

胚胎注射谷氨酰胺对肉仔鸡早期小肠发育的影响*

邓留坤^{1,2}, 张涌¹, 高睿², 李云甫², 张君慧²

(1. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100; 2. 杨凌职业技术学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 选用已孵化 18 d 的肉仔鸡活胚蛋 240 枚, 随机分成 4 组, 每组 6 个重复, 每重复 10 枚蛋。I 组注射 1 mL 7.5 mg/mL 生理盐水作为对照, II、III、IV 组分别向鸡胚羊膜腔内注射质量浓度为 5、10、15 mg/mL 的谷氨酰胺营养液 1 mL。结果表明: 注射谷氨酰胺能不同程度提高肉仔鸡早期小肠绒毛高度, 降低隐窝深度, 提高绒毛高度与隐窝深度的比值, 但作用效果因观察时段、肠段及营养液质量浓度的不同而有所差异。

关键词: 胚胎注射; 谷氨酰胺; 小肠; 肉仔鸡

中图分类号: S816.7; S831.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2010)10-0016-05

Effects of Glutamine Feeding in Ovo on Early Small Intestine Development in Broilers

DENG Liukun^{1,2}, ZHANG Yong¹, GAO Rui², LI Yunfu² and ZHANG Junhui²

(1. Veterinary Medicine College, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Yangling Vocational and Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this study, 240 hatching broiler eggs at 18-d incubation were randomly divided into 4 treatments with 6 replicates of 10 eggs each. Eggs in treatment one were injected with 1 mL 7.5 mg/mL physiological saline into amniotic cavity as control, and those in treatment Two, Three and Four were injected into amniotic cavity with 1 mL 5, 10, 15 mg/mL glutamine(Gln) solution, respectively. The results showed that the glutamine feeding in ovo increased the villus height but decreased the crypt depth at different rates, raising the villus height/crypt depth ratio, and that the effects varied with the sessions, the anatomic locations of intestine and the concentration of glutamine solution.

Key words: In ovo feeding; Glutamine(Gln); Small intestine; Broilers

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是一些快速分裂细胞的能量来源和向其他重要的氨基酸及某些生物大分子转化的原料来源, 在维持肠道以及免疫系统的正常形态和功能上有着非常重要的作用^[1]。有研究表明, Gln 作为肠上皮细胞的营养物质, 能防止肠黏膜上皮细胞萎缩, 改善肠道的通透性, 并且能促进隐窝细胞增生和肠腔内粘液的分泌。自 20 世纪 80 年代发现 Gln 是动物机体肠道的一种重要氨基酸以来, Gln 在小肠中的独特功能成为了肠道营养物质中研究的热点。但大多研究均围绕断奶仔猪展开, 对肉仔鸡的研究较少, 且多为 Gln 在饲料中添加试验, 较少将其提前到

胚胎阶段。为了探讨外源性营养对肉仔鸡早期肠道黏膜发育的影响, 寻找促进肉仔鸡早期肠道功能、提高生产性能的新途径, 本试验研究胚胎注射不同质量浓度 Gln 对肉仔鸡早期肠道发育的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验药品: Gln, 由上海惠兴生化试剂公司提供。

主要器具: 超净工作台, 1 mL 无菌注射器, 灭菌打孔器, 酒精棉球[φ(乙醇)=75%, 下同], 酒

精灯,灭菌石蜡,孵化箱,育雏箱等。

1.2 试验动物与设计

选用已孵化 18 d 的肉仔鸡活胚蛋 240 枚,编号后随机分成 4 个处理组,每个处理 6 次重复,每重复 10 枚蛋。经照蛋确定羊膜腔的位置,碘酒消毒,酒精棉球脱碘后无菌注射。II、III、IV 组分别向鸡胚羊膜腔内注射质量浓度为 5、10、15 mg/mL 的 Gln 营养液 1 mL (营养液均用 7.5 mg/mL 生理盐水配制,配好后经孔径为 0.22 μm 无菌细菌滤器滤过除菌), I 组仅注射同等剂量 7.5 mg/mL 生理盐水作为对照。注射完毕后用灭菌石蜡密封蛋壳上的注射孔,再将胚蛋放入孵化器内,在 36.9 $^{\circ}\text{C}$ 及相对湿度为 68% 的条件下孵化,自然出雏。

