

孵化期注射叶酸对肉仔鸡生产性能及免疫功能的影响

支丽慧 李世召 杨小军* 姚军虎*

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 本试验旨在研究在种蛋孵化 11 胚龄注射不同水平叶酸对出生后肉仔鸡生产性能及免疫功能的影响。选用 114 枚萨索肉鸡种蛋, 随机分为 3 组: 生理盐水组, 每枚种蛋注射 0.1 mL 生理盐水; 45 μg 叶酸组和 90 μg 叶酸组, 每枚种蛋分别注射含 45 和 90 μg 叶酸的 0.1 mL 的生理盐水。孵化后每组 4 个重复, 每个重复 6 只鸡。孵化期 21 d, 饲养期 42 d。结果表明: 1) 孵化期注射叶酸有提高 1 日龄肉仔鸡体重的趋势 ($P=0.110$); 与生理盐水组比较, 注射叶酸提高了 21 日龄和 42 日龄肉仔鸡体重 ($P=0.055$; $P=0.069$) 及 1~21 日龄和 22~42 日龄肉仔鸡平均日增重 ($P=0.047$; $P=0.024$), 而对 1~21 日龄及 22~42 日龄肉仔鸡平均日采食量和料重比无显著影响 ($P>0.10$)。2) 孵化期注射不同水平叶酸对 42 日龄肉仔鸡法氏囊指数及 21 日龄和 42 日龄肉仔鸡脾脏指数均无显著影响 ($P>0.05$); 与生理盐水组比较, 90 μg 叶酸组 1 日龄肉仔鸡脾脏指数显著提高 ($P<0.05$); 与 45 μg 叶酸组比较, 生理盐水组和 90 μg 叶酸组 1 日龄肉仔鸡法氏囊指数显著提高 ($P<0.05$); 与生理盐水组比较, 45 μg 叶酸组 21 日龄肉仔鸡法氏囊指数显著提高 ($P<0.05$)。3) 孵化期注射不同水平叶酸对 1 日龄肉仔鸡血浆叶酸含量及 1 日龄、21 日龄和 42 日龄肉仔鸡血浆总蛋白、白蛋白含量均无显著影响 ($P>0.05$); 相比生理盐水组和 90 μg 叶酸组, 45 μg 叶酸组 1 日龄肉仔鸡血浆球蛋白含量显著提高 ($P<0.05$)。4) 孵化期注射不同水平叶酸对 1 日龄肉仔鸡肝脏总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶活性及丙二醛含量均无显著影响 ($P>0.05$)。5) 孵化期注射不同水平叶酸对 28 日龄肉仔鸡血液 CD4^+ 比例、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 及 40 日龄肉仔鸡血液 CD4^+ 比例、 CD8^+ 比例和 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 均无显著影响 ($P>0.05$); 与生理盐水组比较, 45 μg 叶酸组显著降低了 28 日龄肉仔鸡血液 CD8^+ 比例 ($P<0.05$)。由此可知, 孵化期 11 胚龄注射叶酸可改善肉仔鸡的生产性能。

关键词: 叶酸; 生产性能; 免疫功能; 肉仔鸡

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)11-2567-09

叶酸是一种水溶性的 B 族维生素, 普遍存在于各种动植物性食品中, 与机体的多种功能密切相关: 参与遗传物质和蛋白质的代谢; 影响动物繁殖; 促进动物生长及提高动物免疫力等。但由于叶酸在动物体内循环速度快, 且各种动物不同时期需要量不同及在饲料中含量不稳定, 所以动物

体易发生叶酸缺乏现象。胚胎期是幼体形成的关键时期, 这一时期只有提供充足的营养物质才能保证胚胎的正常发育。哺乳动物胚胎期可借助母体从外界获取各种营养物质, 而肉鸡的胚胎发育过程是与母体脱离的, 因此只能依赖于通过母鸡沉积在种蛋中的能量和营养物质^[1]。从种蛋开始

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272464, 31001017); 教育部新世纪优秀人才(NCET-12-0476); 陕西省科技新星基金(2012KJXX-18)

作者简介: 支丽慧(1987—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 研究方向为免疫营养与调控。E-mail: zhilihui0308@126.com

* 通讯作者: 杨小军, 副教授, 硕士生导师, E-mail: yangxj@nwsuaf.edu.cn; 姚军虎, 教授, 博士生导师, E-mail: yaojunhu2004@sohu.com

