

邝良德,任永军,谢晓红,等. 饲料纤维水平对初产母兔瘦素分泌及其基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):281-283.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.078

# 饲料纤维水平对初产母兔瘦素分泌及其基因表达的影响

邝良德,任永军,谢晓红,雷 岷,郭志强,李丛艳,郑 洁,张翔宇,张翠霞,杨 超,邓小东  
(四川省畜牧科学研究院/动物遗传育种四川省重点实验室,四川成都 610066)

**摘要:**为研究饲料不同纤维水平对初产母兔血清中瘦素含量以及卵巢组织中 *OB*、*OB-R* 基因表达的影响,选取 165 日龄的新西兰青年母兔 240 只,随机分为 4 个处理,分别为 12%、14%、16%、18% 纤维水平添加组,每个处理设 5 个重复,每个重复 12 只,每个处理共 60 只。结果显示,从配种到分娩,各处理组的母兔血清中瘦素含量均呈上升趋势。不同处理组相比较,母兔血清中瘦素含量存在显著差异,其中 16% 添加组的母兔血清瘦素含量最高。基因表达研究表明,16% 添加组的母兔卵巢中,*OB*、*OB-R* 基因的表达量显著高于其他各试验组。饲料不同纤维水平对初产母兔瘦素分泌影响显著,初产母兔饲料中纤维的适宜添加水平为 16%。

**关键词:**纤维;母兔;*OB* 基因;*OB-R* 基因;卵巢;基因表达

**中图分类号:** S829.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0281-03

粗纤维泛指植物性来源纤维成分,包括纤维素、半纤维素、果胶、植物胶、黏多糖、木质素等,主要存在于植物的细胞壁中。国内外研究表明,粗纤维是家兔最重要的营养素之一,对家兔具有特殊的生理作用,在构成合理日粮结构、维持家兔正常生理功能、初产母兔繁殖及胚胎成活率等方面起着极为重要的作用。瘦素(leptin)是肥胖基因(*obese gene*, *ob*)编码的产物,是一种分泌性蛋白质类激素。*OB* 基因是 1 条含 167 个氨基酸密码的 DNA 序列,包含有 2 个外显子、1 个内含子。Hindlet 等研究发现,缺陷 *ob/ob* (缺乏功能性瘦素)雌鼠不仅表现出肥胖,还出现生殖功能障碍,持续注射外源性瘦素后可恢复生殖功能,由此证明瘦素与生殖功能有关<sup>[1-2]</sup>。瘦素受体由 *db* 基因(*diabetes gene*)编码,为高度特异的跨膜蛋白质,与瘦素具有高度亲和力。最初认为瘦素只在白色脂肪组织中表达,之后研究发现,瘦素在下丘脑、垂体、肺、胃底部上皮、骨骼肌、卵巢、子宫内膜、合体滋养层细胞、乳腺上皮等均有表达,且在卵巢、子宫内膜中与瘦素受体同时表达<sup>[3-4]</sup>。

瘦素及其受体在下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的多处表达,表明瘦素对生殖的调节是通过旁分泌或内分泌方式对 HPG 轴不同水平进行复杂的网络式调节,从而对哺乳动物的

繁殖机能发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。适宜的粗纤维水平对家兔繁殖生产具有重要意义;因此,通过深入研究不同粗纤维水平对初产母兔瘦素分泌及其基因表达的影响,为降低母兔淘汰率、死亡率,综合提高母兔繁殖性能提供前提条件和基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计及母兔饲养管理

选择相同日龄(165 日龄)的新西兰青年母兔 240 只,随机分为 4 个处理,每个处理设 5 个重复,每个重复 12 只,每个处理共 60 只。试验期为母兔 165 日龄至第 1 胎分娩,4 个处理分别饲喂 12%、14%、16%、18% 水平纤维的日粮,所有日粮均按美国 NRC 肉兔饲养标准配制。分别于母兔配种当天、妊娠 21 d、分娩当天从每个重复中选择 4 只母兔,每个处理共 20 只,进行耳缘静脉采血,分离血清并于 -20℃ 保存待测。同时,在以上日龄的每个重复中选择 1 只母兔,每个处理 5 只,共计 60 只,进行屠宰并采集卵巢组织样品,于 -80℃ 保存,用于瘦素及瘦素受体 mRNA 表达量的测定。

### 1.2 试验日粮及营养水平

按照美国 NRC 肉兔饲养标准配制全价料,试验日粮组成及营养成分见表 1。在日粮中添加苜蓿草粉,将日粮粗纤维水平分别调整为 12%、14%、16%、18%,即试验 1、2、3、4 组。所有试验母兔均饲养在同一兔舍内,自由采食、自动饮水。

