

不同处理下蛋青鸡血浆游离Leu比放射性活度的变化^{*}

孟德连, 姚军虎, 杨公社, 吕金印, 吴孝兵, 刘 军

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 在绝食、强饲无氮日粮(NFD)、CP20%(豆粕组)、CP20%(棉粕组)4种处理下,给蛋青鸡每公斤体重静脉一次注射 $1\ 110\text{ MBq }[^3\text{H}]\text{Leu}$,分别于注射后5 min, 30 min, 4 h, 24 h, 36 h, 48 h翅静脉采血,测定各时间点去蛋白血浆游离Leu浓度和比放射性活度。结果表明,去蛋白血浆中游离Leu浓度绝食组和NFD组显著低于豆粕组和棉粕组($P < 0.05$);血浆游离Leu的比放射性活度(SRp),以NFD组与绝食组相近,且较高,棉粕组最低,但4种处理间无显著差异($P > 0.05$)。血浆游离Leu比放射性活度呈显著的指数衰变规律($P < 0.05$)。

[关键词] 血浆游离Leu; 比放射性活度; 蛋青鸡

[中图分类号] S816 72

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0047-05

配合日粮采用可消化氨基酸(DAA)含量,比采用总氨基酸(TAA)含量指标更能准确满足家禽的氨基酸(AA)需要。当日粮中含有难消化、加工不当或含抗营养因子的蛋白质饲料时,DAA指标体系的优越性更明显。内源氨基酸损失量的校正是DAA平衡日粮必须解决的问题。常用饲料中DAA含量受制因素多,致使公布的饲料AA消化率差异大,从而限制了DAA指标体系在饲养生产中大面积推广应用。确定排泄物中内源氨基酸含量是评价饲料AA消化率,度量动物AA需要量的基础。因此,寻求更方便的方法估测排泄物中内源氨基酸含量,具有重要的实用价值。本研究应用标记亮氨酸探索动物体内的AA代谢规律,为确定排泄物中内源氨基酸含量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验分组与饲喂

选择体重接近(1.5 kg左右)的健康尼克红蛋青鸡24只,随机分为4个处理,每处理3个重复,每重复2只鸡。除绝食组(FAS)外,设计强饲无氮日粮(NFD)、CP20%(豆粕组)和CP20%(棉粕组)3种饲料(表1)。试验鸡肛门处缝制空心塑料瓶盖,以安装集粪袋。试验鸡单笼饲喂。预试前自

由采食以豆粕为惟一氮源的半合成饲料5 d,绝食36 h。然后,除绝食组外,按每公斤体重30 g干物质预强饲相应饲料,绝食48 h,然后正式强饲同样数量的相应日粮。绝食组预绝食48 h后,进入正式绝食期(48 h)。整个绝食期间,试验鸡自由饮水,每天16 h光照。

1.2 试验处理与样品预处理

正式绝食及正式强饲后,立即按每公斤体重静脉注射 $1\ 110\text{ MBq }[^3\text{H}]\text{Leu}$ (1 mL)。分别在注射后5 min, 30 min, 4 h, 24 h, 36 h, 48 h在对侧翅静脉采集血液(1.5~2.0 mL/次),装入经抗凝处理的离心管内,全血经 $3\ 000\text{ r/min}$ 离心10 min,分离出血浆,弃沉淀。血浆按体积比1:1加入体积分数10%三氯乙酸(TCA),再离心10 min,弃沉淀,得到去蛋白血浆样品,低温(-20℃)密封保存。

1.3 化学分析及放射性测定

准确移取去蛋白血浆样品0.5 mL于试管中,加入 6 mol/L HCl 8 mL,封管110℃水解22 h,将水解液于坩埚中蒸干,然后加入柠檬酸钠的乙醇溶液3 mL,溶解坩埚中的残渣;将溶解液移至离心管中,经 $3\ 000\text{ r/min}$ 离心5 min,用Beckman 121MB型氨基酸分析仪测定AA含量。