孵化到出壳需要21 d,这一时期如果出现营养物质不足,特别是在种蛋中不易沉积的维生素不足,将会影响胚胎的发育。报道指出,整个孵化阶段可分为3个1/3期,即孵化前1/3期是胚胎建立期,中间1/3期是胚胎形成完成期,后1/3期是准备出雏期^[2]。因此,想要发挥营养物质对胚胎发育的作用,进而影响后期机体的生产性能和免疫功能需要从种蛋入手。许多研究已表明,孵化期注射碳水化合物^[3]、氨基酸^[4-6]、微量元素^[7]、维生素E^[8]等都会影响肉仔鸡后期生产性能和免疫功能。同时有研究表明,种蛋注射可作为一种提高孵化后肉仔鸡生长速度和肌肉沉积的有效方法,而且这项技术已在早期就获得了专利^[9-10]。叶酸在蛋鸡上的应用已有报道,但是在肉鸡方面,特别是孵化期注射叶酸的研究鲜有报道。本试验旨在通过在种蛋孵化的11胚龄注射不同水平的叶酸,研究其对出生后肉仔鸡的生产性能及免疫功能的影响,为营养物质在孵化期发挥其对后期肉仔鸡健康水平促进的功能提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及试验设计

孵化机,购于北京蓝天蛟电子有限公司。

叶酸标准品(Sigma): $C_{10}H_{19}N_7O_6$,纯度 $\geq 97\%$ 。

选用114枚萨索肉鸡种蛋,采用单因子完全随机设计,将其分为3组:生理盐水组(每枚种蛋注射0.1 mL生理盐水)、45 μg 叶酸组(每枚种蛋注射含45 μg 叶酸的0.1 mL的生理盐水)、90 μg 叶酸组(每枚种蛋注射含90 μg 叶酸的0.1 mL的生理盐水)。孵化后每组4个重复,每个重复6只鸡。孵化期21 d,饲养期42 d。

叶酸注射液的配制:分别称取2.25、4.50 mg的叶酸,加4.50 mL蒸馏水,然后滴加1.0 mol/L NaOH至叶酸完全溶解,再用0.1 mol/L HCl调pH至6.8~7.2,最后定容至5 mL,则分别配制成450和900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的叶酸注射液。

孵化期间参数:温度,前期(1~10 d)控制在38.0~38.2 $^{\circ}\text{C}$,后期(11~19 d)控制在37.8~38.0 $^{\circ}\text{C}$;整个孵化期湿度控制在45%~65%;翻蛋周期为120 min,翻蛋时间为180 s;孵化前期注意控温,孵化后期注意通风换气。注射部位为卵

黄囊(种蛋大头约1/3处)。

1.2 试验饲料与饲养管理

试验参照NRC(1994)肉鸡营养需要配制基础饲料,基础饲料组成及营养水平见表1。所有试鸡采用舍内笼养方式,各重复均匀分布于鸡舍。自由采食、饮水。按常规程序进行鸡只免疫和栏舍消毒。

1.3 样品采集与制备

1.3.1 血液的采集与样品制备

分别于试验第1天、第21天和第42天,每个重复挑选与该重复平均体重相近的肉仔鸡1只,翅静脉采集2~8 mL的血样于含肝素钠的EP管中,2 500 r/min离心10 min,分装后,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于血浆生化指标及血浆叶酸含量的测定。同时,对28日龄和40日龄的血样进行流式细胞分析。

1.3.2 免疫器官采集

分别于试验第1天、第21天和第42天,每个重复挑选与该重复平均体重相近的肉仔鸡1只,屠宰,收集脾脏和法氏囊,称重,用于计算免疫器官指数。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 生产性能

试验期间每周测定各组肉仔鸡采食量、体增重,计算平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG)和料重比(F/G)。

1.4.2 免疫器官指数

$$\text{免疫器官指数}(\text{g}/\text{kg}) = \frac{\text{免疫器官重量}(\text{g})}{\text{活体重}(\text{kg})}$$

1.4.3 血浆叶酸含量

血浆叶酸含量采用微生物法^[11]测定。

1.4.4 血浆生化指标

血浆总蛋白、白蛋白含量采用试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)测定。

1.4.5 肝脏抗氧化指标

肝脏中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性采用邻苯三酚自氧化法测定,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性采用二硫代二硝基苯甲酸比色法测定,丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法在酶标仪上用南京建成生物工程研究所提供的相应试剂盒测定。

表 1 基础饲料组成及营养水平(饲喂基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (as-fed basis)

