

肉仔鸡日粮中锌营养状况评价指标的研究

西南民族大学生命科学与技术学院 黄艳玲
山东省济宁市实验中学 李秀军

[摘要] 选用 384 只 1 日龄商品代 AA 肉公鸡随机分成 8 个处理组, 分别饲喂不添加锌的玉米-豆粕型基础日粮(对照组, 含锌 28.37 mg/kg) 和在对照组基础日粮中以无机硫酸锌形式添加 20、40、60、80、100、120 mg/kg 和 140 mg/kg 锌的试验日粮。试验期 7 d。研究日粮中添加不同水平无机锌对肉仔鸡生长性能、组织锌含量、含锌酶活性以及含锌蛋白及其基因表达的影响, 以考察这些指标对评价肉仔鸡锌营养状况的意义。结果表明: 肉仔鸡生长性能未受到添加锌水平的显著影响($P > 0.24$), 而胫骨锌、胰脏锌含量以及胰脏金属硫蛋白(MT)含量及其基因表达受锌水平影响极显著($P < 0.01$), 胫骨锌和胰脏锌含量随锌水平增加呈渐近线趋势变化, 胰脏 MT 含量及其基因表达则呈线性上升趋势。这些指标均可以作为反映肉仔鸡锌营养状况的指标。从相关系数比较来看, 胫骨锌和胰脏锌与饲料锌的相关性比胰脏 MT 含量及其基因表达更密切。胰脏 MT 含量及其基因表达随锌水平增加线性上升, 可用作评价不同锌源生物学利用率的有效指标。

[关键词] 锌; 营养状况; 肉仔鸡

[中图分类号] S831.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-3314(2009)15-0011-04

[Abstract] This experiment was conducted to select the optimal biomarkers of zinc (Zn) for broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. A total of 384 day-old male broiler chicks were assigned randomly to 8 treatments. The treatments were fed basal corn-soybean meal diet (Zn 28.32 mg/kg) supplemented with 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/kg and 140 mg/kg of Zn in the form of reagent grade $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for 7 days. All treatments had 6 replicates with 8 chicks per pen. Performance, tissue Zn concentration, pancreas metallothionein (MT) and pancreas MT mRNA were analyzed for choosing suitable criterion as zinc indicators of broilers. Regression analysis was also performed. Results showed that performance of broilers were not affected by dietary Zn concentration ($P > 0.24$). However, the bone Zn, pancreas Zn, pancreas MT, and pancreas MT mRNA concentration were affected by different dietary Zn concentration ($P < 0.01$). According to regression analysis, asymptotical responses were exhibited by bone Zn and pancreas Zn. As dietary Zn concentration increased, pancreas MT, and pancreas MT mRNA concentration increased linearly. The correlation of bone Zn and pancreas Zn was better than pancreas MT and pancreas MT mRNA. In conclusion, pancreas Zn concentration may be an optimal biomarker for broiler Zn status. Pancreas MT and pancreas MT mRNA concentration increased linearly with the enhancing of dietary Zn concentration, which may be useful criterions for Zn bioavailability study.

[Key words] zinc; nutritional condition; broilers

锌和其他微量元素一样, 在动物体内主要通过酶或功能蛋白参与一系列重要生化反应。一般认为, 组织中的含锌关键酶是评价体内锌营养状况的敏感指标, 但大多数含锌酶与锌离子紧密结合, 不易受到机体锌营养状况的影响(Hambidge, 2003)。特定敏感组织中(胫骨、胰腺)锌含量是目前评价锌营养状况的最常用指标, 但不一定是特异功能性指标。到目前为止, 寻找反映机体锌营养状况的敏感功能性酶指标值得进一步探讨。研究

表明, 锌通过与金属反应转录因子-1 (metal responsive transcription factor-1, MTF-1) 可调节许多基因的表达, 其中主要是金属硫蛋白(metallothionein, MT)以及锌转运蛋白(zinc transporters, ZnTs)基因的表达(Cousins 等, 2003)。本试验通过在肉仔鸡饲料中添加不同水平锌, 系统考察不同水平锌对肉仔鸡生长性能、组织锌含量、含锌蛋白含量及含锌蛋白基因表达的影响, 从而筛选出锌敏感功能性指标, 用以评价肉仔鸡日粮锌的营养状况, 为锌在肉鸡中的营养研究奠定基础。

1 材料与方法

基金项目: 西南民族大学人才引进项目(234798)