准确量取去蛋白血浆2 mL,按样品(mL)高

* [收稿日期] 2001-12-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970550)

[作者简介] 孟德连(1975-),男,湖南张家界人,助教,在读博士,主要从事动物营养理论研究。

氯酸 (mL, 分析纯) H_2O_2 (mL, 分析纯) = 1
4 6 的比例于带塞三角瓶内消化上述样品 (75~ 80
) , 5 h 后准确吸取上述消化液 0 2 mL 于闪烁瓶
内, 加入 8 mL 闪烁液 (质量分数 0 6% 的对联三
苯的二甲苯溶液) 和适量的乳化剂 (聚乙二醇辛基
苯基醚, OP), 拧紧瓶盖, 摇匀后静置 24 h, 用 Tri-
CARB 2000CA 液体闪烁分析仪 (Packard, USA) 计

数, 用外标准源进行淬灭校正, 每种消化液做 2 个
样品重复测定。

1 4 资料处理

利用 SPSS 软件包对去蛋白血浆各时间点的比
放射性活度 (SR) 作回归拟合分析, 并对血浆比放
射性活度的衰变曲线进行定积分。

表 1 试验饲料组成

Table 1 Composition of the experimental diets														%
饲料 Item	淀粉 Starch	豆粕 Soybean meal	棉粕 Cotton- seed meal	蔗糖 Sugar	菜油 Rape- seed oil	纸纤维 Paper fiber	磷酸氢钙 CaHPO ₃	碳酸钙 CaCO ₃	食盐 Salt	禽用多维 Vitamin premix	微量元素 Trace elements	氯化胆碱 Choline chloride		
NFD	59 98	-	-	31 45	-	4 20	2 22	1 22	0 30	0 03	0 50	0 10		
CP20% (豆粕 Soybean meal)	46 18	46 51	-	-	2 60	1 41	1 37	1 00	0 30	0 03	0 50	0 10		
CP20% (棉粕 Cottonseed meal)	44 70	-	47 60	-	4 32	-	1 30	1 15	0 30	0 03	0 50	0 10		

注: (1) 所有饲料按代谢能 12 30 MJ/kg, Ca 0 96%, 有效磷 0 38%, 粗纤维 4 2% 的标准配制。(2) 禽用多维 (每 kg) V_A 5
 6×10^6 IU, V_{D_3} 1 1×10^6 IU, V_E 30 kIU, V_{K_3} 5 g, V_{B_1} 2 g, V_{B_2} 12 g, V_{B_6} 6 g, $\text{V}_{B_{12}}$ 30 mg, 叶酸 500 mg, 烟酸 35 g 及泛酸钙 25 g。
(3) 微量元素中 (每 kg) Fe 16 2 g, Cu 1 64 g, Mn 12 09 g, Zn 8 11 g, Se 33 53 mg 及 I 75 70 mg。

Note: (1) All diets contained ME 12 30 MJ/kg, Ca 0 96%, effective phosphorus 0 38%, crude fiber 4 2%. (2) The vitamin premix
contained (per kg): V_A 5 6×10^6 IU, V_{D_3} 1 1×10^6 IU, V_E 3 10^4 IU, V_{K_3} 5 g, V_{B_1} 2 g, V_{B_2} 12 g, V_{B_6} 6 g, $\text{V}_{B_{12}}$ 30 mg, Folic acid 500
mg, Nicotinic acid 35 g and Calcium pantothenate 25 g (3) The trace mineral premix contained (per kg) Fe 16 2 g, Cu 1 64 g, Mn 12 09
g, Zn 8 11 g, Se 33 53 mg and I 75 70 mg