1.3 饲养管理

对出壳雏鸡按组进行编号后,饲养在育雏笼内,雏鸡出壳后 2 h 同时开食,使用市售肉雏鸡全价配合饲料,自由采食和饮水,进行全天光照,舍内温度 32~35 $^{\circ}\text{C}$,湿度控制在 67% 左右。

1.4 测定指标

分别于出壳后 2 h 和 7 d (以出壳后 24 h 为 1 d),雏鸡经自由饮水,禁食 12 h,每个重复随机选取 1 只小鸡空腹称量后进行屠宰,迅速分离出十二指肠、空肠和回肠测量长度和质量,计算相对肠质量(肠质量/体质量),并取十二指肠(距幽门 1

cm 处),空肠(卵黄囊蒂前端 2 cm 处),回肠(回盲瓣前端 2 cm 处)各 1.5 cm^2 ,经生理盐水清洗内容物,贴于滤纸展平修剪,置体积分数为 10% 的中性福尔马林液中固定 24 h 以上。固定组织经脱水 \rightarrow 透明 \rightarrow 浸蜡 \rightarrow 包埋 \rightarrow 修块 \rightarrow 切片 \rightarrow 展开 \rightarrow 贴片等一系列处理后,用苏木精-伊红(H. E)染色制成组织切片,在 Olymps CX31 光学显微镜下,于每个部位的组织切片上,选取绒毛完整、走向平直的典型视野,用目镜测微尺测量 10 根绒毛的高度(VH)、相应的隐窝深度(CD),并计算绒毛高度与隐窝深度的比值(VH/CD)。

1.5 数据处理

采用 SPSS13.0 统计软件包对试验结果进行 ANOVA 方差分析和 Duncan's 多重比较($P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著),结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 胚胎注射 Gln 对肉仔鸡小肠生长发育的影响

胚胎注射 Gln 对出壳后 2 h 肉仔鸡小肠生长发育的影响见表 1。各试验组十二指肠、空肠及回肠的肠段长度、质量及相对质量比对照组有提高的趋势,但差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 胚胎注射 Gln 对肉仔鸡出壳 2 h 小肠生长发育的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Gln feeding in ovo on the intestinal development in 2h posthatch broiler

肠段 Location of intestine	指标 Parameter	处理 Treatment			
		I	II	III	IV
十二指肠 Duodenum	长度/cm Length	7.41 \pm 0.65	7.64 \pm 0.67	7.22 \pm 0.85	7.52 \pm 0.81
	质量/g Weight	0.31 \pm 0.03	0.31 \pm 0.02	0.33 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03
	相对质量/% Relative weight	0.65 \pm 0.10	0.67 \pm 0.06	0.70 \pm 0.08	0.67 \pm 0.08
空肠 Jejunum	长度/cm Length	13.45 \pm 0.82	13.29 \pm 1.15	14.03 \pm 0.90	13.64 \pm 0.91
	质量/g Weight	0.37 \pm 0.03	0.40 \pm 0.06	0.39 \pm 0.07	0.38 \pm 0.07
	相对质量/% Relative weight	0.77 \pm 0.05	0.84 \pm 0.10	0.83 \pm 0.10	0.80 \pm 0.17
回肠 Ileum	长度/cm Length	12.10 \pm 0.86	12.45 \pm 0.66	12.39 \pm 0.74	12.76 \pm 0.97
	质量/g Weight	0.31 \pm 0.03	0.30 \pm 0.06	0.34 \pm 0.07	0.33 \pm 0.08
	相对质量/% Relative weight	0.66 \pm 0.06	0.66 \pm 0.15	0.72 \pm 0.11	0.68 \pm 0.15

胚胎注射 Gln 对出壳 7 d 肉仔鸡小肠生长发育的影响见表 2。

对于十二指肠,IV 组肠段质量与相对质量比 I 组提高 9.59% 和 10.77%,差异显著($P < 0.05$),肠段长度各处理组差异不显著($P >$

0.05)。

对于空肠和回肠,II III 和 IV 组肠段长度、质量及相对质量均比 I 组有提高趋势,但差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 胚胎注射 Gln 对肉仔鸡小肠形态的影响