%

项目 Items	含量 Content	
	1 ~ 21 日龄 1 to 21 days of age	22 ~ 42 日龄 22 to 42 days of age
原料 Ingredients		
玉米 Corn	59.82	60.07
豆粕(43%粗蛋白质) Soybean meal (43% CP)		18.50
豆粕(46%粗蛋白质) Soybean meal (46% CP)	25.50	
棉籽粕 Cottonseed meal	2.00	3.50
石粉 Limestone	1.40	0.90
小麦 Wheat		5.40
玉米干酒糟及其可溶物 Corn DDGS		5.00
进口肉骨粉 Import meat and bone meal		2.00
国产鱼粉 Domestic fish meal	1.50	
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.50	0.60
DL-蛋氨酸 DL-Met (98%)	0.20	
L-赖氨酸盐酸盐 L-Lys · HCl (65%)		0.40
液体蛋氨酸 Fluid Met	0.20	0.13
苏氨酸 Thr	0.03	0.05
次粉 Wheat middling	5.00	
豆油 Soybean oil	1.00	1.60
氯化胆碱 Choline chloride	0.10	0.10
食盐 NaCl	0.25	0.25
预混料 Premix ²⁾	1.50	1.50
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels		
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.14	12.56
粗蛋白质 CP	20.00	18.50
赖氨酸 Lys	1.17	1.00
蛋氨酸 Met	0.49	0.40
苏氨酸 Thr	0.78	0.72
色氨酸 Trp	0.21	0.19
食盐 NaCl	0.33	0.35
钙 Ca	1.00	0.90
总磷 TP	0.66	0.60
有效磷 AP	0.42	0.38

预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of diets: VA 9 200 IU, VD₃ 3 000 IU, VE 38 mg, VK₃ 3 mg, VB₁ 3 mg, VB₂ 10 mg, VB₆ 5 mg, VB₁₂ 0.04 mg, 烟酰胺 niacinamide 40 mg, 泛酸钙 calcium pantothenate 16 mg, 叶酸 folic acid 2 mg, 生物素 biotin 0.3 mg, Fe 66 mg, Cu 15 mg, Mn 95.4 mg, Zn 96.6 mg, I 0.38 mg, Se 0.41 mg。

1.4.6 流式细胞分析

分别在 28 日龄和 42 日龄时,每个组随机选取 4 只鸡,翅静脉采血至需要量,置于肝素抗凝管内。用微量取样器沿管壁取 1 mL 抗凝血于一次性试管中,迅速加入低温保存的磷酸盐缓冲液(PBS) 1 mL,慢慢混匀,将混合液沿管壁缓慢加入到盛有 2 mL 淋巴细胞分层液(预置于室温)的试管中,2 000 r/min离心 25 min;用一次性吸管吸取中间乳白色淋巴细胞层于预冷的离心管中,加适量

PBS,混匀,4 ℃下 2 000 r/min 离心 15 min;倾弃上清液,再加适量 PBS,混匀,4 ℃下 2 000 r/min 离心 10 min;加入 PBS 500 μL,充分混匀,分装 200 μL 的混悬液 3 份,分别加入 CD₃ 单抗和 CD₈ 单抗各 10 μL,CD₄ 单抗 5 μL,充分混匀,低温避光孵育 30 min;加 PBS 到 0.5 mL,于 4 ℃下 1 500 r/min离心 5 min,加 PBS 上流式细胞仪测定。

1.5 数据处理

试验数据均以“平均值±标准差”表示,采用SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,LSD 法多重比较检验。

2 结果

2.1 生产性能及器官指数

由表2可知,孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对1~21 日龄和22~42 日龄肉仔鸡的ADFI 和F/G 均无显著影响($P>0.10$),但对1~21 日龄和22~42 日龄肉仔鸡的ADG 产生了影响($P=0.050$),与生理盐水组比较,45 μg 叶酸组和90 μg 叶酸组肉仔鸡的ADG 显著提高($P=0.047$; $P=0.024$)。孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸有提高1 日龄肉仔鸡体重的趋势($P=0.110$),对21 日龄肉仔鸡体重产生了影响($P=0.055$),且与生理盐水组比较,45 μg 叶酸组和90 μg 叶酸组肉仔鸡体重不同程度提高($P=0.026$; $P=0.053$),而叶酸组之间无显著差异($P>0.10$),对42 日龄肉仔鸡体重也产生了影响($P=0.069$),且与生理盐水组比较,45 μg 叶酸组和90 μg 叶酸组肉仔鸡体重有不同程度提高($P=0.050$; $P=0.038$),而叶酸组之间无显著差异($P>0.10$)。

孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对21 日龄和42 日龄肉仔鸡脾脏指数无显著影响($P>0.05$),但对1 日龄肉仔鸡脾脏指数产生了显著影响($P=0.022$),且与生理盐水组比较,90 μg 叶酸组脾脏指数显著增加($P=0.007$),而生理盐水组和45 μg 叶酸组以及2 个叶酸组之间无显著差异($P>0.05$)。孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对42 日龄肉仔鸡法氏囊指数无显著影响($P>0.05$),但与45 μg 叶酸组比较,生理盐水组和90 μg 叶酸组显著增加了1 日龄肉仔鸡法氏囊指数($P=0.036$; $P=0.047$),而生理盐水组和90 μg 叶酸组之间无显著差异($P>0.05$),且45 μg 叶酸组相比生理盐水组显著增加了21 日龄肉仔鸡法氏囊指数($P=0.025$)。

