

网络出版时间:2020-08-13 13:48 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.02.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1109.003.html

高蛋白饲料对肉鸡肾氧化损伤及黄嘌呤氧化酶基因 mRNA 表达量的影响

赵 杰,徐静茹,曹 利,朱 雷,刘明达,冯士彬,李 玉,
李锦春,吴金节,王希春

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

[摘 要] **【目的】**研究高蛋白饲料对肉鸡肾氧化损伤及黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)的影响。**【方法】**选取 120 羽 20 日龄健康白羽肉杂鸡,随机分为 4 组,每组 5 个重复,每个重复 6 羽。对照组饲喂基础饲料(蛋白质含 190 g/kg),试验组饲喂在基础饲料中添加豆粕使粗蛋白含量分别达到 220,250,280 g/kg 的饲料。试验期为 14 d。于试验第 0,7 和 14 天,分别从每组随机选取 5 羽鸡经翅下静脉采血,分离血清,用于肾功能(血清钙(Ca)、肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、尿酸(UA)、血清磷(P)、镁(Mg)含量)、脂质过氧化(血清丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、羟自由基($\cdot$ OH)含量和总抗氧化力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性)及 XOD 活性检测。试验结束时,每组选 5 羽鸡进行解剖,取肾脏组织,用于检测 XOD 基因 mRNA 的表达量。**【结果】**1)与对照组相比,各高蛋白饲料组肉鸡血清 Ca、CREA、BUN、UA 含量显著或极显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清 P、Mg 含量变化不显著($P>0.05$)。2)与对照组相比,各高蛋白饲料组肉鸡血清 MDA、NO、 $\cdot$ OH 含量显著或极显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),T-AOC、GSH-Px、SOD 活性显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。3)与对照组相比,各高蛋白饲料组 XOD 活性显著升高($P<0.05$),肾组织 XOD mRNA 表达量显著增加($P<0.05$)。**【结论】**高蛋白饲料可改变肉鸡肾功能与脂质过氧化,导致血清 XOD 活性以及肾组织 XOD mRNA 表达量升高,导致鸡肾脏损伤。

[关键词] 高蛋白饲料;肉鸡;肾功能;脂质过氧化;黄嘌呤氧化酶

[中图分类号] S831.92 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2021)02-0001-07

Effects of high protein diet on renal oxidative damage and mRNA expression of xanthine oxidase gene in broilers

ZHAO Jie,XU Jingru,CAO Li,ZHU Lei,LIU Mingda,FENG Shibin,LI Yu,
LI Jinchun,WU Jinjie,WANG Xichun

(College of Animal Science and Technology,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China)

Abstract: **【Objective】**The aim of this experiment was to study the effects of high protein diet on renal function, lipid peroxidation and xanthine oxidase (XOD) in broilers. **【Method】**One hundred and twenty white-feathered broilers at the age of 20-day-old were randomly divided into four groups with 5 repeats each group and 6 feathers each repeat. The control group was fed on a basic diet with protein content of 190 g/kg,while the experimental groups were fed on a diet with soybean meal added to the basal diet for crude protein contents of 220,250 and 280 g/kg,respectively. The trial was conducted for 14 days. In days 0,7

[收稿日期] 2020-02-21
[基金项目] 国家重点研发计划项目(2016YFD0501205);安徽省重点研究与开发计划项目(1804a07020135)
[作者简介] 赵 杰(1997—),女,河南安阳人,在读硕士,主要从事畜禽营养代谢与中毒病研究。E-mail:1239350752@qq.com
[通信作者] 王希春(1978—),男,安徽利辛人,教授,硕士生导师,主要从事畜禽营养代谢与中毒病研究。
E-mail:wangxichun@aahu.edu.cn

and 14,5 feathers from each group were randomly selected and blood samples were collected from the sub-wing vein to separate serum. Then, renal function (serum calcium (Ca), creatinine (CREA), urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), serum phosphorus (P) and magnesium (Mg) contents), lipid peroxidation (serum malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) contents and total antioxidant (T-AOC), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities) and XOD activity were determined. At the end of the experiment, 5 feathers were randomly selected from each group for dissecting, and kidney tissues were taken to detect expression of *XOD* gene mRNA. 【Result】 1) Compared with the control group, serum contents of Ca, CREA, BUN and UA in each high protein diet group had significant or extremely significant increase ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the changes in P and Mg were insignificant ($P > 0.05$). 2) Compared with the control group, contents of MDA, NO and $\cdot\text{OH}$ in serum of high protein diet groups were increased significantly or extremely significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while activities of T-AOC, GSH-PX and SOD were significantly or extremely significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 3) Compared with the control group, XOD activity in each high protein diet group was significantly higher ($P < 0.05$), and expression level of *XOD* mRNA in renal tissue of high protein group was significantly increased ($P < 0.05$). 【Conclusion】 High protein diet can change renal function and lipid peroxidation of broilers, leading to increase of XOD activity and expression of *XOD* mRNA in renal tissue and causing renal damage to chickens.

