

# 说明书

---

## 一种蛋鸡卵巢氧化应激模型的建立方法

### 5 技术领域

本发明属于动物繁殖学和毒理学技术领域，具体地说，涉及一种蛋鸡卵巢氧化应激模型的建立方法。

### 背景技术

- 10 家禽卵巢是研究卵巢生物学、卵泡发育和卵巢癌的经典模型。家禽的产蛋性能主要取决于卵巢中卵泡的生长和发育水平，并受到遗传、营养及环境条件（光照时间和强度）等因素的影响。随着遗传和营养领域技术的进步，商品蛋鸡生产性能持续提高，目前高产蛋鸡 110 周可产 410 枚~430 枚鸡蛋，但全期（20-110 周龄）平均产蛋率只有 65%~70%，仍
- 15 具有一定的生产潜力有待挖掘。在实际生产中，产蛋鸡一般在 18-20 周时达到性成熟并开产，到 24-25 周龄产蛋率达 95% 以上，随后产蛋率缓慢下降，至产蛋后期（45 周龄）产蛋率降到 88% 左右，而后产蛋率下降速度逐渐增快，80 周龄下降到 60% 左右，产蛋间隔延长，卵巢内不同发育阶段的卵泡闭锁数量增加，表明蛋鸡产蛋后期卵巢机能逐步衰退，卵
- 20 泡发育受到抑制，并容易诱发卵巢癌症。此外，其他应激因素，比如高温，高饲养密度、重金属、疾病等也可以导致产蛋率的急剧下降。生产中因产蛋后期卵巢机能衰退或其他应激等因素，导致全期产蛋数低，一般第一个生产期（72 周龄）结束前蛋鸡被淘汰，终生仅提供 280~300 枚鸡蛋，究其主要原因在于卵泡闭锁数量增多和卵泡质量不佳。本课题组
- 25 前期研究发现，蛋鸡饲料中添加抗氧化剂（茶多酚提取物）可以改善重金属镉和钒诱导氧化应激模型下蛋鸡的产蛋率和卵泡数，也可以提高产蛋后期的产蛋成绩；前人研究报道也证实氧化应激造成的繁殖性能衰退，可能是蛋鸡后期和应激时产蛋性能下降的主要原因。家禽在孵化时卵巢拥有原始卵泡 480 万个，但终生排卵仅 500~1000 个，具有巨大的生产潜

力。氧化应激（Oxidative stress）是指机体在遭受各种有害刺激时，体内的活性分子如活性氧（ROS）和活性氮自由基产生过多，氧化程度超出氧化物清除能力，氧化系统和抗氧化系统动态失衡，从而导致组织损伤。ROS 是细胞通路的重要调控分子，能调控细胞周期和细胞凋亡。大量的研究表明，卵泡内一定量的 ROS 对其发育和排卵具有重要的生理作用，然而当 ROS 过度升高，将会导致氧化应激，诱导卵泡闭锁。哺乳动物上的研究发现，氧化应激能降低卵巢各阶段卵泡数量，但氧化应激抑制卵泡发育，诱导卵泡闭锁的具体机制尚不清楚，仅有的研究主要是在人和小鼠等模式动物上，在家禽上的研究非常少。

- 10 因此，鉴于上述原因，为了进一步探究氧化应激造成卵巢功能损伤从而降低产蛋性能的具体机制，有必要建立一种蛋鸡卵巢的氧化应激模型。

## 发明内容

- 15 有鉴于此，本发明提供了一种蛋鸡卵巢氧化应激模型的建立方法，能够进一步探究营养和饲料因素以及衰老引起鸡蛋生产性能下降的具体机制。

为了解决上述技术问题，本发明公开了一种蛋鸡卵巢氧化应激模型的建立方法，包括以下步骤：

- 20 选用产蛋高峰期即 28 周龄的罗曼粉蛋鸡，采用单因素试验设计，设 6 个处理，每个处理 10 个重复，每个重复 1 只鸡，分别为 1 个对照组和 5 个叔丁基过氧化氢组，对照组饲喂生理盐水，分别于实验 8、15、22 天早上 9:00 饲喂生理盐水和叔丁基过氧化氢；最后一次饲喂后 48h 进行采样；试验期为 24 天，饲料为玉米-豆粕型基础饲料，饲喂方式为定量饲喂；饲养管理按常规饲养管理进行；试验开始预饲 2 周，前通过观察记录蛋鸡产蛋率，按产蛋率进行随机分组；