2.2 血浆指标

由表3可知,孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对1 日龄肉仔鸡血浆叶酸含量及1 日龄、21 日龄和42 日龄肉仔鸡血浆总蛋白和白蛋白含量均无显著影响($P>0.05$),对21 日龄和42 日龄肉仔鸡血浆球蛋白含量也无显著影响($P>0.05$),但对

1 日龄肉仔鸡血浆球蛋白含量产生了显著影响($P=0.049$),与生理盐水组和90 μg 叶酸组比较,45 μg 叶酸组肉仔鸡血浆球蛋白含量显著升高($P=0.035$; $P=0.023$),生理盐水组和90 μg 叶酸组之间无显著差异($P>0.05$)。

2.3 1 日龄肉仔鸡肝脏抗氧化能力

由表4可知,孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对1 日龄肉仔鸡肝脏总超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性以及丙二醛含量均无显著影响($P>0.05$)。

2.4 肉仔鸡血液 T 淋巴细胞比例

由表5可知,孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对28 日龄肉仔鸡血液 CD4^+ 比例、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 及40 日龄肉仔鸡血液 CD4^+ 比例、 CD8^+ 比例、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 均无显著影响($P>0.05$),但与生理盐水组比较,注射45 和90 μg 叶酸有提高40 日龄肉仔鸡血液 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 的趋势($P>0.05$)。孵化期11 胚龄注射不同水平叶酸对28 日龄血液 CD8^+ 比例产生了显著影响($P=0.028$),45 μg 叶酸组 CD8^+ 比例较生理盐水组显著降低($P=0.010$),而90 μg 叶酸组与生理盐水组和45 μg 叶酸组比较均无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 孵化期11 胚龄注射叶酸对肉仔鸡生产性能和免疫器官指数的影响

目前,饲料中添加叶酸对动物生产性能的研究相对较多,而有关孵化期注射叶酸对肉仔鸡生产性能的研究报道不多。叶酸是所有动物繁殖过程中所需的关键维生素,且与产蛋需要量相比,孵化需要量更高^[12]。同时,叶酸能够提高动物生产性能,其不足或过量可通过影响动物机体的蛋白质代谢影响机体蛋白质的合成,最终对动物生产性能产生影响^[13]。晏家友^[14]研究发现,在母猪饲料中补充叶酸,可提高种猪的繁殖性能和仔猪的断奶重($P<0.05$)。葛文霞^[15]在研究中指出,饲料中添加叶酸显著提高了1 日龄艾维茵商品肉仔鸡的日增重和日采食量($P<0.05$),同样有研究表明在种鸡饲料添加叶酸可提高肉仔鸡体重($P<0.05$),从而影响肉仔鸡的生长速度和料重比($P<0.05$)^[16]。本试验中,肉仔鸡父母代饲料中的叶酸含量为24.32 mg/kg,而在孵化期11 胚龄注射45 和90 μg 叶酸显著增加了1~21 日龄和22~42 日龄肉仔鸡的ADG($P=0.047$; $P=0.024$),且叶

酸组不同程度地提高了肉仔鸡的体重,表明孵化期注射叶酸可在一定程度上提高肉仔鸡的生产性能,与以上饲料中添加叶酸试验结果类似,说明种鸡若饲料中叶酸缺乏可能会影响肉仔鸡的生长,进而表明叶酸在禽类存活及生长方面起重要作用,可促进机体的生长^[17]。而有研究发现,种鸡饲

粮中添加叶酸对肉仔鸡的生产性能无显著影响($P > 0.05$)^[18]。Rebel 等^[7]也发现,种鸡和肉鸡饲料中添加维生素和微量元素对肉鸡体重和 ADFI 无显著影响($P > 0.05$),对脾脏指数也无显著影响($P > 0.05$)。以上试验结果的不同可能是由于作用时间、添加剂量、动物品种等因素不同而造成的。

表 2 孵化期 11 胚龄注射不同水平叶酸对肉仔鸡生产性能和免疫器官指数的影响

Table 2 Effects of injecting different levels of folic acid at 11 embryonic ages during incubation period on performance and immune organ indices of broilers