Key words: high protein diet; broiler; renal function; lipid peroxidation; xanthine oxidase

蛋白质是维持动物机体的物质基础,在动物体内蛋白质的含量处于动态平衡状态,并不是恒定不变的。已有研究表明,饲料中蛋白质含量会直接影响家禽的健康和生产性能,由于家禽缺乏精氨酸酶,不能将代谢过程中生成的氨转变为尿素,因此蛋白质的代谢只能通过嘌呤核苷酸合成与分解途径进行,最终生成尿酸随尿液排出体外^[1-2]。因此家禽摄入的蛋白质过多,会对其机体造成损伤,饲料中添加过多的动物内脏、肉骨粉、鱼粉等动物性蛋白和大豆、蘑菇等植物性蛋白可以诱发禽类高尿酸血症^[3-4]。肾是泌尿系统重要的组成器官,负责将血液中的杂质及有害物质过滤排出体外,肾脏一旦出现问題,会使机体内的有毒物质滞留在体内,存在很大隐患^[5-6]。家禽的肾脏疾病可造成养禽业较大的经济损失,尤其是禽痛风,目前尚无有效的治疗方法^[7]。肾脏原发性损伤是痛风的发病基础,并且会引起机体氧化损伤和相关基因黄嘌呤氧化酶(XOD)表达紊乱^[8-9]。适量自由基可以发挥正常的生理作用,但是过量自由基会对机体产生毒副作用,影响动物机体的代谢及基因表达^[10-11]。

由于禽痛风发生时肾脏功能变化明显,从而确立了肾脏在痛风发生中的主导地位,甚至有些报道将禽痛风又称为禽肾功能衰竭。但是禽类肾功能异常与机体脂质过氧化及 *XOD* 基因表达量之间的相关性研究较少。为此,本试验探讨了高蛋白饲料对

白羽肉鸡肾脏功能、脂质过氧化及 *XOD* 基因 mRNA 表达量的影响,以期为高蛋白饲料引起肉鸡肾损伤的发病机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 健康的 817 白羽肉杂鸡 120 羽(20 日龄),由安徽省宣城市宣城木子禽业专业合作社提供。

1.1.2 试剂及仪器 丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、总抗氧化力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和黄嘌呤氧化酶(XOD)ELISA 检测试剂盒,购自南京建成生物技术有限公司;尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、钙(Ca)、磷(P)和镁(Mg)生化检测试剂盒,购于南京森贝伽生物科技有限公司;Trizol RNA 提取试剂,购自大连宝生物工程有 限公司;StarScript II First-strand cDNA Synthesis Mix,购自北京康润诚业生物技术有限公司;BIOMIGA SYBR qPCR Mix 试剂盒,购自杭州倍沃医学科技有限公司。

FSH-2 可调高速匀浆器,购于金坛市荣华仪器制造有限公司;TGL 冷冻高速离心机,购于珠海黑马医学仪器有限公司;TBA-120FR 全自动生化分析仪,购于日本 TOSHIBA 公司;Arktik 多功能 PCR

仪,购于美国 Thermo 有限公司;StepOne™ Real-Time PCR System、Moultiskan MK3 酶标仪,购于赛默飞世尔仪器有限公司。

1.2 试验设计

将 120 羽 20 日龄健康白羽肉杂鸡随机均分为对照组(Ⅰ组)和高蛋白饲料组(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组),每组 5 个重复,每个重复 6 羽。Ⅰ组饲喂基础饲料,其蛋

白质含量约为 190 g/kg,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组在基础饲料中添加豆粕类添加物,使粗蛋白含量分别约为 220,250,280 g/kg,各组饲料组成见表 1。对所有的白羽肉杂鸡进行脚标编号,严格记录分组情况。试鸡按常规免疫程序进行免疫。试验鸡采用笼养(70 cm×70 cm×40 cm)模式饲养,每笼 6 羽,按计划饮食饮水。试验周期为 14 d。