每天记录产蛋率，通过 ELISA 方法测定雌二醇、孕酮、睾酮、瘦素、促卵泡激素、胰岛素样生长因子-1 和抗穆氏荷尔蒙的浓度；最后一次饲喂生理盐水和叔丁基过氧化氢后 48h 收集卵巢，HE 染色后，用校正法对原始卵泡数量进行统计，并对前等级、等级卵泡计数和量取等级卵泡大小；利用

HPLC 和试剂盒方法测定卵巢中维生素 C、维生素 E、脂质过氧化产物，蛋白质羰基、抗氧化酶（SODs、CAT、GSH、GST 和 TAOC）的含量或活性。

可选地，5 个叔丁基过氧化氢组分别饲喂浓度为：100 $\mu$ mol/kg 体重、200 $\mu$ mol/kg 体重、400 $\mu$ mol/kg 体重、800 $\mu$ mol/kg 体重和 1000 $\mu$ mol/kg 体重。

5 可选地，所述饲料按照质量份包括以下组分：玉米 59.064 份、小麦麸皮 3.867 份、大豆油 1.50 份、豆粕 15.236 份、玉米蛋白粉 5.00 份、玉米 DDGS 5.00 份、粒状石粉 6.103 份、粉状石粉 2.50 份、粉状磷酸氢钙 0.941 份、氯化钠 0.250 份、小苏打 0.100 份、L-赖氨酸硫酸盐 0.162 份、DL-蛋氨酸 0.012 份、氯化胆碱 0.100 份、多维 10.015 份、矿添 10.15 份。

10 可选地，所述的 L-赖氨酸硫酸盐的纯度为 70%；DL-蛋氨酸的纯度为 99%；氯化胆碱的纯度为 60%。

可选地，在饲养管理过程中，每周进行严格消毒，室温保持在 20~22℃，注意通风换气。

15 可选地，所述的前等级包括小白、大白和小黄卵泡；等级卵泡包括 F1~F7 卵泡。

可选地，所述的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽、谷胱甘肽硫转移酶和总抗能力。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

20 本发明的方法中的饲喂 800  $\mu$ mol/kg 体重的 tBHP 能够增加卵巢自由基的含量，降低卵巢抗氧化酶活，导致卵巢细胞凋亡率增加，导致了蛋鸡产蛋率的降低，导致了蛋鸡氧化应激。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

## 25 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明饲喂不同浓度 tBHP 对蛋鸡卵巢原始卵泡和各级卵泡数目差异比较；其中，横坐标中的原始卵泡、初级卵泡、等级前卵泡和闭锁卵泡中的 6 个柱状图从左到右为 T1、T2、T3、T4、T5 和 T6；

图 2 是本发明模型对蛋鸡卵巢凋亡率的影响。

5

## 具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

### 10 实施例 1

一种蛋鸡卵巢氧化应激模型的建立方法，包括以下步骤：

15 选用产蛋高峰期即 28 周龄的曼粉蛋鸡，采用单因素试验设计，设 6 个处理，每个处理 10 个重复，每个重复 1 只鸡，分别为对照组（饲喂生理盐水）和 tBHP（叔丁基过氧化氢）组，饲喂浓度确定为：100（T2）、200（T3）、400（T4）、800（T5）、1000 $\mu$ mol/kg 体重（T6），分别于实验 8、15、22 天早上 9:00 饲喂 tBHP。最后一次饲喂后 48h 进行采样。试验期为 24 天，饲粮为玉米-豆粕型基础饲粮，根据 NRC（1994）和中国鸡饲养标准配制，具体数据见表 1，饲喂方式为定量饲喂。试验在四川农业大学教学实验基地进行。饲养管理按常规饲养管理进行，每周进行严格消毒，室温保持在 20~22℃左右，注意通风换气。试验开始预饲 2 周，前通过观察记录蛋鸡产蛋率，按产蛋率进行随机分组。

