c可显著降低AS 肉鸡肝脏和血液MDA 的水平($P < 0.05$); 饲料添加 100、500 和 10 000 mg/kg V_c可显著提高血液T-AOC 活性($P < 0.05$)。

表 2 V_c对AS肉鸡机体氧化和抗氧化能力的影响

项 目	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6
肺脏						
V _c /(mg · g ⁻¹)	4.25 ± 0.57 ^a	5.74 ± 0.63 ^{ac}	6.29 ± 1.33 ^{ac}	7.77 ± 1.23 ^c	6.36 ± 0.66 ^{ac}	4.62 ± 0.75 ^{ac}
T-AOC/(U · mg ⁻¹)	1.25 ± 0.16	0.80 ± 0.12	1.10 ± 0.22	1.10 ± 0.10	1.16 ± 0.15	1.01 ± 0.10
MDA/(mmol · g ⁻¹)	4.66 ± 0.49	6.00 ± 0.37	5.01 ± 0.88	5.96 ± 0.66	5.50 ± 0.63	5.02 ± 0.52
肝脏						
V _c /(mg · g ⁻¹)	3.56 ± 0.47	2.78 ± 0.31	3.55 ± 0.27	2.94 ± 0.22	3.07 ± 0.16	2.93 ± 0.14
T-AOC/(U · mg ⁻¹)	1.40 ± 0.12	1.11 ± 0.06	1.40 ± 0.18	1.22 ± 0.12	1.26 ± 0.92	1.25 ± 0.11
MDA/(mmol · g ⁻¹)	1.97 ± 0.29 ^a	3.01 ± 0.31 ^c	2.20 ± 0.17 ^a	2.46 ± 0.19 ^{ac}	2.05 ± 0.24 ^a	2.00 ± 0.09 ^a
血液						
T-AOC/(U · mL ⁻¹)	8.02 ± 0.51 ^{abc}	6.99 ± 0.49 ^a	8.26 ± 0.61 ^b	8.61 ± 0.47 ^b	7.03 ± 0.34 ^{abc}	8.92 ± 0.33 ^{bc}
MDA/(mmol · L ⁻¹)	4.85 ± 0.31 ^a	7.27 ± 0.28 ^c	5.78 ± 0.34 ^{ab}	5.40 ± 0.31 ^{ab}	5.30 ± 0.43 ^{ab}	5.67 ± 0.45 ^{ab}

2.3 V_c对AS肉鸡血糖、乳酸和LDH 的影响 从表 3 可看出, 正常肉鸡和T₃诱导AS 肉鸡血液血糖的浓度差异不显著, 饲料添加V_c对血液血糖浓度的影响也不显著($P > 0.05$)。T₃诱导AS 肉鸡血液乳酸浓度和LDH 活性极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)高于正常肉鸡, AS 肉鸡饲料中添加V_c具有降低血液乳酸浓度和LDH 活性的趋势, 其中对LDH 活性的影响达到显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的水平。

其中以1 000 mg/kg V_c的效果最佳。从图 2 看HIF-1 α 蛋白的相对表达量也出现了类似的规律, 其中1 000 mg/kg V_c可极显著降低AS 肉鸡HIF-1 α 蛋白的相对表达量($P < 0.01$)。正常肉鸡肺脏几乎没有HIF-1 α 蛋白表达的阳性细胞。

2.4 V_c对AS肉鸡肺脏HIF-1 α mRNA 和蛋白相对表达量的影响 从表 4 和图 1 来看, T₃诱导AS 肉鸡肺脏HIF-1 α mRNA 相对表达量显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于正常肉鸡。在T₃诱导条件下, 饲料中添加V_c可显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)降低AS 肉鸡HIF-1 α mRNA 的相对表达量,

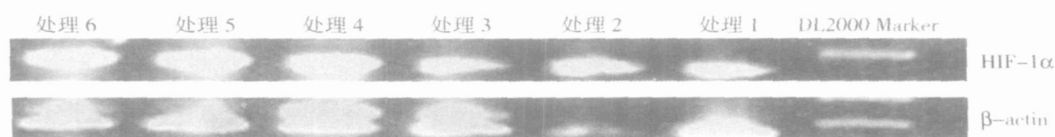
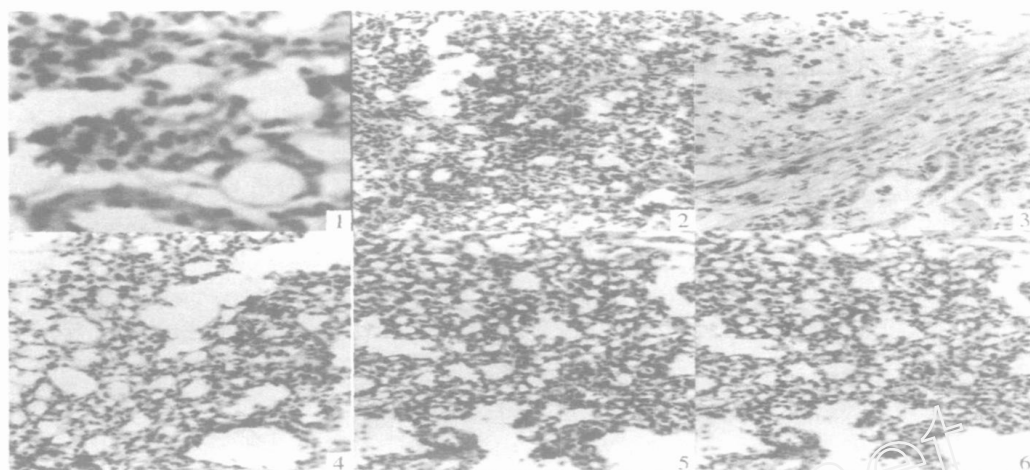
表 3 V_c对AS肉鸡血糖、乳酸和LDH 的影响