表 1 不同蛋白含量饲料组成和营养水平

Table 1 Dietary ingredients and nutrient levels for different proteins contents

项目 Item	成分 Composition	Ⅰ组 Group I	Ⅱ组 Group II	Ⅲ组 Group III	Ⅳ组 Group IV
配方 Ingredients	玉米/(g·kg ⁻¹) Corn	664.7	570.6	490.8	398.1
	豆粕/(g·kg ⁻¹) Soybean meal	206.8	295.8	353.3	435.0
	玉米蛋白粉/(g·kg ⁻¹) Corn protein powder	60.0	60.0	80.0	80.0
	动物油脂/(g·kg ⁻¹) Animal fat	27.0	36.0	41.0	52.0
	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lysine	6.6	2.7	0.0	0.0
	腐殖酸钠/(g·kg ⁻¹) Sodium humate	1.0	1.0	1.0	1.0
	蒙脱石/(g·kg ⁻¹) Montmorillonite	1.0	1.0	1.0	1.0
	石粉/(g·kg ⁻¹) Mountain flour	12.2	12.2	12.2	12.2
	磷酸氢钙/(g·kg ⁻¹) CaHPO4·2H2O	8.0	8.0	8.0	8.0
	食盐/(g·kg ⁻¹) NaCl	2.7	2.7	2.7	2.7
	1%预混料/(g·kg ⁻¹) Premixa	10.0	10.0	10.0	10.0
营养水平 Nutrient levels	粗蛋白质/(g·kg ⁻¹) Crude protein	187.0	218.4	249.1	279.4
	代谢能/(MJ·kg ⁻¹) ME	3.07	3.07	3.07	3.08
	钙/(g·kg ⁻¹) Ca	10.1	9.3	9.5	9.5
	总磷/(g·kg ⁻¹) TP	7.0	6.8	6.9	6.9
	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lysine	11.5	10.7	8.4	7.3
	蛋氨酸+胱氨酸/(g·kg ⁻¹) Met+Cys	8.1	7.3	6.8	7.1

注:预混料向每千克饲料提供 VA 14~29 万 IU,V_E≥350 IU,维生素 B₁≥50 mg、维生素 B₂≥150 mg、维生素 B₆≥80 mg、维生素 B₁₂≥0.3 mg、V_D 9~35 万 IU、维生素 K₃ 40~75 mg、烟酰胺≥550 mg、叶酸≥16 mg、氯化胆碱≥7 000 mg、铜 5~700 mg、锰 1 000~3 000 mg、硒 2~10 mg、总磷≥2.6 %、泛酸 280 mg、生物素≥1.8 mg、铁 1 600~15 000 mg、锌 1 000~3 000 mg、碘 6~100 mg。代谢能为计算值,其余为实测值。

Note:The premix provides vitamin A 140 000—290 000 IU,V_E≥350 IU,vitamin B₁≥50 mg,vitamin B₂≥150 mg,vitamin B₆≥80 mg,vitamin B₁₂≥0.3 mg,V_D 90 000—350 000 IU,vitamin K₃ 40—75 mg,nicotinamide≥550 mg,folic acid≥16 mg,choline chloride≥7 000 mg,copper 5—700 mg,manganese 1 000—3 000 mg,selenium 2—10 mg,total phosphorus≥2.6%,pantothenic acid 280 mg,biotin≥1.8 mg,iron 1 600—15 000 mg,zinc 1 000—3 000 mg and iodine 6—100 mg in each kilogram of premix. ME is calculated value, while the others are measured values.

1.3 样品采集

于试验第 0(试验开始当日),7,14 天,每组随机抽取 5 羽鸡,每个重复 1 羽,经翅静脉采血,血液于 37 ℃温箱中静置 1 h,然后 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,分装标记,—20 ℃保存。于试验第 14 天,每组随机抽取 5 羽试验鸡,每个重复 1 羽,在无菌条件下采取肾脏组织,于—80 ℃保存待检。

1.4 血清生化指标检测

用全自动生化分析仪对白羽肉杂鸡血清进行肾功能指标检测,测定指标主要包括血清钙(Ca)、肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、尿酸(UA)、血清磷(P)、镁(Mg)含量等。

1.5 血清氧化与抗氧化指标检测

血清氧化与抗氧化指标采用 ELISA 试剂盒进行

检测,测定指标包括血清丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、羟自由基(·OH)含量和总抗氧力(T-AOC)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性等,测定步骤按照试剂盒说明书操作。

1.6 XOD 活性检测

采用 ELISA 试剂盒对白羽肉杂鸡血清 XOD 的活性进行检测,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.7 XOD 基因表达的检测

1.7.1 cDNA 的制备及引物设计与合成 将肾脏组织样本分别用液氮研磨粉碎,加入 1 mL Trizol 试剂,在碎冰上匀浆,12 000 r/min 离心 15 min 取上清液,加入 500 μL 酚氯仿,混匀,静置 5 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清并加入 700 μL 异丙醇,混匀,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取白色

沉淀,用体积分数 75%的乙醇洗涤 1 次,置于超净台上风干,溶于 50 μ L DEPC 处理水中,电泳检测。用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA。