25 方法：每天记录产蛋率，通过 ELISA 方法测定雌二醇、孕酮、睾酮、瘦素、促卵泡激素、胰岛素样生长因子-1 和抗穆氏霍尔蒙的浓度。最后一次饲喂 tBHP 后 48h 收集卵巢，HE 染色后，用校正法对原始卵泡数量进行统计，并对前等级（小白、大白、小黄卵泡）和等级卵泡（F1~F7）计数和量取等级卵泡大小。利用 HPLC 和试剂盒等方法测定卵巢中的直接抗氧化物质（维生素 C、维生素 E）、脂质过氧化产物（Malondialdehyde, MDA），蛋白质过氧化产物（蛋白质羰基）、抗氧化酶（超氧化物歧化酶 SODs、过氧化氢酶 CAT、谷胱甘肽 GSH、谷胱甘肽硫转移酶 GST 和总抗氧化能力 TAOC）

含量或活性。

表 1 饲料配方

原料名称	比例	营养成分	比例
玉米	59.064	代谢能, kcal/kg	2690
小麦麸 (麸皮)	3.867	粗蛋白	16.0
大豆油	1.50	粗脂肪	4.39
豆粕 (CP43%)	15.236	粗纤维	2.69
玉米蛋白粉 (CP60%)	5.00	酸性洗涤纤维	3.75
玉米 DDGS	5.00	中性洗涤纤维	10.32
石粉 (粒状)	6.103	钙	3.70
石粉 (粉状)	2.50	总磷	0.60
磷酸氢钙 (粉状)	0.941	有效磷	0.36
氯化钠	0.250	鸡可利用赖氨酸	0.65
小苏打	0.100	鸡可利用蛋氨酸	0.33
L-赖氨酸硫酸盐 (70%)	0.162	鸡可利用胱氨酸	0.23
DL-蛋氨酸(99%)	0.012		
氯化胆碱 (60%)	0.100		
多维 <sup>1</sup>	0.015		
矿添 <sup>1</sup>	0.15		
合计	100		

注: <sup>1</sup> 矿物元素和多维预混料按中国鸡饲养标准进行配置, 并由 DSM 代工。

本实施例的技术效果如下:

1、本发明的模型对蛋鸡产蛋率的影响

5 如表 2 所示, 给蛋鸡饲喂 100、200、400μmol/kg 的 tBHP 对其产蛋率无显著影响, 饲喂 800 和 1000μmol/kg 的 tBHP 均能极显著降低蛋鸡的产蛋率 ( $P<0.01$ )。

表 2 饲喂不同浓度 tBHP 对产蛋后期蛋鸡产蛋率的影响

处理	7 天	14 天	21 天
----	-----	------	------

T1	96.00	94.29 <sup>a</sup>	92.57 <sup>a</sup>
T2	92.86	92.28 <sup>a</sup>	90.00 <sup>a</sup>
T3	92.71	90.28 <sup>a</sup>	89.71 <sup>a</sup>
T4	94.28	82.86 <sup>b</sup>	81.10 <sup>b</sup>
T5	92.86	44.45 <sup>c</sup>	36.51 <sup>c</sup>
T6	96.14	41.43 <sup>c</sup>	35.72 <sup>c</sup>
P 值	0.91	<0.01	<0.01
SEM	2.86	3.30	2.88

注：同行肩注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2、本发明的模型对蛋鸡生殖激素的影响

由表 3 可知，给蛋鸡饲喂 800 和 1000 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 21 天以后显著降低蛋鸡血液中的促卵泡激素、雌二醇和胰岛素样生长因子-1 浓度 ( $P < 0.05$ )，而饲喂 100、200、400 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 对其血液激素无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 3 饲喂不同浓度 tBHP 对蛋鸡血液生殖激素和其他代谢激素表达的影响

项目	雌二醇	促卵泡激素	胰岛素样生长因子-1	睾酮	孕酮	抗穆勒素
T1	173.15 <sup>a</sup>	25.27 <sup>a</sup>	197.07 <sup>a</sup>	106.98	8.74	813.20
T2	185.52 <sup>a</sup>	27.87 <sup>a</sup>	194.87 <sup>a</sup>	77.19	8.46	844.84
T3	181.33 <sup>a</sup>	24.69 <sup>a</sup>	192.81 <sup>a</sup>	90.36	8.34	822.36
T4	167.35 <sup>ab</sup>	20.36 <sup>ab</sup>	174.95 <sup>b</sup>	101.04	9.14	1006.66
T5	122.23 <sup>b</sup>	15.04 <sup>b</sup>	122.39 <sup>b</sup>	83.68	7.84	849.91
T6	132.94 <sup>b</sup>	15.90 <sup>b</sup>	105.01 <sup>b</sup>	43.27	7.47	686.91
SEM	16.84	2.96	15.28	22.99	0.82	148.02
P 值	0.06	0.01	<0.01	0.08	0.39	0.46