组别	血糖/(mmol · L ⁻¹)	乳酸/(mmol · L ⁻¹)	LDH/(U · L ⁻¹)
处理 1	11.99 ± 0.31	5.13 ± 0.38 ^a	6 729.22 ± 122.96 ^a
处理 2	12.61 ± 0.38	6.15 ± 0.26 ^c	7 231.34 ± 93.60 ^b
处理 3	12.34 ± 0.34	5.97 ± 0.17 ^c	6 807.99 ± 125.02 ^a
处理 4	12.51 ± 0.41	5.61 ± 0.15 ^{bc}	6 706.61 ± 53.33 ^a
处理 5	11.77 ± 0.44	5.83 ± 0.16 ^c	6 358.22 ± 131.93 ^{ac}
处理 6	12.25 ± 0.31	5.77 ± 0.26 ^c	6 328.73 ± 201.38 ^{ac}

表 4 V_c对AS肉鸡肺脏HIF-1 α mRNA 和蛋白相对表达量的影响

项 目	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6
mRNA	0.56 ± 0.05 ^c	1.58 ± 0.12 ^a	1.19 ± 0.10 ^{cb}	1.02 ± 0.13 ^{cb}	0.78 ± 0.02 ^{ef}	1.27 ± 0.04 ^b
蛋白/%	-	79.37 ± 6.21 ^a	74.25 ± 4.89 ^{ab}	62.25 ± 2.82 ^b	48.88 ± 5.34 ^c	56.24 ± 4.61 ^{bc}

注: HIF-1 α mRNA 的相对表达量以HIF-1 α 光密度值/ β actin 光密度值表示; 蛋白的相对表达量以HIF-1 α 阳性细胞数占总细胞数的百分比表示

图 1 HIF-1 α mRNA 表达的凝胶电泳图图 2 HIF-1 α 蛋白表达的免疫组化结果 1~ 6, 示处理 1~ 6

3 讨论

本试验结果表明, T_3 诱导应激可增加肉鸡血液、肝脏和肺脏MDA 的浓度及肺脏 V_c 的含量; 降低血液、肝脏和肺脏T-AOC 的水平。有研究表明, 在AS 肉鸡体内有几个潜在的细胞位点可以产生这些活性物质导致脂质过氧化增加和抗氧化能力丧失, 在AS 肉鸡体内可观察到大量炎症反应发生^[8]。而在 T_3 诱导的肉鸡饲料中添加 V_c 后, 肉鸡血液、肝脏和肺脏中MDA 生成量下降, 机体T-AOC 和 V_c 水平上升, 说明肉鸡机体的抗氧化能力提高了。这是因为 V_c 作为一种抗氧化剂, 参与体内氧化还原反应, 促进了生物氧化过程。研究表明, V_c 可以在 V_E 清除氧自由基时将其还原而恢复 V_E 。Chen 等^[9]报道, 在大鼠体内 V_E 和 V_c 具有营养互作的作用, 且饲料 V_E 在肝脏合成 V_c 时发挥一定的作用^[10-11]。

从本试验结果可以看出, 肉鸡肺脏中 V_c 的含量极显著高于肝脏以及 T_3 诱导应激也显著提高肉鸡肺脏 V_c 的含量, 可能的原因是 T_3 诱导应激使肉鸡机体炎症反应加剧, 肺脏的病变发生在肝脏之前, 且比肝脏严重所导致。据报道, 在新愈合的伤口附近, V_c 的含量也很高。此外, 有试验表明, 肺泡里层的细胞外液中抗坏血酸的含量十分丰富。通过直接测定