### 1.3 主要仪器及试剂

Biowave DNA 型核酸蛋白检测仪,Power Pac 3000 型电泳仪,岛津 UV2600 型紫外分光光度计,Polytron PT1200E 型电动匀浆器,Bio-rad iCycler iQ 型定量 PCR 仪,日立 CR22g 型高速冷冻离心机,Versa Doc 1000 型凝胶成像系统,无菌操作工作台。兔瘦素(leptin)ELISA 测定试剂盒为基因美公司产品,Trizol 试剂、PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ 均为 TaKaRa 公司产品。

收稿日期:2016-04-08

基金项目:四川省公益性科研院所基本科研业务费项目(编号:SASA2015A10);四川省“十二五”畜禽育种攻关项目(编号:2011NZ0099);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303143-5);国家兔产业技术体系(编号:CARS-44-B-4);动物遗传育种四川省重点实验室运行补助项目。

作者简介:邝良德(1983—),男,湖南郴州人,硕士,助理研究员,主要从事家兔遗传育种及饲养研究。E-mail:happyboy5851258@163.com。

通信作者:任永军,硕士,助理研究员,主要从事家兔饲养及疫病防控研究。E-mail:360167513@qq.com。

表 1 饲料组成及营养水平(风干基础)

原料	含量(%)			
	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组
玉米	19.00	16.00	18.00	14.00
麸皮	18.50	16.50	7.00	5.00
苜蓿草颗粒	17.50	19.00	28.00	30.00
豆粕(43 型)	16.50	17.30	19.00	21.00
次粉	9.00	8.20	4.00	2.00
菜粕	6.00	6.00	6.00	5.00
统糠	6.20	10.00	10.00	14.00
大豆油	2.50	3.00	4.00	5.00
氯化钠	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙	0.50	0.50	0.50	0.50
石粉	2.00	2.00	2.00	2.00
膨润土	0.80	0.00	0.00	0.00
预混料	1.00	1.00	1.00	1.00
营养水平				
粗纤维 CF	12.01	14.03	16.04	18.02
粗蛋白 CP	17.09	17.10	17.08	17.09
消化能 DE(MJ/kg)	10.40	10.40	10.40	10.40
钙	1.22	1.23	1.25	1.26
磷	0.61	0.60	0.62	0.63

注:预混料可为 1 kg 全价料提供 Fe 100 mg、Cu 120 mg、Zn 90 mg、Mn 30 mg、Mg 150 mg、维生素 A 4 000 IU、维生素 D<sub>3</sub> 1 000 IU、维生素 E 50 mg、胆碱 1 mg。消化能为计算值,其余为实测值。

1.4 试验指标测定

1.4.1 血清瘦素水平测定 分别取 -20 ℃ 冰箱中冷冻保存的血清样品,每个样品取 0.5 mL 进行瘦素水平测定。血清瘦素的测定采用酶联免疫吸附法(ELISA),利用紫外分光光度计(酶标仪)进行读数。

1.4.2 瘦素及瘦素受体基因 mRNA 表达量的测定 采用 Trizol 法提取各组织样品中的总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的质量和完整性,将质量合格的 RNA 置于 -80 ℃ 冰箱中冻存备用。参照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA 模板,反转录产物于 -20 ℃ 保存备用。根据 GenBank 公布的家兔瘦素基因(OB)、瘦素受体基因(OB-R)、内参基因 GAPDH 序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物扩增 OB、OB-R、GAPDH 基因。所

有引物均由上海生物工程技术有限公司合成,引物序列及参数见表 2。以 GAPDH 为内参基因,利用实时荧光定量 PCR 技术检测 OB、OB-R 基因在初产母兔卵巢组织中 mRNA 表达量的变化规律。RT-PCR 体系(20 μL)为:1 μL 反转录产物、10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (2 ×)、10 μmol/L 的上下游引物各 0.6 μL、7.8 μL 超纯水。采用 iCycler 型荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)进行扩增,PCR 条件为:95 ℃ 90 s;95 ℃ 15 s,63 ℃ 20 s,42 个循环;72 ℃ 15 s。每个样品设 3 个平行样。所得到的 C<sub>T</sub> 值(cycle threshold)采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 方法<sup>[8]</sup>计算。目的基因 mRNA 表达水平通过内参基因 GAPDH 进行校正。