胚胎注射 Gln 对出壳 2 h 肉仔鸡小肠形态的影响见表 3。

对于十二指肠, 雏鸡隐窝尚未形成, III 组与 IV

组 VH 均比 I 组有所提高, 但 II 组 VH 与 I 组相比有所降低, 各处理组的 VH 差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 胚胎注射 Gln 对肉仔鸡出壳 7 d 小肠生长发育的影响

Table 2 Effects of Gln feeding in ovo on the intestinal development in 7 days posthatch broiler

肠段 Location of intestine	指标 Parameter	处理 Treatment			
		I	II	III	IV
十二指肠 Duodenum	长度/cm Length	15.95±1.20	15.44±1.84	16.02±1.67	16.45±1.16
	质量/g Weight	2.71±0.14 ^a	2.84±0.28 ^{ab}	2.76±0.15 ^{ab}	2.97±0.22 ^b
	相对质量/% Relative weight	1.95±0.12 ^a	2.04±0.18 ^{ac}	1.94±0.13 ^a	2.16±0.14 ^{bc}
空肠 Jejunum	长度/cm Length	35.45±2.13	35.59±2.95	36.65±3.83	37.47±2.33
	质量/g Weight	3.77±0.55	3.85±0.44	4.25±0.58	4.18±0.61
	相对质量/% Relative weight	2.71±0.48	2.75±0.27	3.00±0.51	3.05±0.49
回肠 Ileum	长度/cm Length	32.55±3.61	33.75±3.70	32.92±3.49	34.08±2.36
	质量/g Weight	3.41±0.37	3.44±0.45	3.82±0.44	3.60±0.57
	相对质量/% Relative weight	2.45±0.34	2.47±0.32	2.70±0.37	2.61±0.36

注: 同行同指标中, 肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

Note: Values followed different superscripts of small and capital letters within the same parameter in each row mean significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively, the same below.

对于空肠, III 组 VH 比 I 组提高 21.17%, 差异显著 ($P < 0.05$), II 组和 IV 组 VH 比 I 组有所提高 ($P > 0.05$); III 组 VH 比 I 组降低 17.05%, 差异显著 ($P < 0.05$), II 组和 IV 组比 I 组有所降低, 差异均不显著 ($P > 0.05$); III 组 VH/CD 比 I 组提高 45.70%, 差异极显著 ($P < 0.01$), II 组和 IV 组与 I 组相比有所提高, 差异均不显著 ($P > 0.05$)。

对于回肠, II、III、IV 组 VH 差异均不显著 ($P > 0.05$), 但它们较 I 组有提高的趋势; III 组 CD 比 I 组降低 14.45%, 差异显著 ($P < 0.05$), II 组和 IV 组与 I 组相比有所降低 ($P > 0.05$); II 组 VH/CD 比 I 组提高 21.85%, 差异显著 ($P < 0.05$), III 组和 IV 组均比 I 组有所提高, 差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 胚胎注射 Gln 对出壳 2 h 肉仔鸡小肠组织形态的影响

Table 3 Effects of Gln feeding in ovo on the intestinal morphology of 2 h posthatch broiler

肠段 Location of intestine	指标 Parameter	处理 Treatment			
		I	II	III	IV
十二指肠 Duodenum	绒毛高度 / μm Villus height	357.99±60.45	342.92±46.03	370.49±43.67	366.44±61.15
	隐窝深度 / μm Crypt depth				
	绒毛高/隐窝深 VH/CD				
空肠 Jejunum	绒毛高度 / μm Villus height	146.73±15.10 ^a	168.36±22.76 ^{ab}	177.80±18.92 ^b	159.29±22.05 ^{ab}
	隐窝深度 / μm Crypt depth	58.60±7.46 ^a	52.15±6.62 ^{ab}	48.61±7.58 ^b	55.22±8.33 ^{ab}
	绒毛高/隐窝深 VH/CD	2.56±0.56 ^{Aa}	3.31±0.87 ^{ab}	3.73±0.74 ^{Ba}	2.91±0.35 ^a
回肠 Ileum	绒毛高度 / μm Villus height	174.86±20.30	191.68±23.44	173.07±14.61	186.45±14.90
	隐窝深度 / μm Crypt depth	54.47±7.14 ^a	48.66±5.07 ^{ab}	46.60±6.18 ^b	48.13±3.98 ^{ab}
	绒毛高/隐窝深 VH/CD	3.25±0.53 ^a	3.96±0.46 ^b	3.78±0.67 ^{ab}	3.91±0.55 ^{ab}