大鼠肺泡液中总抗坏血酸的含量表明, 肺泡液中抗坏血酸的浓度(6.3 mmol/L) 显著高于正常大鼠血清中的总抗坏血酸(0.1 mmol/L)^[12]。

本试验观察到, 添加不同剂量的 V_c 均可显著或极显著降低肉鸡肺脏中HIF-1 α mRNA 和蛋白的相对表达量, 但在检测鸡肺脏HIF-1 α 蛋白表达时由于没有鸡自身的抗HIF-1 α 一抗, 采用的是小鼠抗HIF-1 α 一抗, 鸡与小鼠HIF-1 α 蛋白的同源性为70%, 因此有待于利用鸡自身的HIF-1 α 一抗进一步验证。 V_c 均可降低肉鸡HIF-1 α mRNA 和蛋白的相对表达量可能的原因: 本试验结果表明, T_3 诱导条件下于肉鸡饲料中添加 V_c 有利于肉鸡对缺氧的适应。主要表现在肉鸡血液LDH 活性和乳酸的水平降低, 表明机体有氧代谢与无氧代谢的比值高, 机体缺氧的程度相对较低, 导致HIF-1 α mRNA 和蛋白的表达量也低。从本试验结果可看出, 肉鸡饲料中添加 V_c 提高了机体抗氧化能力, 即降低了肉鸡体内ROS 的水平。程建^[13]研究发现, 在SMMC-7721 肝癌细胞培养液中加入10 mmol 抗氧化剂NAC, 可下调HIF-1 α mRNA 的表达, 表明ROS 增加可提高HIF-1 α 表达量。Goyal 等^[14]研究发现, 在缺氧时NAD(P)H 氧化酶1(Nox1)mRNA 和蛋白水平增加, 伴随ROS 产量提高, A549 细胞用含Nox1 表达载体转染后ROS 产

量增加,并激活 HIF-1 依赖性靶基因的表达。

参考文献:

- [1] Pag  L, Robitaille GA, Pouyssegur J, et al Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48403-48409.
- [2] Yu A Y. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor 1 in the lung[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275: 818-826.
- [3] Pardue SL, Thaxton J P. Ascorbic acid in poultry: a review [J]. *World's Poult Sci Journal*, 1986, 42: 107-123.
- [4] Knowles H J, Raval R R, Harris A L, et al Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1764-1768.
- [5] Ladmakhi M H, Buys N, Dewil E, et al The prophylactic effect of vitamin C supplementation on broiler ascites incidence and plasma thyroid hormone concentration[J]. *Avian Pathol*, 1997, 26: 33-44.
- [6] Tsao C S, Salimi S L. Influence of erythorbic acid on ascorbic acid retention and elimination in the mouse [J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 1983, 53: 258-264.
- [7] 张克春, 王桂军. 饮水高钠诱发的肉鸡腹水综合征的血液流变学特征[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(6): 592-595.
- [8] Enkvetchakul B. Antioxidants, lipid peroxides, and pathophysiology of male broiler chickens with ascites [D]. Fayetteville AR: University of Arkansas, 1994.
- [9] Chen L H, Chang H M. Effects of high level of vitamin C on tissue antioxidant status of guinea pigs[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 1979, 49: 87-91.
- [10] Carpenter M P, Kitabchi A E, McCay P B, et al The activation by tocopherol and other agents of ascorbic acid synthesis by liver homogenates from vitamin E-deficient rats[J]. *J Biol Chem*, 1959, 234: 2814-2818.
- [11] 向瑞平, 孙卫东, 王小龙, 等. 日粮添加 V_E 和 V_C 对肺动脉高压综合征患鸡自由基代谢的影响[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(1): 73-78.
- [12] Snyder A, Skoza L, Kikkawa Y. Comparative removal of ascorbic acid and other airway substances by sequential bronchoalveolar lavages [J]. *Lung*, 1983, 161: 112-121.
- [13] 程建. 缺氧和活性氧对肝癌细胞生长和糖代谢的影响及作用机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003: 47-78.
- [14] Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, et al Up-regulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36: 1279-1288.

(上接 105 页)

- [10] 刘艳琴. 奶牛泌乳早期能量负平衡的危害及解决措施[J]. *中国奶牛*, 2000, (1): 31-32.
- [11] Hayirli A, Bertics S J, Grummer R R. Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of holsteins in early lactation[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 2180-2191.
- [12] Donkin S S, Amentano L E. Regulation of gluconeogenesis by insulin and glucagon in the neonatal bovine[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1994, 266: R1229-R1237.
- [13] 孙玉成, 王雪莹, 李红梅, 等. 干乳期能量摄入水平对围产期奶牛肝载脂蛋白 B 100 mRNA 丰度的影响[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(3): 320-322.
- [14] Friedman J M, Halaas J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals[J]. *Nature*, 1998, 395: 763-770.
- [15] 邵建华, 高妍, 袁振芳, 等. 游离脂肪酸抑制大鼠肝细胞胰岛素受体和胰岛素受体底物 1 酪氨酸磷酸化[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, 15(6): 342-345.
- [16] Yokoo H, Saitoh T, Shiraishi S, et al Distinct effects of ketone bodies on down-regulation of cell surface insulin receptor and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in adrenal chromaffin cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 304(3): 994-1002.
- [17] Grohn Y, Lindberg L A. Ultrastructural changes of the liver in spontaneously ketotic cows[J]. *J Comp Pathol*, 1985, 95(3): 443-452.
- [18] Ojamaa K, Hedo J A, Roberts C T Jr, et al Defects in human insulin receptor gene expression[J]. *Mol Endocrinol*, 1988, 2(3): 242-247.