根据 GenBank 中 *XOD* 和 18S 内参基因序列,运用 Prime 5.0 软件设计特异性上、下游引物序列。相关基因的引物序列见表 2。

表 2 *XOD* 目的基因和 18S 内参基因引物参数

Table 2 Parameters of *XOD* target gene and 18S internal gene primer

基因 Gene	参考序列 GenBank 号 GenBank	引物序列(5'→3') Sequence of primer (5'→3')	产物/bp Product
18S	NR_003278	F:CGGCGACGACCCATTTCGAAC R:GAATCGAACCTTGATTCCCCGTC	99
XOD	NM_205127.1	F:ATCGGATCCACGACTCTCCAG R:CTCGAGGAAGAGCTGGGTGCT	461

1.7.2 *XOD* mRNA 表达的 qRT-PCR 检测 应用 StepOne™ Real-Time PCR System 和 BIOMIGA SYBR qPCR Mix 试剂盒。根据试剂盒说明书进行操作,将调配的 PCR 反应液置于 8 联管中,用超净管盖封闭,进行 RT-PCR 反应。PCR 反应体系为 50 μ L:qPCR 反应混合物 (Bestar™ SybrGreen) 25 μ L,上、下游引物各 2 μ L,模板 2 μ L,用 ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 120 s;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;55 $^{\circ}$ C 1 min,55~98 $^{\circ}$ C 0.05 $^{\circ}$ C/s,20 $^{\circ}$ C 10 s。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

方法进行相对定量,计算样品的相对表达量。

1.8 数据处理

试验结果以“平均数±标准差”表示;采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,采用 Duncan’s 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 高蛋白饲料对肉鸡肾功能指标的影响

高蛋白饲料对肉鸡血清肾功能指标的影响如表 3 所示。

表 3 高蛋白饲料对肉鸡血清肾功能指标的影响

Table 3 Effects of high protein diet on serum renal function of broilers

试验时间/d Experiment date	组别 Groups	UA/(μ mol · L ⁻¹)	BUN/(μ mol · L ⁻¹)	CREA/(μ mol · L ⁻¹)	Ca/(mmol · L ⁻¹)	P/(mmol · L ⁻¹)	Mg/(mmol · L ⁻¹)
0	I	135.06±28.63 a	0.76±0.07 a	6.02±0.12 a	1.89±0.03 a	2.25±0.18 a	0.78±0.04 a
	II	125.44±43.23 a	0.73±0.04 a	5.94±0.15 a	1.90±0.06 a	2.14±0.23 a	0.75±0.18 a
	III	124.66±23.16 a	0.72±0.11 a	6.04±0.37 a	1.96±0.13 a	2.31±0.42 a	0.79±0.06 a
	IV	127.30±23.68 a	0.69±0.06 a	6.26±0.42 a	1.85±0.10 a	2.32±0.23 a	0.79±0.06 a
7	I	173.86±63.04 a	1.09±0.09 Bb	8.32±0.26 b	2.06±0.25 b	2.08±0.42 a	0.78±0.04 a
	II	202.24±75.80 a	1.19±0.10 Bb	8.30±0.16 b	2.36±0.11 a	1.77±0.52 a	0.75±0.18 a
	III	207.24±74.72 a	1.16±0.04 Bb	8.44±0.27 b	2.26±0.16 a	2.08±0.16 a	0.79±0.06 a
	IV	233.82±79.32 a	2.03±0.30 Aa	14.54±0.45 a	2.37±0.05 a	2.10±0.22 a	0.79±0.56 a
14	I	165.50±56.17 b	1.26±0.18 c	8.36±0.35 Cc	2.32±0.09 a	1.82±0.14 a	1.82±0.11 a
	II	166.20±18.32 b	1.36±0.03 c	8.52±0.47 Cc	1.88±0.94 a	2.04±0.35 a	2.04±0.35 a
	III	226.30±68.70 ab	1.89±0.02 b	10.44±0.30 Bb	2.47±0.22 a	2.05±0.53 a	2.05±0.53 a
	IV	260.60±72.24 a	2.26±0.05 a	16.54±2.56 Aa	2.36±0.21 a	2.34±0.53 a	2.34±0.53 a

注:同列数据后标不同小写字母表示同一时间不同组间差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note:Different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$) among groups,while different uppercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

由表 3 可知,试验开始当日(第 0 天),各试验组肉鸡各项指标与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。第 7 天,与对照组(I 组)相比,各高蛋白质组(II、III、IV 组)肉鸡血清 UA 含量差异不显著($P>0.05$);与对照组(I 组)相比,II、III 组肉鸡血清中 BUN、CREA 含量差异不显著,而 IV 组 BUN、CREA 含量极显著上升($P<0.01$);与对照组(I 组)相比,II 组 Ca 差异不显著,而 III 和 IV 组 Ca 含量显著升高($P<0.05$)。第 14 天,与对照组(I 组)相