胚胎注射 Gln 对出壳 7 d 肉仔鸡小肠形态的影响见表 4。

对于十二指肠, II、III 和 IV 组与 I 组 VH 差异不显著 ($P > 0.05$); IV 组 CD 比对照组降低 16.12%, 差异极显著 ($P < 0.01$), III 组比 I 组降低 12.57%, 差异显著 ($P < 0.05$); III 组和 IV 组 VH/CD 比 I 组分别提高 18.61% 和 21.27%, 差

异均为显著 ($P < 0.05$)。

对于空肠, II、III 和 IV 组与 I 组相比 VH 有提高的趋势 ($P > 0.05$); III 组 CD 比 I 组降低 13.62%, 差异极显著 ($P < 0.01$), IV 组比 I 组降低 10.68%, 差异显著 ($P < 0.05$); II 组和 III 组 VH/CD 与 I 组相比差异均极显著 ($P < 0.01$), 分别提高 23.90% 和 22.56%, II 组与 III 组差异显著

($P < 0.05$)。

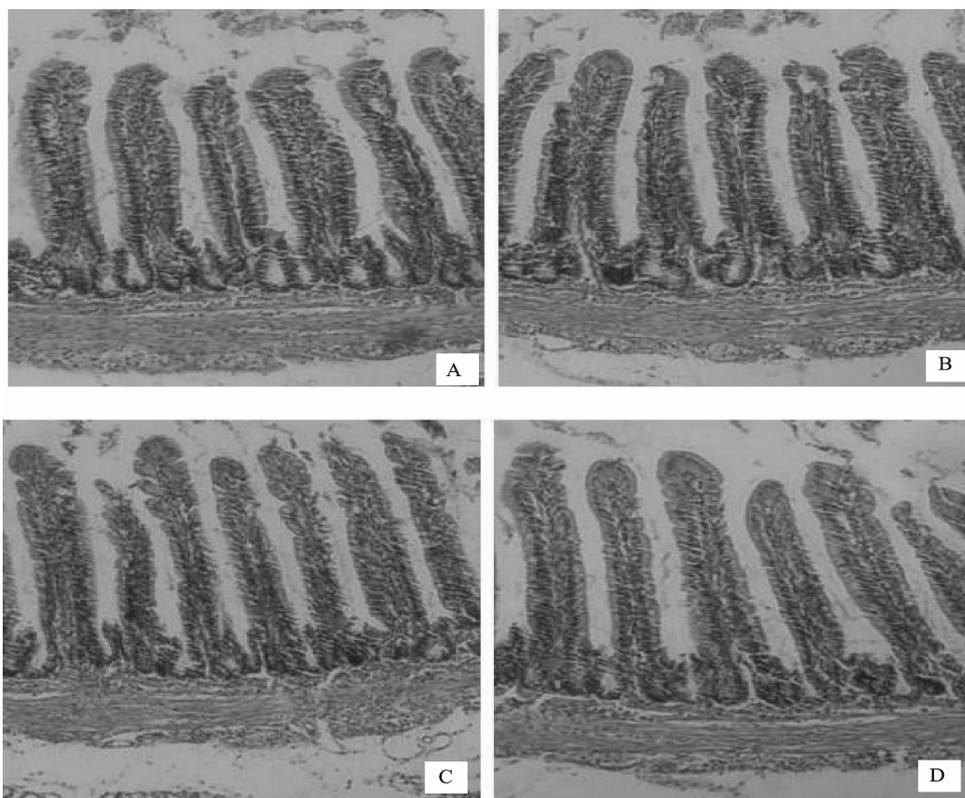
对于回肠(图 1), III 组 VH 比 I 组提高 13.88%, 差异显著($P < 0.05$); II 组和 IV 组 CD

比 I 组降低 16.43% 和 21.46%, 差异极显著($P < 0.01$); II 组和 IV 组 VH/CD 比 I 组提高 28.29% 和 39.71%, 差异极显著($P < 0.01$)。

表 4 胚胎注射 Gln 对出壳 7 d 肉仔鸡小肠组织形态的影响

Table 4 Effects of Gln feeding in ovo on the intestinal morphology of 7 days posthatch broiler