表 2 目的基因引物信息

基因名称	用途	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
OB	定量	正向: TGCCCATGCGGAAAGTCCAGGATG	204
		反向: GCAGACTGGCGAGGATCTGTTGGT	
OB-R	定量	正向: TGTGCCAGCAGCCAAGCTCAACT	136
		反向: ACGCAAGCCTAACGGTGGATCAGG	
GAPDH	内参	正向: GATGCTGGTCCGACTAC	104
		反向: GCTGAGATGATGACCCTTTTGG	

1.5 数据统计分析

采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析,采用 Duncan's 检验进行多重比较和显著分析。所有数据均为“平均值 ± 标准误”,显著性水平为  $P < 0.05$ ,极显著水平为  $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 纤维水平对初产母兔瘦素分泌的影响

由表 3 可知,配种当天各处理组母兔血清中的瘦素含量存在差异,其中试验 3 组瘦素含量最高,显著高于其他试验组( $P < 0.05$ ),试验 1、2 组显著高于试验 4 组( $P < 0.05$ )。在妊娠 21 d,试验 3 组瘦素含量最高,显著高于试验 1、4 组( $P < 0.05$ ),试验 1 组与试验 4 组之间差异不显著。在分娩当天,试验 3 组瘦素含量显著高于其他各试验组( $P < 0.05$ ),试验 1 组与试验 4 组之间差异不显著,试验 1 组瘦素含量最低。从配种到分娩,各处理组母兔血清中的瘦素含量均呈上升趋势。

表 3 纤维水平对初产母兔血清瘦素含量的影响

时间	瘦素含量(ng/mL)			
	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组
配种当天	3.71 ± 0.08bA	3.80 ± 0.09bA	4.03 ± 0.07cA	3.58 ± 0.11aA
妊娠 21 d	4.87 ± 0.12aB	5.34 ± 0.09bB	5.49 ± 0.11bB	4.76 ± 0.08aB
分娩当天	5.73 ± 0.17aC	6.40 ± 0.13bC	7.11 ± 0.16cC	5.78 ± 0.15aC

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ );同列数据后不同大写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同大写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下表同。

2.2 纤维水平对初产母兔卵巢组织中 OB 基因表达的影响

由表 4 可知,配种当天各处理组母兔卵巢组织中的 OB 基因表达量存在显著差异,其中试验 3 组 OB 基因表达量最高,显著高于其他各试验组( $P < 0.05$ ),试验 4 组表达量最低,试验 1 组与试验 2 组之间差异不显著。在妊娠 21 d,试验 3 组 OB 基因表达量最高,表达量依次为试验 3 组 > 试验 1 组 > 试验 2 组 > 试验 4 组。在分娩当天,试验 3 组 OB 基因

表达量显著高于其他各试验组( $P < 0.05$ ),试验 1 组与试验 4 组之间差异不显著。从配种到分娩,各处理组母兔卵巢组织中的 OB 基因表达量均呈显著上升趋势。

2.3 纤维水平对初产母兔卵巢组织中 OB-R 基因表达的影响

由表 5 可知,饲料中纤维水平对初产母兔卵巢组织中的 OB-R 基因表达有显著影响。在配种当天,各处理组母兔卵

表 4 纤维水平对初产母兔卵巢组织中 *OB* 基因表达的影响

时间	<i>OB</i> 基因相对表达量			
	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组
配种当天	1.38 ± 0.46bA	1.21 ± 0.31bA	3.41 ± 0.75cA	0.31 ± 0.05aA
妊娠 21 d	2.63 ± 0.98bB	2.54 ± 0.52bB	5.45 ± 0.63cB	1.22 ± 0.17aB
分娩当天	3.43 ± 0.83aB	5.92 ± 1.00bC	7.16 ± 0.92cC	3.52 ± 1.12aC

巢组织中的 *OB* - *R* 基因表达量存在差异,其中试验 3 组 *OB* - *R* 基因表达量最高,显著高于其他各试验组 ( $P < 0.05$ )。在妊娠 21 d,试验 3 组 *OB* - *R* 基因表达量最高,显著高于其他各试验组 ( $P < 0.05$ ),试验 4 组表达量最低。在分娩当天,试验 3 组 *OB* - *R* 基因表达量显著高于其他各试验组 ( $P <$

0.05),表达量依次为试验 3 组 > 试验 2 组 > 试验 4 组 > 试验 1 组。从配种到分娩,试验 2、3、4 组母兔卵巢组织中的 *OB* - *R* 基因表达量均呈显著上升趋势,试验 1 组则表现为先升高、后基本维持不变。