2 结果与分析

2 1 血浆放射性强度的变化

4 种不同饲料处理, 同一时间点血浆放射性活
度无明显差异 ($P > 0 05$, 见表 2)。将 4 种处理进

行合并回归拟合, 血浆放射性活度呈如下指数衰变
规律:

$$y = 5 054 34e^{-0 013 3 t}, (r^2 = 0 885, n = 24, p = 0 001)$$

式中, y 为血浆放射性活度, t 为时间 (h)。

表 2 血浆放射性活度的变化

Table 2 Radioactivity changes of free Leucine in plasma																		Bq/mL
饲料 Diet	时间/h Time																	
	0 083	0 5	4	24	36	48												
NFD	84 93 ± 3 80	77 93 ± 2 47	71 55 ± 2 28	57 87 ± 1 72	42 63 ± 2 80	32 43 ± 2 50												
FAS	82 65 ± 1 92	76 05 ± 3 18	67 13 ± 2 58	54 55 ± 1 57	44 88 ± 4 05	31 67 ± 2 30												
CP20% (豆粕组 Soybean meal)	98 82 ± 7 35	91 40 ± 4 27	74 45 ± 4 22	66 82 ± 4 08	53 92 ± 2 55	33 53 ± 2 97												
CP20% (棉粕组 Cottonseed meal)	91 32 ± 6 37	83 52 ± 5 18	72 60 ± 4 00	16 67 ± 2 97	352 75 ± 2 90	32 08 ± 2 08												

注: (1) 表中数据为 $\bar{x} \pm \text{Se}$ ($n = 6$); (2) 各时间点 3 次重复, 每重复 2 只鸡; (3) 同一时间点的放射性活度差异不显著 ($P > 0 05$)。
Note: (1) Mean $\pm$ standard error ($n = 6$); (2) 3 duplications in every timepoint and 2 hens per duplication; (3) Radioactivities of the same
timepoint do not differ significantly ($P > 0 05$).

2 2 血浆游离 Leu 的变化

血浆游离 Leu 质量浓度 (表 3) 随时间具有相似
的变化规律。强饲后, 饲料蛋白质被逐渐消化吸收,

血浆游离 Leu 质量浓度不断升高, 随着时间的延
长, 饲料蛋白质消化完全后, 血浆游离 Leu 质量浓
度又开始下降。同一时间点不同处理间比较, 前 3 个

时间点以棉粕组的L eu 质量浓度最高, 后 3 个时间 饲料蛋白质被消化吸收的阶段, 因此, 血浆游离L eu
点以豆粕组的浓度最高。在 0 5~ 24 h 内, 正处于 质量浓度受饲料的影响较大。

表 3 血浆游离L eu 质量浓度的变化

Table 3 Concentration changes of free L eu c i n p l a s m a																	mg/L	
饲料 Diet	时间/h Time																	
	0		083		0		5		4		24		36		48			
NFD	32	12 ± 3	49 a	36	65 ± 5	00 ab	41	47 ± 3	10 b	50	37 ± 6	39 ab	50	17 ± 6	89 a	44	76 ± 5	69 a
FAS	31	80 ± 2	97 a	32	43 ± 3	01 b	39	52 ± 2	70 b	46	90 ± 5	25 b	51	68 ± 3	61 a	40	80 ± 4	64 a
CP20% (豆粕组 Soysean meal)	32	88 ± 3	60 a	40	59 ± 4	20 ab	69	61 ± 5	32 a	64	60 ± 3	68 a	63	57 ± 7	63 a	49	12 ± 4	65 a
CP20% (棉粕组 Cottonseed meal)	38	23 ± 5	06 a	49	17 ± 3	29 a	70	61 ± 3	38 a	63	12 ± 6	97 a	58	78 ± 1	33 a	39	60 ± 4	21 a

注: (1) 表中数据为 $\bar{x} \pm Se$ ($n = 6$); (2) 同列数据不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。
Note: (1) Mean $\pm$ standard error ($n = 6$); (2) In the same column, figures with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

2 3 血浆游离 leu 比放射性活度的变化 性活度无显著差异 ($P > 0.05$, 见表 4), 并随采血
不同处理间同一时间点血浆游离L eu 比放射 时间推移呈逐渐减少之趋势。