肠段 Location of intestine	指标 Parameter	处理 Treatment			
		I	II	III	IV
十二指肠 Duodenum	绒毛高度 / μm Villus height	926.26 \pm 103.44	924.55 \pm 87.74	948.07 \pm 87.60	936.54 \pm 67.22
	隐窝深度 / μm Crypt depth	110.76 \pm 12.24 ^{Aa}	102.55 \pm 6.12 ^{ab}	96.84 \pm 8.23 ^b	92.91 \pm 7.07 ^{Bb}
	绒毛高/隐窝深 VH/CD	8.37 \pm 0.56 ^a	9.02 \pm 0.72 ^{ab}	9.89 \pm 1.51 ^b	10.15 \pm 1.25 ^b
空肠 Jejunum	绒毛高度 / μm Villus height	492.57 \pm 45.26	517.15 \pm 45.83	523.91 \pm 32.60	541.11 \pm 59.82
	隐窝深度 / μm Crypt depth	94.50 \pm 6.67 ^{Aa}	90.42 \pm 7.83 ^{ab}	81.63 \pm 8.41 ^{Bb}	84.41 \pm 7.34 ^b
	绒毛高/隐窝深 VH/CD	5.23 \pm 0.53 ^{Aa}	5.75 \pm 0.61 ^{ac}	6.48 \pm 0.77 ^{Bb}	6.41 \pm 0.41 ^{Bc}
回肠 Ileum	绒毛高度 / μm Villus height	266.51 \pm 21.49 ^a	285.64 \pm 27.44 ^{ab}	303.50 \pm 25.41 ^b	291.40 \pm 16.33 ^{ab}
	隐窝深度 / μm Crypt depth	76.71 \pm 6.11 ^{Aa}	64.11 \pm 5.78 ^{Bb}	73.44 \pm 6.20 ^{ac}	60.25 \pm 7.37 ^B
	绒毛高/隐窝深 VH/CD	3.50 \pm 0.47 ^{Aa}	4.49 \pm 0.65 ^{Bb}	4.18 \pm 0.64 ^{ab}	4.89 \pm 0.55 ^{Bc}



A. 7 日龄 I 组回肠形态 I group ileum morphology of 7 days; B. 7 日龄 II 组回肠形态 II group ileum morphology of 7 days; C. 7 日龄 III 组回肠形态 III group ileum morphology of 7 days; D. 7 日龄 IV 组回肠形态 IV group ileum morphology of 7 days

图 1 胚胎注射 Gln 肉仔鸡 7 日龄回肠组织形态 (HE 100 \times)

Fig. 1 Effects of Gln feeding in ovo on the ileum morphology of 7 days posthatch broiler (HE 100 \times)

3 讨论与结论

家禽胚胎和幼雏的生长和发育取决于营养的消化和吸收, 而营养的消化和吸收与小肠的形态和功能直接相关。小肠上皮是一个复杂的系统, 在生长发育过程中, 随着基因表达上皮增殖细胞

不断地自我更新和分化^[2]。这一系统在决定出壳后肉仔鸡的发展潜力中具有重要的地位。胚蛋注射是将外源物质注射到家禽的胚蛋中, 胚蛋注射能促进家禽的肠道发育^[3]。有试验指出, 鸡胚蛋注射蛋白质和碳水化合物后的 48 h 内发育显著加速, 出壳时可达到与对照组鸡出壳后 2 d 相同的肠道发育水平, 这一结果表明鸡胚注射可通过

启动出壳前肠道的发育来加速鸡的早期生长和成活^[4]。

Gln不仅是肠黏膜的供能物质,还是细胞蛋白质、核酸及氧化型辅酶 II(NAD(P)⁺)等物质合成的前体和促进剂^[5]。Gln作为胃肠道粘膜细胞的特殊营养物质,可保持小肠粘膜结构和功能的完整性,增加小肠粘膜质量和DNA含量^[6]。多项研究表明Gln能促进家禽早期肠道发育,但其作用机制目前尚未完全清楚,可能的机制有:①由Gln代谢产生的鸟氨酸是多胺合成的重要前体,多胺在肠道细胞的增殖分化,受损肠上皮的修复等过程中具有重要的作用^[7];②Gln作为肠道主要能量来源,维持许多代谢过程顺利进行^[8];③由Gln代谢产生的精氨酸可作为一氧化氮合成的前体,一氧化氮在调控肠道的分泌及完整性等方面扮演着重要角色^[9]。