表 5 纤维水平对初产母兔卵巢组织中 *OB* - *R* 基因表达的影响

时间	<i>OB</i> - <i>R</i> 基因相对表达量			
	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组
配种当天	0.86 ± 0.18aA	1.18 ± 0.56aA	1.84 ± 0.59bA	0.60 ± 0.27aA
妊娠 21 d	2.23 ± 0.81aB	1.65 ± 0.49aA	3.75 ± 0.75bB	1.31 ± 0.61aB
分娩当天	2.23 ± 0.43aB	3.32 ± 0.34bB	5.81 ± 0.51cC	2.48 ± 0.34aC

### 3 结论与讨论

作为分泌性蛋白质类激素,瘦素通过与其受体发生特异性结合来发挥作用。瘦素水平呈生理性波动,卵泡早期瘦素水平较低,于排卵期达到高峰。瘦素可激活磷酸二酯酶水解第二信使 cAMP,刺激胚泡的分裂,从而导致卵细胞的成熟<sup>[9-10]</sup>。已有研究表明,瘦素可促进卵泡刺激素 (FSH)、促黄体激素 (LH)、雌二醇 (E2) 的产生,影响卵巢的生殖能力,体内瘦素水平过低将导致女性不孕。Barashi 等每天给小鼠注射瘦素,发现小鼠的 LH、FSH 水平明显升高,表明瘦素可在一定程度上提高动物卵巢的生殖功能;小鼠在瘦素水平极低的情况下出现不孕症现象,而注射瘦素后生育功能得到改善<sup>[11-12]</sup>。为禁食蛋鸡注射外源瘦素,结果发现,在禁食期间注射瘦素可抑制卵泡的衰亡,蛋鸡产蛋行为的停止被延迟,由此可见瘦素具有抑制卵巢功能退化、提高鸡繁殖性能的作用<sup>[13-14]</sup>。本试验结果表明,从配种到分娩,各处理组母兔血清中的瘦素含量均呈上升趋势,这与母兔卵巢组织中 *OB*、*OB* - *R* 基因表达量基本符合。不同纤维水平添加组之间相比较,母兔血清中的瘦素含量存在显著差异。在各试验阶段,试验 3 组母兔血清中的瘦素含量均最高。在基因表达方面,试验 3 组母兔卵巢中的 *OB*、*OB* - *R* 基因表达量显著高于其他各试验组。饲料不同纤维水平对初产母兔瘦素分泌影响显著,初产母兔饲料中纤维的适宜添加水平为 16%。

### 参考文献:

- [1] Hindlet P, Bado A, Farinotti R, et al. Long-term effect of leptin on coupled peptide cotransporter 1 activity and expression *in vivo*: evidence in leptin-deficient mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323(1): 192-201.
- [2] Tartagial A, Dembski M, Weng, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor *OB* - *R*[J]. Cell, 1995, 83: 1263-1270.
- [3] Ferguson E M, Slevin J, Ashworth C J, et al. Effect of alterations in

the quantity and composition of the pre-mating diet on embryo survival and foetal growth in the pig[J]. Animal Reproduction Science, 2006, 96: 89-103.

- [4] 罗启慧,唐秀莹,陈正礼,等. 大熊猫胃肠道神经肽 Y 和长型瘦素受体的表达[J]. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1175-1183.
- [5] 李 骏,郑鸿培,侯 蓉. Leptin 在动物繁殖上的研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖, 2005, 13(1): 16-18.
- [6] Myers M G. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology[J]. Recent Progress in Hormone Research, 2004, 59: 287-304.
- [7] Seroussi E, Cinnamon Y, Yosefi S, et al. Identification of the Long-Sought leptin in chicken and duck: expression pattern of the highly GC-Rich avian leptin Fits an autocrine/paracrine rather than endocrine function[J]. Endocrinology, 2016, 157(2): 737-751.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [9] 杨 静,杨 琳. 瘦素对繁殖的影响[J]. 广东饲料, 2013, 22(7): 25-26.
- [10] 张楠楠,白 康,陈 辉,等. 外源瘦素对蛋鸡能量代谢及 *OB* - *R* 基因表达的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 198-201.
- [11] Barashi A, Chung C C, Weigle D S, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system[J]. Endocrinology, 1996, 137(7): 3144-3147.
- [12] Chan J L, Mantzoros C S. Role of leptin in energy deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa[J]. Lancet, 2005, 366(9479): 74-85.
- [13] Leroy T, Vranken E, van Brecht A, et al. A computer vision method for on-line behavioral quantification of individually caged poultry[J]. Transactions of the ASABE, 2006, 49(3): 795-802.
- [14] Paczoska E H E, Gertler A, Proszkowiec M, et al. Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens[J]. Reproduction, 2003, 126(6): 739-751.