表 4 血浆游离L eu 比放射性活度的变化

Table 4 Specific radioactivity of free L e u c i n e i n p l a s m a																Bq/μmol		
饲料 Diet	时间/h Time																	
	0		083		4		5		24		36		48					
NFD	346	67 ± 77	33	278	83 ± 72	00	226	17 ± 65	17	150	67 ± 56	83	113	33 ± 47	83	95	00 ± 33	67
FAS	340	83 ± 75	17	307	50 ± 67	67	222	67 ± 61	17	152	50 ± 56	33	113	83 ± 52	00	101	83 ± 29	67
CP20% (豆粕组 Soybean meal)	328	67 ± 96	67	271	83 ± 87	50	140	17 ± 78	83	135	67 ± 73	67	111	67 ± 65	50	89	50 ± 30	83
CP20% (棉粕组 Cottonseed meal)	313	17 ± 89	17	222	67 ± 78	83	134	83 ± 73	00	134	00 ± 63	83	117	67 ± 55	17	106	17 ± 35	33

注: 各时间点不同处理间差异均不显著 ($P > 0.05$)。
Note: In the same timepoint, values do not differ significantly ($P > 0.05$).

回归分析表明, 血浆游离L eu 比放射性活度呈 绝食组的衰变曲线相近, 豆粕与棉粕组的衰变曲线
显著 ($p = 0.0094 \sim 0.0371$) 的指数衰变规律 相近(表 5)。
(衰变函数见表 5), 符合一室模型, 同时, N F D 和

表 5 4 种处理血浆游离L eu 比放射性活度的回归分析 ($n = 6$)

Table 5 Regression analysis of specific radioactivity of free L eu c i n p l a s m a							
饲料 D i e t	回归公式 Regression equation	S_{yt}	P_1	P_2	差异性 Significance		
					SR ₀	K	
N F D	$y = 6.6375e^{-0.0104t}$	0.3120	0.0217	0.0107	A	A	
F A S	$y = 6.7603e^{-0.0101t}$	0.2790	0.0162	0.0094	A	A	
CP20% (豆粕组 Soybean meal)	$y = 5.6939e^{-0.0068t}$	0.1690	0.0330	0.0314	AB	B	
CP20% (棉粕组 Cottonseed meal)	$y = 5.4461e^{-0.0069t}$	0.2750	0.046	0.0371	B	B	

注: (1) 公式中 y 为血浆游离L eu 比放射性活度 ($Bq/\mu mol$), t 为时间 (h); (2) S_{yt} 为回归估计标准误; (3) P_1 , P_2 分别为起始比放射性活度 SR_0 及血浆游离L eu 更新速率常数 (K) 的显著性标准; (4) 差异性分别列出 SR_0 值和 K 值的差异性比较, 同列标不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: (1) y in regression equations means specific radioactivity of L eu c i n p l a s m a ($Bq/\mu mol$), and t the time at blood sampling (h). (2) S_{yt} means standard error of estimate of the regression equation. (3) P_1 and P_2 represent probabilities of significance of initial specific radioactivity (SR_0) and regression rate constant (K) of free L eu c i n p l a s m a, respectively. (4) In the column of significance, different letters differ significantly ($P < 0.05$).

4 种处理血浆放射性活度之均值间无显著差异 ($P > 0.05$), N F D 和绝食组血浆游离L eu 质量浓度

显著高于豆粕组和棉粕组 ($P < 0.05$), 5 min~ 48 h 血浆比放射性活度定积分值 4 种处理间无显著差异 ($P > 0.05$) (表 6)。

h 血浆比放射性活度定积分值 4 种处理间无显著差

表 6 4 种处理血浆指标的比较

Table 6 Comparison of plasma index at 4 different treatments

处理 Treatment	放射性活度/ (Bq · mL ⁻¹) Radioactivity	血浆游离 Leu 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of free Leucine in plasma	比放射性活度定积分值/ (Bq · μmol ⁻¹) Definite integral SR _P
NFD	61.22 ± 26.92 a	42.51 ± 8.32 a	8350.84 ± 716.67 a
FAS	59.49 ± 18.13 a	40.50 ± 8.16 a	8550.53 ± 783.33 a
CP20% (豆粕组 Soybean meal)	68.60 ± 21.18 a	52.53 ± 13.94 b	7750.87 ± 666.67 a
CP20% (棉粕组 Cottonseed meal)	66.59 ± 20.41 a	53.77 ± 13.45 b	7583.33 ± 433.33 a