1.1 试验动物与日粮 选384只1日龄AA肉公鸡,采用单因子安排的完全随机设计,随机分成8组,每组设6个重复,每个重复8只鸡。饲喂不含锌的玉米-豆粕基础日粮。基础日粮参照NRC(1994)家禽营养需要量中肉仔鸡营养建议量配制,日粮组成及营养水平见表1。日粮锌(硫酸锌)添加水平分别为0、20、40、60、80、100、120 mg/kg和140 mg/kg。配制试验日粮时现场采样,研磨过200目筛后置于塑料瓶中低温保存以备分析。试验期7 d。试验期末以重复笼为单位称空腹体重和耗料量。

表1 基础日粮组成及营养水平

日粮组成	含量	营养水平	含量
玉米/%	55.97	代谢能/(MJ/kg)	12.53
豆粕/%	36.00	粗蛋白质/%	21.56
大豆油/%	3.60	赖氨酸/%	1.17
磷酸氢钙/%	1.95	蛋氨酸/%	0.54
石粉/%	1.16	蛋氨酸+胱氨酸/%	0.91
食盐/%	0.30	钙/%	1.10
蛋氨酸/%	0.20	非植酸磷/%	0.46
微量成分 ¹ /%	0.32	锌 ² /(mg/kg)	28.37
玉米淀粉+锌 ² /%	0.50		

注:(1)每千克饲料中添加维生素A 10000 IU,维生素D₃ 2600 IU,维生素E 20 IU,维生素K₃ 2 mg,维生素B₁ 1.6 mg,维生素B₂ 6 mg,维生素B₆ 3 mg,维生素B₁₂ 0.014 mg,泛酸 20 mg,烟酸 30 mg,叶酸 0.8 mg,生物素 0.12 mg,胆碱 1300 mg,Cu(CuSO₄·5H₂O) 8 mg,Mn(MnSO₄·H₂O) 100 mg,Fe(FeSO₄·7H₂O) 80 mg,I(KI) 0.35 mg,Se(Na₂SeO₃) 0.15 mg;(2)锌替代等重的玉米淀粉添加;(3)实测值。

1.2 饲养管理 饲养管理按《肉仔鸡饲养管理手册》进行(杨全明和刁有祥,2007)。自由采食和饮水(去离子水),24 h光照。

1.3 样品的采集与制备 试验第7天各重复随机选取4只鸡于禁食一夜后屠宰,立即采出肝脏、胰脏和左侧腿胫骨。部分胰脏于-196℃液氮冻存,以备分析金属硫蛋白(MT)含量以及MT mRNA水平;剩余胰脏组织以及胫骨-20℃冻存,以备分析组织锌含量。将胫骨先用去离子水冲洗干净后,煮沸,剥除外层附着物,再用去离子水冲洗干净,于600℃下灰化至恒重备用,制备胫骨灰,将每个重复4只鸡的样品合并为一个样品分析。

1.4 样品分析 日粮及组织含锌量的测定:日粮、胰脏及胫骨灰经浓硝酸在MARS 5高压密闭微波消解器(CEM,USA)中湿消化后,在IRIS Intrepid II等离子体发射光谱仪(TE,USA)上测定Zn含量,并以国家标准局牛肝作为参照检验结果

的准确性。

胰脏MT含量测定:采用镍血红蛋白亲和力和分析法分析胰脏中MT含量(成廷水,2004)。

胰脏MT mRNA水平的测定:采用SYBR Green实时荧光定量RT-PCR法(QRT-PCR)测定(Huang等,2007)。根据鸡MT和β-actin cDNA序列,分别设计合成其扩增引物,引物序列和预期扩增的PCR产物的长度见表2。

表2 鸡MT及β-actin(管家基因)的引物序列

引物	引物序列	位置及扩增长度
MT上游	AAG GGC TGT CTC TGC AAG GA	188 - 350
MT下游	CTT CAT CGG TAT GGA AGG TAC AAA	163 bp
β-actin上游	GAG AAA TTG TGC CTC ACA TCA	685 - 818
β-actin下游	CCT GAA CCT CTC ATT GCC A	134 bp

1.5 数据统计分析 采用SAS 8.0统计软件中的一般线性模型(GLM)中单因素方差分析,对所有试验数据进行方差分析,每个重复笼为一个试验单元。方差分析差异显著者,用不相关比较法分析各指标随日粮锌添加水平的线性或曲线反应。采用曲线拟合法,利用线性、二次曲线和渐近线模式对相应的数据进行拟合。

2 结果与讨论

2.1 日粮锌水平对肉仔鸡生长性能的影响 见表3。

表3 日粮锌水平对肉仔鸡生长性能的影响(n=6)