比,II 组肉鸡血清中 UA、BUN 和 CREA 含量差异不显著,III 和 IV 组肉鸡血清中 UA、BUN 和 CREA 含量显著或极显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而各组之间 Ca 含量差异不显著($P>0.05$)。在试验期间,各组肉鸡血清 P、Mg 含量变化不显著($P>0.05$)。

2.2 高蛋白饲料对肉鸡脂质过氧化指标的影响

由表 4 可知,第 0 天,各高蛋白试验组肉鸡各项指标与对照组差异不显著($P>0.05$);第 7 天,与对照组(I 组)相比,各高蛋白组(II、III、IV 组)肉鸡血清

MDA 含量显著或极显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Ⅱ组与Ⅲ组血清·OH 和 NO 含量差异均不显著 ($P>0.05$),而Ⅳ组血清·OH、NO 含量显著或极显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);第 14 天,Ⅳ组血清 MDA、·OH 与 NO 含量较对照组极显著升高 ($P<$

0.01),其他各组无显著差异 ($P>0.05$)。与对照组(Ⅰ组)相比,第 7 和 14 天,Ⅳ组血清 SOD 活性以及 GSH-Px、T-AOC 含量显著下降 ($P<0.05$);第 7 天,Ⅲ组血清 GSH-Px、T-AOC 含量显著下降 ($P<0.05$)。

表 4 高蛋白饲料对肉鸡血清脂质过氧化指标的影响

Table 4 Effect of high protein diet on serum lipid peroxidation index in broilers

试验时间/d Experiment date	组别 Groups	MDA/(nmol· L ⁻¹)	·OH/(nmol· L ⁻¹)	NO/(nmol· L ⁻¹)	SOD/(U· mL ⁻¹)	GSH-Px/(U· mL ⁻¹)	T-AOC/(U· mL ⁻¹)
0	Ⅰ	1.01±0.04 a	2.01±0.04 a	1.01±0.04 a	1.31±0.04 a	1.34±0.04 a	1.30±0.04 a
	Ⅱ	0.99±0.18 a	2.00±0.18 a	1.02±0.18 a	1.30±0.18 a	1.29±0.18 a	1.29±0.18 a
	Ⅲ	1.02±0.06 a	1.99±0.06 a	1.00±0.06 a	1.32±0.06 a	1.32±0.06 a	1.31±0.06 a
	Ⅳ	1.00±0.06 a	2.02±0.06 a	1.02±0.06 a	1.29±0.06 a	1.29±0.06 a	1.29±0.06 a
7	Ⅰ	1.01±0.02 cC	2.32±0.03 b	1.34±0.02 bB	1.39±0.01 a	1.53±0.03 a	1.52±0.03 a
	Ⅱ	1.25±0.14 b	2.29±0.03 b	1.34±0.02 bB	1.37±0.06 a	1.48±0.06 ab	1.49±0.06 ab
	Ⅲ	1.32±0.04 ab	2.35±0.07 b	1.35±0.01 bB	1.34±0.03 a	1.43±0.03 b	1.45±0.03 b
	Ⅳ	1.46±0.03 aA	2.39±0.03 a	1.78±0.10 aA	1.32±0.01 b	1.42±0.05 b	1.41±0.05 b
14	Ⅰ	1.31±0.02 bB	2.30±0.03 bB	1.35±0.02 bB	1.58±0.13 a	1.57±0.13 a	1.53±0.13 a
	Ⅱ	1.32±0.02 bB	2.30±0.03 bB	1.36±0.02 bB	1.43±0.01 a	1.43±0.01 a	1.40±0.01 a
	Ⅲ	1.35±0.01 bB	2.31±0.07 bB	1.36±0.01 bB	1.41±0.01 a	1.40±0.01 a	1.40±0.01 a
	Ⅳ	2.06±0.10 aA	2.38±0.03 aA	1.80±0.10 aA	1.33±0.01 b	1.43±0.01 b	1.42±0.01 b

2.3 高蛋白饲料对肉鸡血清 XOD 活性的影响

由表 5 可见,试验第 0 天,4 组肉鸡间黄嘌呤氧化酶活性无显著差异 ($P>0.05$);试验第 7 天,Ⅱ组肉鸡血清 XOD 活性与对照组无显著差异 ($P>$

0.05),而Ⅲ组与Ⅳ组肉鸡血清 XOD 活性显著高于对照组 ($P<0.05$);试验第 14 天,Ⅳ组肉鸡血清 XOD 活性显著高于对照组 ($P<0.05$),其余各试验组与对照组均无显著差异 ($P>0.05$)。

表 5 高蛋白饲料对肉鸡血清 XOD 活性的影响

Table 5 Effect of high protein diet on serum XOD activity in broilers

组别 Group	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	组别 Group	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14
Ⅰ	0.97±0.24 a	0.937±0.28 a	3.27±3.23 a	Ⅲ	0.94±0.23 a	1.162±0.43 b	4.83±3.77 ab
Ⅱ	0.99±0.17 a	1.010±0.39 a	4.23±2.20 ab	Ⅳ	0.98±0.18 a	1.158±0.43 b	6.23±3.14 b