项目 Items	日龄 Days of age/d	叶酸水平 Folic acid level/ μg		
		0	45	90
平均日采食量 ADFI/g		55.53 \pm 2.78	56.50 \pm 4.22	54.03 \pm 3.59
平均日增重 ADG/g	1 ~ 21	3.78 \pm 0.89 ^a	8.15 \pm 1.19 ^b	7.38 \pm 1.23 ^b
料重比 F/G		1.82 \pm 0.22	1.78 \pm 0.32	1.50 \pm 0.16
平均日采食量 ADFI/g		151.63 \pm 27.83	175.57 \pm 24.65	177.07 \pm 10.27
平均日增重 ADG/g	22 ~ 42	27.38 \pm 6.92 ^a	57.43 \pm 11.97 ^b	63.53 \pm 1.26 ^b
料重比 F/G		4.61 \pm 0.97	3.73 \pm 0.74	4.16 \pm 1.31
体重 BW/g	1	43.20 \pm 0.58 ^b	39.20 \pm 1.91 ^a	40.20 \pm 1.02 ^{ab}
	21	123.00 \pm 18.00 ^a	209.50 \pm 24.50 ^b	195.80 \pm 25.18 ^b
	42	807.60 \pm 71.28 ^a	1 314.80 \pm 221.15 ^b	1 358.60 \pm 171.86 ^b
脾脏指数 Spleen index/(10^{-2} g/kg)	1	2.22 \pm 0.01 ^a	3.14 \pm 0.01 ^{ab}	4.40 \pm 0.01 ^b
	21	22.40 \pm 0.01	18.30 \pm 0.01	27.30 \pm 0.01
	42	13.80 \pm 0.01	35.80 \pm 0.01	18.50 \pm 0.01
法氏囊指数 Bursa of Fabricius index/ (10^{-2} g/kg)	1	12.80 \pm 0.01 ^b	7.30 \pm 0.01 ^a	12.50 \pm 0.01 ^b
	21	10.80 \pm 0.01 ^a	21.30 \pm 0.01 ^b	15.30 \pm 0.01 ^{ab}
	42	19.10 \pm 0.01	21.10 \pm 0.01	14.30 \pm 0.01

同行生产性能数据肩标不同小写字母表示在 $P < 0.10$ 水平上差异显著,无字母或相同字母表示差异不显著($P > 0.10$)。

In the same row, values of performance with different small letter superscripts mean significant difference at $P < 0.10$, while no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.10$).

同行器官指数数据肩标不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,无字母或相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

In the same row, values of organ indices with different small letter superscripts mean significant difference at $P < 0.05$, while no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

脾脏、胸腺和法氏囊指数可用于评价禽类的免疫状态。一般认为免疫器官重量减小为免疫抑制所致,而免疫器官重量增加代表免疫增强^[19]。本试验中注射 90 μg 叶酸显著提高了 1 日龄肉仔鸡的脾脏指数($P < 0.05$),注射 45 μg 叶酸显著提高了 21 日龄肉仔鸡法氏囊指数($P < 0.05$),说明注射叶酸可影响免疫器官指数进而影响肉仔鸡的免疫状态,从而间接影响动物的生产性能。

3.2 孵化期 11 胚龄注射叶酸对肉仔鸡血浆指标的影响

机体出现缺陷是由于营养物质的摄入不足,

而有些维生素对于氨基酸转化为球蛋白是必需的。因此,如果机体维生素摄入不足,则会影响机体免疫力,进而出现缺陷现象。叶酸缺乏会引起代谢异常,从而导致白蛋白减少、贫血,进而影响机体的免疫功能^[20]。有研究报道,蝶酰谷氨酸对提高肉仔鸡的免疫力有重要作用^[21]。本试验中注射叶酸对 1 日龄肉仔鸡血浆叶酸含量无显著影响($P > 0.05$),这与 Schweigert 等^[22]在饲料中添加叶酸的研究结果相似,而注射 45 μg 叶酸显著增加了血浆球蛋白含量($P < 0.05$),这与 Munyaka 等^[23]添加叶酸试验结果一致。这说明注射的叶酸

在血液中部分用于免疫蛋白的合成,从而对肉仔鸡的免疫功能产生一定影响,表明叶酸可通过参与球蛋白的合成而影响机体的免疫状态,最终间接提高动物的生产性能。但本试验在血液指标的

测定中由于个体误差对结果的精密性产生一定影响,这也可能是由于不同个体对注射的叶酸产生的不同反应,以后需通过增加样本数量等方法来避免这一问题的出现。

表 3 孵化期 11 胚龄注射不同水平叶酸对肉仔鸡血浆指标的影响

Table 3 Effects of injecting different levels of folic acid at 11 embryonic ages during incubation period on plasma parameters of broilers

项目 Items	日龄 Days of age/d	叶酸水平 Folic acid level/ μg		
		0	45	90
叶酸 FA/(ng/L)	1	11.44 \pm 0.86	11.90 \pm 0.23	10.56 \pm 1.03
	1	23.32 \pm 0.86	25.28 \pm 0.71	24.82 \pm 1.25
总蛋白 TP/(g/L)	21	35.25 \pm 5.27	35.40 \pm 3.19	40.38 \pm 4.49
	42	46.17 \pm 5.63	55.49 \pm 11.10	46.89 \pm 8.38
白蛋白 Albumin/(g/L)	1	15.76 \pm 0.90	14.22 \pm 1.06	18.00 \pm 1.21
	21	22.55 \pm 2.80	26.78 \pm 1.88	24.58 \pm 1.45
球蛋白 Globulin/(g/L)	42	24.00 \pm 5.80	24.20 \pm 2.69	22.25 \pm 4.38
	1	7.56 \pm 0.58 ^a	11.06 \pm 1.12 ^b	6.82 \pm 1.53 ^a
球蛋白 Globulin/(g/L)	21	12.70 \pm 4.64	8.63 \pm 1.62	15.80 \pm 3.93
	42	22.17 \pm 5.77	31.29 \pm 10.45	24.64 \pm 4.08