指标	添加锌水平/(mg/kg)								P值
	0	20	40	60	80	100	120	140	
日增重/g	20.51	21.13	20.72	21.03	20.96	21.28	20.97	20.90	0.08
日采食量/g	18.48	18.61	18.24	18.32	18.31	18.96	18.54	18.26	0.08
料重比/g	0.85	0.88	0.88	0.87	0.87	0.89	0.88	0.87	0.004

由表3可知,日粮中添加不同水平锌对肉仔鸡生长性能影响不显著($P > 0.05$)。研究表明,当饲喂纯合和半纯合基础饲料时,适宜的饲料锌水平可以显著提高肉仔鸡早期生长性能(Wedekind和Baker,1990;Zeigler等,1961),但是当饲喂玉米豆粕型基础饲料时,生长性能通常不受饲料锌添加水平的影响(Wedekind等,1992),这是因为玉米豆粕型基础饲料中所含的锌已经满足了肉仔鸡生长的需要。本研究中的结论与前人研究结果一致。因此,证明了生长性能并不是反映肉鸡体内锌营养状况的最佳指标。

2.2 日粮锌水平对肉仔鸡组织锌含量的影响

结果见表 4。研究表明,相对于其他组织而言,肝脏以及肾脏对锌反应不敏感(黄艳玲等,2008;李杰和许振英,1994),故本次试验未对肝脏锌以及肾脏锌含量进行分析。本研究结果表明,日粮锌水平极显著影响胰脏和胫骨中锌含量($P < 0.01$),说明胰脏锌和胫骨锌含量都是评价肉仔鸡体内锌营

养状况的敏感指标。

胰脏锌含量随日粮锌变化呈渐近线形变化,胰脏锌含量与日粮锌添加量间拟合的渐近线方程为: $Y=62.34-31.48e^{-0.0505x}$ ($P < 0.0001, R^2=0.9925$)。

胫骨锌含量随日粮锌变化也呈渐进线变化,胫骨锌含量与日粮锌添加量间拟合的渐近线方程

表 4 日粮锌水平对肉仔鸡组织含锌量的影响 ($n=6$)

指标	锌添加水平/(mg/kg)								集合标准误	P 值		
	0	20	40	60	80	100	120	140		Zinc	Zinc linear	Zinc quadratic
胫骨锌/($\mu\text{g/g}$)	200.4 ^d	370.9 ^c	439.3 ^b	473.4 ^{ab}	480.7 ^a	490.1 ^a	498.3 ^a	503.0 ^a	36.43	< 0.001	< 0.001	< 0.001
胰脏锌*/($\mu\text{g/g}$)	30.88 ^c	50.97 ^b	59.34 ^a	59.83 ^a	60.97 ^a	61.92 ^a	61.72 ^a	64.03 ^a	3.87	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:(1)**表示鲜样基础;(2)同列数据中不含相同字母者差异显著($P < 0.05$);下同。

为: $Y=498.11-296.79e^{-0.041x}$ ($P < 0.0001, R^2 = 0.9986$)。

本试验与黄艳玲等(2008)对 21 日龄组织锌含量随日粮锌的变化的研究结果比较发现,在相同饲料锌水平,7 日龄与 21 日龄肉鸡胰脏锌含量变化不大,即胰脏锌含量随日龄变化很小,而胫骨锌含量变化却较大。这表明胰脏锌含量在鸡只生长第 1 周即可反映鸡体内锌营养状况,比胫骨对锌的变化更敏感。

Henry 等(1987)报道组织锌含量,特别是胫骨锌含量随着饲料锌含量增加而显著增加。Wedekind 等(1992)发现胫骨锌含量是评价肉鸡

锌需要量的适宜指标。李杰和许振英(1994)也证明胰脏是内脏中反应一定浓度锌变化最为敏感的组织。本研究结论与前人研究基本一致,证明胫骨和胰脏均可做为评价锌营养状况的有效指标,且胰脏比胫骨更为敏感。

2.3 日粮锌水平对肉仔鸡胰脏 MT 以及胰脏 MT mRNA 含量的影响 见表 5。

由表 5 可见,饲料锌含量均极显著影响胰脏 MT 含量及 MT mRNA 水平($P < 0.01$),说明这些指标可作为评价肉仔鸡体内锌营养状况的敏感指标。

胰脏 MT 含量随日粮锌水平的增加呈线性上

表 5 日粮锌水平对肉仔鸡胰脏 MT 含量及胰脏 MT mRNA 的影响 ($n=6$)