肉仔鸡肠道发育的状况可以用绒毛高度(VH)、隐窝深度(CD)及绒毛高度与隐窝深度的比值(VH/CD)来衡量。绒毛高度(VH)与其肠上皮细胞数量呈显著正相关,当绒毛高时,肠上皮细胞数量增多,对养分的吸收能力也会提高。隐窝深度(CD)可以衡量细胞从隐窝基部向绒毛端部迁移、分化的水平,以补充绒毛上皮正常脱落的细胞,在功能上影响消化吸收机能。绒毛高度与隐窝深度的比值(VH/CD)可以反映小肠的功能状态,黏膜及消化吸收功能,比值上升,则黏膜改善,消化吸收功能增强,生长发育加快^[10]。

本研究结果表明,通过向胚蛋内注射不同质量浓度的Gln溶液,对肉仔鸡早期小肠生长均能起到一定的促进作用,不同程度地提高肠黏膜的VH,降低CD,并提高VH/CD,说明胚胎注射Gln可以促进肉仔鸡早期小肠黏膜形态学的发育,使其具有更完善的肠道系统。但促进作用的大小因营养液质量浓度、观察时间以及肠段不同而有所差异。从时间来看,7 d时的作用效果较出壳2 h明显,这可能与注射后作用时间的长短有关。从注射Gln的质量浓度看,Ⅲ组和Ⅳ组较Ⅱ组作用效果明显,这与张敏等从饲料中添加Gln的研究结果一致。从不同肠段看,Gln均能

对肠黏膜形态发育起到促进作用,但回肠效果较十二指肠和空肠明显,这与戴四发等的研究结论一致,说明回肠对Gln的吸收能力和利用率比其他肠段高。也有可能是部分Gln扩散进入卵黄囊,随卵黄由卵黄蒂进入小肠下行至回肠,从而增强了对回肠段的作用效果。也有研究者指出,可能与该肠段中Gln酶的水平及不同肠段具有不同数量、形态结构及功能的细胞有关。

目前,通过在出壳后肉仔鸡饲料中添加Gln的试验研究表明,随着肉仔鸡肠道黏膜完整性和生理功能的逐步完善,以及体内Gln分泌量的增多,Gln的作用效果越来越不明显。所以,本试验将Gln的添加时间提前到了孵化后期,将Gln营养液注射到胚蛋羊膜腔中,通过鸡胚发育后期口腔对羊水的吞食而将Gln摄入肠道,从而提前发挥其促进小肠发育的作用。

参考文献:

- [1] 戴四发,李有志,李如兰,等.外源性谷氨酰胺对肉仔鸡空肠形态结构的影响[J].畜牧兽医学报,2005,36(1):100-104.
- [2] 师昆景,谭荣炳,吴灵英.胚胎注射L-精氨酸和L-鸟氨酸对肉仔鸡早期肠道发育的影响[J].中国畜牧杂志,2009,45(1):24-28.
- [3] 刘梅英,陈伟,彭鹏,等.胚蛋注射在家禽营养中的研究进展[J].中国家禽,2007,29(21):40-42.
- [4] Ferket P R, Uni Z. Gastrointestinal development at hatch[J]. Maryland Nutri Con,2003,21:342-346.
- [5] Lacey J M, Wilmore D W. Is glutamine a conditionally essential amino acid[J]. Nutr rev,1990,48:297.
- [6] 陈静,刘显军,边连全,等.谷氨酰胺对早期断奶仔猪生长性能和免疫性能的影响[J].西北农业学报,2006,15(4):58-62.
- [7] Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism[J]. Journal of Nutrition,1998,128:1249-1252.
- [8] Thompson J C. Humoral control of gut function[J]. Am J Surg,1991,161(1):6-18.
- [9] 孙科,邹晓庭,乔云芳.外源谷氨酰胺对肉仔鸡生长性能和小肠形态结构的影响[J].中国饲料,2008,2:15-18.
- [10] 张敏,邹晓庭,孙雅丽.外源性谷氨酰胺对艾维茵肉仔鸡生长性能和小肠发育的影响[J].中国畜牧杂志,2009,45(9):32-36.