同行数据肩标不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,无字母或相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference at $P < 0.05$, while no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

表 4 孵化期 11 胚龄注射不同水平叶酸对肉仔鸡肝脏抗氧化能力的影响

Table 4 Effects of injecting different levels of folic acid at 11 embryonic ages during incubation period on liver antioxidant capacity of broilers

项目 Items	叶酸水平 Folic acid level/ μg		
	0	45	90
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mg prot)	10.87 \pm 3.45	5.62 \pm 1.20	7.61 \pm 1.72
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)	115.26 \pm 56.92	108.39 \pm 30.01	81.23 \pm 26.08
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	1.30 \pm 0.11	1.36 \pm 0.13	1.62 \pm 0.13

表 5 孵化期 11 胚龄注射不同水平叶酸对肉仔鸡血液 T 淋巴细胞比例的影响

Table 5 Effects of injecting different levels of folic acid at 11 embryonic age during incubation period on T lymphocyte percentages in blood of broilers

项目 Items	日龄 Days of age/d	叶酸水平 Folic acid level/ μg		
		0	45	90
CD4 ⁺ /%		8.03 \pm 1.13	4.30 \pm 0.67	5.73 \pm 1.15
CD8 ⁺ /%	28	30.03 \pm 5.58 ^b	11.95 \pm 2.21 ^a	21.38 \pm 3.50 ^{ab}
CD4 ⁺ /CD8 ⁺		6.73 \pm 1.24	3.15 \pm 0.50	5.18 \pm 1.10
CD4 ⁺ /%		9.57 \pm 0.68	10.93 \pm 3.20	13.50 \pm 4.05
CD8 ⁺ /%	40	38.03 \pm 6.02	29.03 \pm 2.25	43.30 \pm 14.02
CD4 ⁺ /CD8 ⁺		5.80 \pm 1.25	7.03 \pm 1.38	12.37 \pm 4.60

3.3 孵化期 11 胚龄注射叶酸对 1 日龄肉仔鸡肝脏抗氧化能力的影响

Pravenec 等^[24]发现,叶酸不足的饲料可降低小鼠的肝脏、肾脏及心脏抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶)的活性($P < 0.01$)。本试验中注射叶酸对 1 日龄肉仔鸡肝脏抗氧化能力无显著影响($P > 0.05$)。叶酸影响氧化应激的机理:叶酸不足会促进机体的氧化应激,原因是在叶酸水平降低的同时同型半胱氨酸水平升高,此过程与抗氧化酶活性降低有关(如谷胱甘肽过氧化物酶活性的降低等),从而导致机体发生氧化应激。正常情况下,同型半胱氨酸浓度越低,机体越能保持完美的生化平衡,如果同型半胱氨酸浓度不在较低或平衡范围内,将导致机体的氧化和衰老等现象的发生。本试验出现的结果可能是因为注射的叶酸没有在肝脏中达到一定多的沉积量,而主要用于循环系统中的叶酸需要,从而对肝脏的抗氧化能力无显著作用。另一个可能的原因是叶酸作用具有组织、器官特异性,而其肝脏中同型半胱氨酸浓度比较低,使叶酸对肝脏的抗氧化能力无显著作用。

3.4 孵化期 11 胚龄注射叶酸对肉仔鸡血液 T 淋巴细胞分化群的影响

研究报道,维生素、微量元素、脂类、蛋白质及核苷酸在调节细胞免疫和体液免疫过程中发挥关键作用,营养素不足或过量都可对免疫功能产生不利影响,从而使机体易受病原感染^[25-26]。许多维生素被证明可影响抗体的产生及具有抗感染能力^[27]。而淋巴细胞亚群的稳定是维持机体正常免疫调节功能所必需的,是评价机体细胞免疫功能的重要指标。现代免疫学理论认为,机体 T 淋巴细胞各亚群之间相互平衡、互相调节,使机体对外来抗原袭击产生正常免疫应答,并维持机体的免疫平衡状态。因此,CD4⁺、CD8⁺可作为评估免疫状态的主要依据,其比值降低是免疫缺陷的标志^[28-29]。研究表明,种鸡饲料中添加叶酸对血液及脾脏中的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺比例以及 CD4⁺/CD8⁺均无显著影响($P > 0.05$)^[23]。而 Field 等^[30]发现在小鼠饲料中添加叶酸可缓解因年龄造成的 T 细胞群分化、增殖降低的状况。在叶酸缺乏情况下,T 细胞在分裂素刺激下的分裂能力降低^[31],添加叶酸则可增强 T 细胞的增殖^[32]。且有报道指出 CD4⁺/CD8⁺高与肉鸡高的免疫力有关^[33]。本试验中注射 45 μg 叶酸显著降低了 28