指标	锌添加水平/(mg/kg)								集合标准误	P 值		
	0	20	40	60	80	100	120	140		Zinc	Zinc linear	Zinc quadratic
胰脏 MT*/($\mu\text{g/g}$)	3.62 ^c	9.95 ^b	12.04 ^b	14.27 ^b	15.77 ^{ab}	16.42 ^{ab}	17.81 ^{ab}	20.95 ^a	1.89	< 0.001	< 0.001	0.003
胰脏 MT mRNA(R)/($\mu\text{g/g}$)	12.24 ^d	25.55 ^c	26.69 ^c	27.86 ^{bc}	29.28 ^b	31.27 ^b	34.09 ^{ab}	36.66 ^a	2.61	< 0.0001	< 0.0001	0.0005

升趋势。胰脏 MT 含量与日粮锌添加量拟合的方程为: $Y=6.55+0.1043x$ ($P=0.0002, R^2=0.9154$)。

胰脏 MT 水平随日粮锌水平的增加也呈线性上升趋势。胰脏 mRNA 与日粮锌添加量拟合的方程为: $Y=18.42+0.1362x$ ($P=0.0020, R^2=0.8189$)。

Oh 等(1979)研究表明,饲喂高剂量锌后,鸡胰组织中 MT 的含量显著增加。Cao 等(2002)在肉仔鸡饲料中添加 200 mg/kg 锌对肝脏和胰脏 MT 含量的研究也得到了同样的结论。本研究在满足肉仔鸡锌需要量日粮中添加硫酸锌,结果表明日粮锌添加水平显著影响胰脏 MT 含量,胰脏 MT 水平随锌添加水平的增加呈显著线性上升趋势,这与曹家银等(2003)的结果一致。

锌的轻度限制就能显著降低单核细胞 MT mRNA 的水平(Allan 等,2000),而加锌则能显著提高单核细胞 MT mRNA 的水平(Sullivan 等,1998)。因此推测,MT mRNA 可能是评定锌营养的最敏感指标。Cao 等(2002)在肉鸡上的研究表明,胰脏 MT mRNA 的水平随锌添加增加了 3 ~ 20 倍,肝脏增加了 3 ~ 5 倍。李发弟等(2006)研究表明,在蛋鸡基础日粮中(含锌 32.80 mg/kg)添加 60 mg/kg 锌可显著提高成年蛋鸡肝脏 MT 基因的表达水平,但对肾脏中 MT mRNA 的表达无显著性影响。这表明,锌调节组织中 MT 的基因表达呈现一定剂量依赖关系,且具有组织特异性。本研究结果表明,肉仔鸡胰脏 MT mRNA 水平随日粮锌

添加水平的增加呈现显著线性上升关系,此结论与Cao等(2002)和Fleet等(1988)的结果一致。

3 结论

由本试验结果可以看出,肉仔鸡生长性能未受到添加锌水平的显著影响($P > 0.05$),而胫骨锌、胰脏锌含量、胰脏MT含量及其基因表达极显著受锌水平影响($P < 0.01$),胫骨锌和胰脏锌含量随锌水平增加呈渐近线趋势变化,胰脏MT含量及其基因表达则呈线性上升趋势。说明这些指标均可以作为反映肉仔鸡锌营养状况的指标。从相关系数比较来看,胫骨锌和胰脏锌与日粮锌的相关性比胰脏MT含量及其基因表达密切,且胰脏锌含量比胫骨锌更为敏感。胰脏MT含量及其基因表达随日粮锌水平增加线性上升,可以用作评价不同锌源生物学利用率的有效指标。

参考文献

- [1] 曹家银,罗绪刚, Davis S R,等.以组织锌、金属硫蛋白及其基因表达指标评价肉仔鸡对锌源的相对生物学利用率[J].畜牧兽医学报,2003,34:227~231.
- [2] 成廷水.氨基酸锌对蛋鸡免疫和抗氧化功能的调节作用及其应用研究:[博士学位论文][D].北京:中国农业大学,2004.
- [3] 黄艳玲,吕林,罗绪刚,等.0~21日龄肉仔鸡饲料中总锌供给量适宜水平研究[J].畜牧兽医学报,2008,39(7):900~906.
- [4] 李发弟,张军霞,倪迎冬,等.饲料添加锌对蛋鸡金属硫蛋白基因表达的影响[J].畜牧兽医学报,2006,37:305~308.
- [5] 李杰,许振英.饲料植酸和锌水平对肉鸡锌吸收利用的影响[J].中国畜牧杂志,1994,30:3~4.
- [6] 杨全明,刁有祥.肉仔鸡饲养手册,第二版[M].北京:中国农业大学出版社,2007.
- [7] Allan A K, Hawksworth G M, Woodhouse L R, et al. Lymphocyte metal-

lothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers[J]. Br J Nutr, 2000, 84: 747~756.