注：同行肩注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 3、本发明的模型对蛋鸡卵巢形态和各阶段卵泡计数的影响

从图 1 可以看出，给蛋鸡饲喂 800 和 1000 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 显著降低蛋鸡卵巢原始卵泡、初级卵泡和等级前卵泡的数目，增加闭锁卵泡的数目 ( $P < 0.05$ )，而 100、200 和 400 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 对卵巢各级卵泡计数没有

显著影响 ( $P>0.05$ )。

#### 4、该模型对蛋鸡卵巢氧化应激状态和抗氧化酶活的影响

由表 4 可知, 饲喂 800 和 1000  $\mu\text{mol/kg}$  tBHP 可极显著降低蛋鸡卵巢中总 SOD、还原性 GSH、抗氧化酶 Cu-ZnSOD, MnSOD, GST 的活力 ( $P<0.05$ ),

- 5 其他浓度 tBHP 对其无显著影响 ( $P>0.05$ ); 由表 5 得出, 饲喂 800 和 1000 的 tBHP 可以显著提高蛋鸡卵巢中的氧自由基、蛋白质氧化产物蛋白质羰基和脂质代谢产物 MDA 的含量 ( $P<0.05$ ), 其他浓度 tBHP 对其无显著影响 ( $P>0.05$ )。

表 4 饲喂不同浓度 tBHP 对蛋鸡卵巢抗氧化酶活力的影响

处理	总 SOD ( U/ml )	Cu-ZnSOD ( U/ml )	MnSOD ( U/ml )	GST ( U/mgprot )	GSH ( $\mu\text{mol/gprot}$ )	TAOC ( mM )
T1	193.86 <sup>a</sup>	145.51 <sup>a</sup>	193.34 <sup>a</sup>	115.73 <sup>a</sup>	37.50 <sup>a</sup>	3.26 <sup>a</sup>
T2	201.26 <sup>a</sup>	131.33 <sup>a</sup>	177.93 <sup>a</sup>	125.05 <sup>a</sup>	27.66 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>
T3	208.91 <sup>a</sup>	121.94 <sup>a</sup>	180.96 <sup>a</sup>	117.90 <sup>a</sup>	33.60 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>
T4	221.25 <sup>a</sup>	113.28 <sup>a</sup>	187.97 <sup>a</sup>	109.25 <sup>a</sup>	25.74 <sup>a</sup>	3.16 <sup>a</sup>
T5	28.85 <sup>b</sup>	38.77 <sup>b</sup>	49.36 <sup>b</sup>	26.07 <sup>b</sup>	13.43 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>
T6	37.85 <sup>b</sup>	33.11 <sup>b</sup>	34.74 <sup>b</sup>	28.17 <sup>b</sup>	12.82 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
SEM	26.50	21.14	21.57	11.86	7.13	0.09
P 值	<0.01	0.04	<0.01	0.13	0.02	0.67

表 5 饲喂不同浓度 tBHP 对蛋鸡卵巢氧化应激产物的影响

处理	氧自由基 ( nmol/mgprot )	蛋白质羰基 ( nmol/mgprot )	MDA ( nmol/mgprot )
T1	5.23	1751.93 <sup>b</sup>	1.36 <sup>b</sup>
T2	5.46	1886.45 <sup>b</sup>	1.31 <sup>b</sup>
T3	6.11	1939.32 <sup>b</sup>	1.19 <sup>b</sup>
T4	7.45	2235.97 <sup>ab</sup>	1.31 <sup>b</sup>
T5	21.14	7535.12 <sup>a</sup>	5.45 <sup>a</sup>
T6	22.34	7825.34 <sup>a</sup>	5.90 <sup>a</sup>

SEM	0.91	389.77	0.36
P 值	0.01	0.48	0.23

---

注：同行肩注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 5、本发明的模型对蛋鸡卵巢凋亡率的影响

从图 2 可以看出，给蛋鸡饲喂 800 和 1000 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 显著增加卵巢凋亡率 ( $P < 0.05$ )，而 100、200 和 400 $\mu\text{mol/kg}$  的 tBHP 对卵巢凋亡率没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。

- 5 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。