日龄肉仔鸡血液中 CD8⁺比例($P < 0.05$),说明注射叶酸在一定程度上可影响 T 淋巴细胞亚群,从而对肉仔鸡的免疫力产生作用,最终影响肉仔鸡的生产性能。

4 结 论

本试验结果表明,孵化期 11 胚龄注射叶酸可改善肉仔鸡生产性能。

参考文献:

- [1] VIEIRA S L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients [J]. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 2007, 9(1): 1-8.
- [2] MORAN E T, Jr. Nutrition of the developing embryo and hatchling [J]. Poultry Science, 2007, 86(5): 1043-1049.
- [3] UNI Z, FERKET P R, TAKO E, et al. *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos [J]. Poultry Science, 2005, 84(5): 764-770.
- [4] AL-MURRANI W K. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl [J]. British Poultry Science, 1982, 23(2): 171-174.
- [5] BHANJA S K, MANDAL A B, GOSWAMI T K. Effect of *in ovo* injection of amino acids on growth, immune response, development of digestive organs and carcass yields of broiler [J]. Indian Journal of Poultry Science, 2004, 39(3): 212-218.
- [6] BAKYARAJ S, BHANJA S K, MAJUMDAR S, et al. Modulation of post-hatch growth and immunity through *in ovo* supplemented nutrients in broiler chickens [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(2): 313-320.
- [7] REBEL J M J, VAN DAM J T P, ZEKARIAS B, et al. Vitamin and trace mineral content in feed of breeders and their progeny: effects of growth, feed conversion and severity of malabsorption syndrome of broilers [J]. British Poultry Science, 2004, 45(2): 201-209.
- [8] HOSSAIN S, BARRETO S L, BERTECHINI A G, et al. Influence of dietary vitamin E level on egg production of broiler breeders, and on the growth and immune response of progeny in comparison with the progeny from eggs injected with vitamin E [J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 73(3): 307-317.
- [9] FOYE O T, UNI Z, FERKET P R. Effect of *in ovo* feeding egg white protein, beta-hydroxy-beta-methyl-

- butyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys[J]. Poultry Science, 2006, 85(7):1185-1192.
- [10] UNI Z, FERKET P R. Enhancement of development of oviparous species by *in ovo* feeding: US, EP 1307230 A2[P]. 2003-05-07.
- [11] 皇甫照, 王毓明, 郑家驹. 96孔板微生物法微量测定血浆和红细胞内叶酸含量[J]. 卫生研究, 2003, 32(1):56-57.
- [12] TAYLOR L W. The effect of folic acid on egg production and hatchability[J]. Poultry Science, 1947, 26(4):372-376.
- [13] 杨光波, 陈代文, 余冰. 叶酸水平对断奶仔猪生长性能及血清组织中蛋白质代谢的指标影响[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(5):24-28.
- [14] 晏家友. 叶酸在养猪生产中的应用[J]. 养猪, 2012(6):15-16.
- [15] 葛文霞. 烟酸和不同水平叶酸对肉仔鸡生产性能和血清理化指标影响的研究[D]. 硕士学位论文. 石河子: 石河子大学, 2006.
- [16] ROBEL E J. Evaluation of egg injection of folic acid and effect of supplemental folic acid on hatchability and poult weight[J]. Poultry Science, 1993, 72(3):546-553.
- [17] LEE C D, BELCHER L, MILLER D. Field observation of folacin deficiency in poult[J]. Avian Diseases, 1965, 9(4):504-512.
- [18] HOUSE J, BRAUN K, BALLANCE D, et al. The enrichment of eggs with folic acid through supplementation of the laying hen diet[J]. Poultry Science, 2002, 81(9):1332-1337.
- [19] RIVAS A L, FABRICANT J. Indications of immunodepression in chickens infected with various strains of Marek's disease virus[J]. Avian Diseases, 1988, 32(1):1-8.
- [20] DAY P L, MIMS V, TOTTER J R, et al. The successful treatment of vitamin M deficiency in the monkey with highly purified *Lactobacillus casei* factor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1945, 157(1):423-424.
- [21] LITTLE P, OLESON J, ROESCH P. The effect of pteroylglutamic acid on some immune responses of chicks[J]. The Journal of Immunology, 1950, 65(5):491-498.
- [22] SCHWEIGERT B S, GERMAN H L, PEARSON P B, et al. Effect of the pteroylglutamic acid intake on the performance of turkeys and chickens[J]. The Journal of Nutrition, 1948, 35(1):89-102.
- [23] MUNYAKA P M, TACTACAN G, JING M, et al. Immunomodulation in young laying hens by dietary folic acid and acute immune responses after challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. Poultry Science, 2012, 91(10):2454-2463.
- [24] PRAVENEK M, KOZICH V, KRIJIT J, et al. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats[J]. American Journal of Hypertension, 2013, 26(1):135-140.
- [25] AMATI L, CIRIMELE D, PUGLIESE V, et al. Nutrition and immunity: laboratory and clinical aspects[J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9(24):1924-1931.
- [26] FIELD C J, JOHNSON I R, SCHLEY P D. Nutrients and their role in host resistance to infection[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2002, 71(1):16-32.
- [27] CANNON P R. Antibodies and the protein-reserves[J]. Journal of Immunology, 1942, 44(2):107-114.
- [28] 李淑芳, 李英, 张继东, 等. 米糠多糖对不同免疫状态雏鸡外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 河北农业科学, 2008, 12(5):74-76.
- [29] STRONG J, WANG Q, KILLEEN N. Impaired survival of T helper cells in the absence of CD4[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(5):2566-2571.
- [30] FIELD C J, VAN AERDE A, DRAGER K L, et al. Dietary folate improves age-related decreases in lymphocyte function[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006, 17(1):37-44.
- [31] DHUR A, GALAN P, HERCBERG S. Folate status and the immune system[J]. Progress in Food & Nutrition Science, 1991, 15(1/2):43-60.
- [32] WINTERGERST E S, MAGGINI S, HORNIG D H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2007, 51(4):301-323.
- [33] BRIDLE B W, JULIAN R, SHEWEN P E, et al. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2006, 70(3):183-190.