- [8] Cao J, Henry P R, Davis S R, et al. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations[J]. Anim Feed Sci Tech, 2002, 101: 161~170.
- [9] Cousins R J, Blanchard R K, Popp M P, et al. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 6952~6957.
- [10] Fleet J C, Qureshi M A, Dieter R R, et al. Tissue-specific accumulation of metallothionein in chickens as influenced by the route of zinc administration[J]. J Nutr, 1988, 118: 176~182.
- [11] Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status [J]. J Nutr, 2003, 133: 948~955.
- [12] Henry P R, Ammerman C B, Miles R D. Bioavailability of manganese monoxide and manganese dioxide for broiler chicks [J]. Nutr Rep Int, 1987, 36: 425~433.
- [13] NRC. Nutrient Requirement of Poultry [M]. 9th rev ed Natl Acad Press, Washington D C, 1994.
- [14] Huang Y L, Lu L, Luo X G, et al. An optimal dietary zinc level for broiler chicks fed with a corn-soybean meal diet[J]. Poult Sci, 2007, 86: 2582~2589.
- [15] Oh S H, Nakaue H, Deagen J T, et al. Accumulation and depletion of zinc in chick tissue metallothionein[J]. J Nutr, 1979, 107: 1720~1729.
- [16] Sullivan V K, Burnett F R, Cousins R J. Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation[J]. J Nutr, 1998, 128: 707~713.
- [17] Wedekind K J, Baker D H. Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc[J]. J Anim Sci, 1990, 68: 684~689.
- [18] Wedekind K J, Hortin A E, Baker D H. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide[J]. J Anim Sci, 1992, 70: 178~187.
- [19] Zeigler T R, Leach R M, Norris L Jr C, et al. Zinc requirement of the chick: Factors affecting requirement[J]. Poult Sci, 1961, 40: 1584~1593.

[通讯地址: 成都市一环路南四段西南民族大学
学生生命科学与技术学院 17#, 邮编: 610041]

(上接第10页)

组合与Y+X₃和Y+J菌种组合脱毒率差异均不显著($P > 0.05$)。

参考文献

- [1] 施安辉, 张勇, 曲品, 等. 高效降解棉酚菌株的选育及脱毒条件的研究[J]. 微生物学报, 1998, 38(4): 318~320.
- [2] 孙建义, 许梓荣. 利用假丝酵母进行棉籽饼脱毒的研究[J]. 中国粮油学报, 1995, 10(1): 61~64.
- [3] 徐姗姗, 邱宏端. 微生物发酵生产蛋白饲料的研究进展[J]. 福州大学学报, 自然科学版, 2002, 30(增刊): 710~712.
- [4] 闫轶洁. 黑曲霉固体发酵棉仁粕优化工艺的研究:[硕士学位论文][D]. 北京: 首都师范大学, 2005.
- [5] 杨继良, 周大云, 杨伟华, 等. 高效降解棉酚菌种的筛选及棉饼脱毒参数的研究[J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 225~229.
- [6] 张文举, 赵顺红, 许梓荣, 等. 复合固体发酵对棉籽饼脱毒效果的影响研究[J]. 粮食与饲料工业, 2006, 6: 35~37.
- [7] 张文举. 高效降解棉酚菌种的选育及棉籽粕生物发酵的研究:[博士学位

论文][D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

- [8] 钟英长, 吴玲娟. 利用微生物将棉籽中游离棉酚脱毒的研究[J]. 中山大学学报, 自然科学版, 1989, 28(3): 67~72.
- [9] Blackwelder J T, Hopkins B A, Diaz D E, et al. Milk production and plasma gossypol of cows fed cottonseed and oil seed meals with or without rumen-undegradable protein[J]. J Dairy Sci, 1998, 81: 2934~2931.
- [10] Marin A P. Retardation of Polymer oxidation by natural antioxidant gossypol[J]. Polymer Degradation and stability, Kinetics of oxygen consumption, 1992, 35(2): 141~146.
- [11] Nofziger S M, Hopkins B A, Diaz D E, et al. Effect of whole and expanded-expressed cotton seed on milk yield and blood gossypol [J]. J Dairy Sci, 2000, 83: 2539~2547.
- [12] Robinson P H, Getachew G, Peters D E J, et al. Influence of variety and Storage for up to 22 Days on Nutrient Composition and Gossypol level of Pm a Cottonseed (*Gossypium* spp) [J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 61: 146~156.

[通讯地址: 广州市天河区东莞庄一横路133号, 邮编: 510610]