注: (1) 表中数据为 $\bar{x} \pm Se$ ($n = 6$); (2) 表中数据前两列为 6 个采血时间点之平均数, 第 3 列为定积分值。
Note: (1) Mean $\pm$ standard error ($n = 6$); (2) The data in the former two columns are means of six sampling timepoints, the third column is definite integral SR.

3 讨论

3.1 不同处理对血浆游离 Leu 质量浓度的影响

姚军虎等^[1]试验表明, 强饲 NFD, CP 5% 和 CP 20% 3 种饲料时, 血浆游离 Leu 加权质量浓度分别为 43.71, 51.18 和 69.30 μmol/mL。本研究表明, 4 种不同处理血浆游离 Leu 浓度 (μmol/L) 因强饲饲料及采血时间而异, 但其变化规律十分接近; 其加权浓度分别为: 绝食组 35.77 μmol/mL, NFD 组 38.41 μmol/mL, 棉粕组 49.00 μmol/mL, 豆粕组 49.25 μmol/mL。随着饲料 CP 或 AA 水平增加, 当饲料中的营养物质吸收后, 血浆中游离 AA 浓度随之增加; 而棉粕中 AA 组成不平衡, 外加含有抗营养因子, 影响了 AA 的吸收, 所以, 豆粕组的血浆中游离 Leu 浓度比棉粕组高, 但这两种处理的结果比其余两种处理要高得多。强饲 4, 24 h 后, 吸收高峰已过, 血浆游离 Leu 浓度开始下降; 36, 48 h 体蛋白质降解加强, 血浆 Leu 浓度升高。Wykes 等^[2]的试验也发现, 饲料及采血时间对血浆游离 Leu 浓度有与本试验相类似的影响。因此, 各饲料间血浆游离 Leu 浓度及其变化趋势接近。

3.2 不同处理对血浆游离 Leu 比放射性活度的影响

根据同位素示踪原理, 同位素的放射性强度随时间的延长呈指数衰变规律, 而本研究中血浆游离 Leu 浓度的变化规律十分接近, 因此, 4 种不同处理

的比放射性活度的变化规律也相似。

随着采食后时间的延长, 饲料蛋白质的消化吸收, 肠上皮从肠道中吸收 AA 的数量, 随肠道中 AA 水平 (即饲料水平) 的增加而增加, 由肠上皮进入肠腔的未标记内源 AA 数量随之增加。随着饲料 CP 或 AA 水平增加, 分泌进入肠腔的内源 AA 增加^[3~5]。肠上皮细胞从肠道中吸收的这部分 AA 可不进入整体血液循环系统而重新作为内源蛋白质分泌进入肠腔^[6]。另外, 肠上皮具有很强的合成蛋白质的能力^[7,8]。肠壁进入肠道的内源蛋白质中未标记 AA 的稀释作用, 使内源蛋白质中比放射性活度低于血浆前体池的比放射性活度^[9]。可见, 从肠道合成角度, 若以血浆比放射性活度代表内源蛋白质比放射性强度, 可能会低估内源蛋白质排泄量^[7,8,10~12]。

4 结论

- 1) 去蛋白血浆中游离 Leu 浓度以绝食组和 NFD 组较高 ($P < 0.05$), 豆粕组和棉粕组较低 ($P < 0.05$)。
- 2) 血浆游离 Leu 的比放射性活度 (SR_P), 以 NFD 组与绝食组相近, 且较高, 棉粕组最低, 但 4 种处理间无显著差异 ($P > 0.05$)。
- 3) 一次注射标记 Leu 后, 4 种处理下血浆游离 Leu 比放射性活度呈显著的指数衰变规律, 符合一室模型曲线。