2.4 XOD 基因 mRNA 表达水平检测

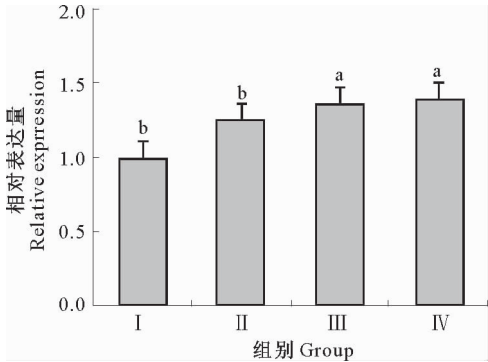
高蛋白饲料对肉鸡肾组织 XOD 基因 mRNA 相对表达量的影响见图 1。

由图 1 可知,试验第 14 天时,随着饲料中蛋白质含量的增加,Ⅲ、Ⅳ组肉鸡肾组织中 XOD mRNA 的相对表达量与对照组相比均显著升高 ($P<0.05$)。

3 讨 论

通常情况下,禽类更容易自发或被诱发高尿酸血症,因此在高尿酸血症模型的建立及研究方面,禽类具有突出地位。患鸡呈现运动能力下降、不能站立等症状,这常见于因代谢不均衡、机体内电解质不平衡引发的腹泻症状,而内脏型痛风表现并不明显。痛风的禽类粪便为白色稀便,饮食和运动能力减退,有些病鸡死亡,解剖病死鸡可见到肾脏和输尿管部位有明显的病理变化或尿酸盐沉积^[12-13]。本试验发现,高蛋白饲料饲喂的白羽肉杂鸡肾功能指标出现异常变化且呈现增高趋势,说明随着蛋白质含量的提高,饲料对鸡肾功能的不良影响越来越强^[14-15]。

一般认为,动物体内 Ca 和 P 之间有拮抗作用,适量的高蛋白饲料可增加肉鸡体内 Ca 含量,如果在



图柱上标不同小写字母表示不同组间差异显著 ($P<0.05$)

Different lowercase letters mean significant difference among groups ($P<0.05$)

图 1 高蛋白饲料对肉鸡肾组织 XOD 基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of high protein diet on relative expression of XOD mRNA in renal tissue of broilers

动物体生长过程中过量饲喂蛋白质,反而会导致机体内 Ca 流失,同时会增加肾脏的工作负荷,从而导致肾脏疾病,这在禽类中比较常见^[16]。本试验在第 7 天时,Ⅲ、Ⅳ组肉鸡血清 Ca 含量显著上升,第 14 天时,各组血清 Ca 含量无显著差异,这可能与大量蛋白质的摄入引起肾脏 Ca 排泄增加有关。禽类摄入大量富含核蛋白质和嘌呤碱的蛋白质饲料时,饲料中的蛋白质在体内消化吸收分解最终生成 UA,而饲料中高蛋白会引起 Ca 异位沉着,UA 排出受阻,导致血清 UA 水平升高^[17]。本试验结果显示,与对照组相比,高蛋白组 UA 显著升高,该结果与唐建霞等^[18]的研究结果一致,其原因可推测为饲料中高蛋白会引起 Ca 异位沉着,UA 排出受阻,使体内 UA 升高。本试验结果显示,与对照组相比,高蛋白饲料组肉鸡血清 Mg 含量变化不显著,表明高蛋白质的饲喂对 Mg 含量影响不显著,与预期相符。CREA 是机体组织代谢的产物,血液中的 CREA 主要由 2 个途径产生:外源性和内源性,一般 CREA 的变化以外源性为主^[19]。CREA 可反映肾脏损害、肾小球滤过率等功能;机体组织代谢的另一个产物为 BUN,当 BUN 超出正常范围时标志着肾代谢压力增加,出现了氮质血症,肾功能不全^[20-21]。本试验发现,在大量摄入高蛋白饲料后,肉鸡第 7 和 14 天时可以观察到血清 CREA 含量增加显著。