Injecting Folic Acid during Incubation Period: Effects on Performance and Immune Function of Broilers

ZHI Lihui LI Shizhao YANG Xiaojun* YAO Junhu*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of injecting different levels of folic acid at 11 embryonic ages during incubation period on performance and immune function of broilers. A total of 114 (Sasso) hatching eggs were randomly subjected to one of the following 3 groups: saline group (injected 0.1 mL saline per egg), 45 μg folic acid group (injected 0.1 mL saline with 45 μg folic acid per egg) and 90 μg folic acid group (injected 0.1 mL saline with 90 μg folic acid per egg). Each group was allocated to 4 replicates with 6 broilers per replicate after incubation. The incubation period was 21 days and the feeding period was 42 days. The results showed as follows: 1) injecting folic acid during incubation period had an increasing trend in the body weight of 1-day-old broilers ($P=0.110$), and compared with saline group, injecting folic acid significantly increased the body weight of broilers aged 21 and 42 days ($P=0.055$; $P=0.069$), and the average daily gain (ADG) of broilers aged 1 to 21 days and 22 to 42 days ($P=0.047$; $P=0.024$), while had no significant effects on the average daily feed intake (ADFI) and feed/gain (F/G) of broilers aged from 1 to 21 days and from 22 to 42 days ($P>0.10$). 2) Injecting folic acid during incubation period had no significant effects on the index of bursa of Fabricius of broilers aged 42 days and the spleen index of broilers aged 21 and 42 days ($P>0.05$); injecting 90 μg folic acid significantly increased the spleen index of 1-day-old broilers compared with saline group ($P<0.05$), compared with 45 μg folic acid group, injecting saline and 90 μg folic acid significantly increased the index of bursa of Fabricius of 1-day-old broilers ($P<0.05$), and compared with saline group, injecting 45 μg folic acid significantly increased the index of bursa of Fabricius of broilers aged 21 days ($P<0.05$). 3) Injecting folic acid during incubation period had no significant effects on plasma folic acid content of 1-day-old broilers and plasma total protein and albumin contents of broilers aged 1, 21 and 42 days ($P>0.05$), and compared with saline group and 90 μg folic acid group, injecting 45 μg folic acid significantly increased plasma globulin content of 1-day-old broilers ($P<0.05$). 4) Injecting folic acid during incubation period had no significant effects on the activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA) content in liver of 1-day-old broilers ($P>0.05$). 5) Injecting folic acid during incubation period had no significant effects on the CD4^+ percentage and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in blood of broilers aged 28 days, and the percentages of CD4^+ and CD8^+ and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in blood of broilers aged 40 days ($P>0.05$); while injecting 45 μg folic acid significantly decreased the CD8^+ percentage in blood of broilers aged 28 days compared with saline group ($P<0.05$). Based on the results of the experiment, it is concluded that injecting folic acid to egg at 11 embryonic ages during incubation period can improve the performance of broilers. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25 (11):2567-2575]

Key words: folic acid; performance; immune function; broilers

* Corresponding author, YANG Xiaojun, associate professor, E-mail: yangxj@nwsuaf.edu.cn; YAO Junhu, professor, E-mail: yaojunhu2004@sohu.com