[参考文献]

[1] 姚军虎, 王康宁, 宋代军. 肉仔鸡血浆游离氨基酸浓度变化规律研究 [J]. 西北农业大学学报, 1999, (6): 97-101.
[2] Wykes L J, Fierotto M, Burrin D G, et al. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- malnutrition [J]. J Nutr, 1996, 126: 1481- 1488
- [3] Snook J T. Protein digestion nutritional and metabolic considerations [J]. Wld Rev Nutr Dietetics, 1973, 18: 121- 176
- [4] Moughan P J, Rutherford S M. Endogenous flow of total lysine and other amino acids at the distal L eum of the protein or peptide-fed rat: the chemical labeling of gelatin protein by transformation of lysine to homoarginine [J]. J Sci Food Agric, 1990, 52: 179- 192
- [5] Bergner H, Drochner W, Bartelt J. Secretion of endogenous protein in dependence of the protein and fiber intake of ^{15}N labeled pigs [J]. 11th Int Symp Dig Physiol in Pigs [J]. Bad Doberan, 1994, 4- 6th Oct: 11- 13
- [6] Alpers D H, Their S O. Role of the free amino acid pool of the intestine in the protein synthesis [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 1972, 262: 535- 545
- [7] De Lange C F M, Souffrant W B, Sauer W C. Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the ^{15}N -isotope dilution technique [J]. J Anim Sci, 1990, 68: 409- 418
- [8] Lien K A, Sauer W C, Mosenthin R, et al. Evaluation of the ^{15}N -isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: effect of dilution in the precursor pool for endogenous nitrogen secretion [J]. J Anim Sci, 1997, 75: 148- 158
- [9] Souffrant W B, Darcy-vrillon B, Corring T, et al. Recycling of endogenous nitrogen in the pig (preliminary results of a collaborative study) [J]. Arch Anim Nutr, 1986, 36: 269- 274
- [10] Lien K A, Sauer W C, Mosenthin R, et al. Evaluation of the ^{15}N -isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: effect of dilution in the precursor pool for endogenous nitrogen secretion [J]. J Anim Sci, 1997, 75: 148- 158
- [11] Reeds P J, Fjeld C R, Jahoor F. Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states [J]. J Nutr, 1994, 124: 904
- [12] Souffrant W B, Darcy-vrillon B, Corring T, et al. Recycling of endogenous nitrogen in the pig (preliminary results of a collaborative study) [J]. Arch Anim Nutr, 1986, 36: 269- 274

Change regularity of special radioactivities of plasma free L eucine under four different treatments

MENG De-lian, YAO Jun-hu, YANG Gong-she, LU Jin-yin, WU Xiao-bin, LIU Jun

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Twenty four young hens (1.5 kg of body weight, BW) were randomly divided into 4 groups. Every group was diet free (FAS) or force-fed a nitrogen-free diet (NFD) or the diet with 20% crude protein in which soybean meal or cottonseed meal was the sole nitrogen source (30 g DM/kg BW). $1100\text{ MBq}^3\text{H-L eucine/kg BW}$ was intravenously injected into all birds just after force-fed or on-fasting. Venous blood samples were taken at 5 min, 30 min, 4 h, 24 h, 36 h and 48 h after injection. Special radioactivities of non-protein plasma at every timepoint are measured. The study showed that concentrations of free L eucine in plasma of FAS and NFD were significantly lower than that of CP 20% (soybean meal) and CP 20% (cottonseed meal) ($P < 0.05$). Specific radioactivities of free L eucine in plasma in NFD and FAS were similar and higher and that of CP 20% (cottonseed meal) was the lowest, but there was no significant difference between four kinds of treatments ($P > 0.05$). Specific radioactivity of free L eucine in plasma complied with significantly exponential function ($P < 0.05$).

Key words: free L eucine in plasma; special radioactivity; young hens