高蛋白饲料可致鸡体内 Ca 含量增加,引发水和电解质代谢紊乱,导致高钙血症以及脂质过氧化指标发生变化,最终引发痛风^[18]。由于结构特殊,·OH 具有极强的氧化能力。除·OH 外,MDA 和 NO 也是反映氧化能力的主要指标。SOD、T-AOC、GSH-Px 是体内自由基的清除剂,也是机体内抗氧化能力的主要指标^[22]。本试验中,在第 7 和 14 天,血清·OH、MDA 和 NO 均呈现 280 g/kg 粗蛋白组肉鸡显著高于对照组、220 g/kg 粗蛋白组和 250 g/kg 粗蛋白组的情况,从对照组到高蛋白组呈上升趋势,并且第 7 和 14 天·OH、MDA、NO 3 个氧化指标均呈现 280 g/kg 粗蛋白组显著高于 250 g/kg 粗蛋白组的情况,说明肉鸡血液中的氧化能力有所增强。自由基是动物体内自带的一种物质,一般认为自由基会导致机体衰老和功能的减退,而在动物体内,当自由基与不饱和脂肪酸等结合在一起的时候,导致体内不饱和脂肪酸直接损坏膜的结构,从而引起机体组织的损伤,自由基如果超过一定的量就会对机体产生毒副作用。氧化功能与抗氧化功能相互抑制,MDA 活性经常被用作氧化损伤的衡量指

标,并被用作反映自由基诱导的脂质过氧化水平。T-AOC 是反映血清和组织中所有抗氧化剂抗氧化能力的综合指标,体现了机体抗衰老和抵御外界损伤的能力^[23-24]。动物体内的自由基和氧化剂会使机体内细胞和组织结构受损,影响器官功能,在人体中的主要表现有心脑血管损伤、氧化能力增强或者抗氧化能力减弱,从而造成氧化应激反应^[19]。试验第 14 天时,高蛋白组肉鸡的氧化指标 MDA、NO、·OH 均显著高于对照组,且整体呈现增加趋势,而抗氧化指标 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 均较对照组显著减少,说明机体的氧化能力在增强而抗氧化能力在下降。因此在本试验中,随着蛋白质含量的增加,机体氧化能力增强而抗氧化能力减弱,呈现剂量依赖性。

XOD 作为动物体内的一种代谢酶,催化产生超氧自由基和过氧化氢,是体内活性氧的一个重要来源^[25]。在本试验中可以观察到,随着试验鸡摄入饲料蛋白含量的增加,XOD mRNA 表达量也随之增加,说明高蛋白饲料的摄入会引起相关基因的表达,且蛋白质含量越高基因表达越明显。此外,XOD 与尿酸及自由基的产生密切相关,其可以将代谢产生的次黄嘌呤氧化成黄嘌呤,再将黄嘌呤氧化成 UA,随着 XOD 的增加,动物体内尿酸沉积越来越明显,肾脏损伤也越来越严重^[26]。经试验证实,高蛋白饲料能提高肉鸡 XOD mRNA 表达量,进而导致尿酸及自由基的产生和增加。

4 结 论

综上所述,饲喂高蛋白饲料可造成肉鸡血清肾功能相关指标出现异常,血清 XOD 活性、肾组织 XOD mRNA 表达量显著升高,血清氧化指标 MDA、NO、·OH 含量上升,抗氧化指标 T-AOC、GSH-Px、SOD 活性下降,产生氧化应激,血清 UA、BUN、GREN 等指标显著升高,Ca 含量呈上升趋势,表明高蛋白饲料会对肉鸡造成一定的肾氧化损伤。

[参考文献]

- [1] 郭立宏,周景明.不同蛋白质水平日粮对肉仔鸡生长性能的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2017(8):76-77.
Guo L H, Zhou J M. Effects of different protein levels on growth performance of broilers [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017(8): 76-77.
- [2] Nasoori A, Pedram B, Kamyabi-Moghaddam Z, et al. Clinicopathologic characterization of visceral gout of various internal organs-a study of 2 cases from a venom and toxin research center [J]. Diagnostic Pathology, 2015, 10(1): 23.

- [3] Marchmann P, Osther P, Pederssen A N, et al. High-protein diets and renal health [J]. *Journal of Renal Nutrition*, 2015, 25(1): 1-5.
- [4] 王海鸽, 张冰, 林志健. 高蛋白高钙饲料对鹌鹑尿酸代谢及痛风发生的影响 [J]. *中国家畜*, 2018, 40(19): 22-27.
Wang H G, Zhang B, Lin Z J. Effect of high-protein and high-calcium diet on uric acid metabolism and gout occurrence in quail [J]. *China Poultry*, 2008, 40(19): 22-27.
- [5] 官丽辉, 郭颖, 刘海斌. 日粮不同蛋白水平对塞北乌骨鸡肠道内环境、抗氧化能力和免疫功能的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(3): 564-570.
Guan L H, Guo Y, Liu H B. Effects of different levels of protein on intestinal environmental, antioxidant capacity and immune function of Saibei chicken [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(3): 564-570.
- [6] 李曼曼, 丁雪东, 荣雪路, 等. 高蛋白饲料致雏鹅痛风的临床病理学研究 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(1): 46-52.
Li M M, Ding X D, Rong X L, et al. Clinical pathological study of gosling gout induced by high protein diet [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(1): 46-52.
- [7] Chaudhary K, Malhotra K, Sowers J, et al. Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome [J]. *Cardiorenal Medicine*, 2013, 3(3): 208-220.
- [8] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratterer S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion [J]. *International Journal of Cardiology*, 2015, 213: 8-14.
- [9] 郭小权, 曹华斌, 黄克和. 高钙饲料对青年蛋鸡肾脏中 XOD mRNA 表达的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(11): 1663-1666.
Guo X Q, Cao H B, Huang K H. Effect of high calcium diet on expression of XOD mRNA in renal of growers [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(11): 1663-1666.
- [10] 苏友新, 赖震, 郑良朴, 等. 痛风宁颗粒对鸡痛风模型血清黄嘌呤氧化酶活性的影响 [J]. *福建中医药*, 2006, 37(2): 41-42.
Su Y X, Lai Z, Zheng L P, et al. Effect of Tongfengning granule on serum xanthin oxydase of gout in chickens [J]. *Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2006, 37(2): 41-42.
- [11] 林华源. 鸡 XOD 亚基的原核表达、定位及其在 NIBV 感染后的蛋白表达量分析 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.
Lin H Y. Prokaryotic expression, localization and protein expression analysis of chicken XOD subunit after NIBV infection [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2016.
- [12] Guo X, Huang K, Tang J. Clinicopathology of gout in growing layers induced by high calcium and high protein diets [J]. *British Poultry Science*, 2005, 46(5): 641-646.
- [13] 姜晓宁, 田家军, 杨晶, 等. 导致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(5): 871-877, 894.
Jiang X N, Tian J J, Yang J, et al. Isolation and identification of a new type of astrovirus causing gout in goose [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(5): 871-877, 894.
- [14] Hara K, Iijima K, Elisa M K, et al. Airway uric acid is a sensor of inhaled protease allergens and initiates type 2 immune responses in respiratory mucosa [J]. *Journal of Immunology*, 2014, 192(9): 4032-4042.
- [15] 曹华斌, 郭小权, 雷鹏, 等. 不同来源高钙饲料对青年蛋鸡血清和肾脏线粒体自由基代谢的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(5): 748-753.
Cao H B, Guo X Q, Lei P, et al. Effects of high dietary calcium from different sources on free radical metabolism of serum and renal mitochondria of growers [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(5): 748-753.
- [16] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratterer S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion [J]. *International Journal of Cardiology*, 2015, 213: 8-14.
- [17] Convento M S, Pessoa E, Dalboni M A, et al. Pro-inflammatory and oxidative effects of noncrystalline uric acid in human mesangial cells: contribution to hyperuricemic glomerular damage [J]. *Urological Research*, 2011, 39(1): 21-27.
- [18] 唐建霞, 黄克和, 郭小权. 高钙与高蛋白饲料诱发鸡痛风的尿液临床病理学研究 [J]. *扬州大学学报*, 2005, 26(4): 8-11.
Tang J X, Huang K H, Guo X Q. Clinicopathology of urine in growing layers with gout induced by high dietary calcium and high protein [J]. *Journal of Yangzhou University*, 2005, 26(4): 8-11.
- [19] Park J H, Jin Y M, Hwang S, et al. Uric acid attenuates nitric oxide production by decreasing the interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin in human umbilical vein endothelial cells; a mechanism for uric acid-induced cardiovascular disease development [J]. *Nitric Oxide*, 2013, 32(8): 36-42.
- [20] Kanbay M, Segal M, Afsar B, et al. The role of uric acid in the pathogenesis of human cardiovascular disease [J]. *Heart*, 2013, 99(11): 759-766.
- [21] Doehner W, Landmesser U. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options [J]. *Semin Nephrol*, 2011, 31(5): 433-440.
- [22] Kim S M, Lee S H, Kim Y G, et al. Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy [J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2015, 308(9): 993-1003.
- [23] Zou D, Ye Y, Zou N, et al. Analysis of risk factors and their interactions in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional survey in Guilin [J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2017, 8(2): 188-194.
- [24] 陈冠群. 机体总抗氧化力的氨基酸和基因基础以及氧化对抗体活性及其它实验室指标的影响 [D]. 辽宁大连: 大连医科大学, 2014.
Chen G Q. Amino acid and gene basis of total antioxidant capacity of body and the effect of oxidation on antibody activity and other laboratory indicators [D]. Dalian, Liaoning: Dalian Medical University, 2014.
- [25] Lin H Y, Chen Y J, Qi Q, et al. Prokaryotic expression of the chicken xanthine oxidase (XOD) subunit and its localization in liver and kidney [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87: 341-347.
- [26] Liang C C, Lin P C, Lee M Y, et al. Association of serum uric acid concentration with diabetic retinopathy and albuminuria in taiwanese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8): 1248.