

低磷浓度下原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞对磷吸收及相关转运载体表达的研究

吕娜 吕林 廖秀冬 张丽阳 罗绪刚*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,矿物元素营养研究室,北京 100193)

摘要: 本试验旨在研究低磷浓度下原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞对磷吸收及相关磷转运载体的表达。试验采用单因子完全随机设计,设0(对照组)、0.5、1.0、2.0和4.0 mmol/L 5个不同磷浓度组,每组6个重复,孵育时间为87 min。结果表明:不同磷浓度对十二指肠上皮细胞中磷吸收率有显著影响($P < 0.05$),磷吸收率随着磷浓度的增加呈线性或二次曲线增加($P < 0.05$)。与对照组相比,4.0 mmol/L组的十二指肠上皮细胞中Ⅱb型钠磷协同转运载体(*NaPi-Ⅱb*)和无机磷转运载体1(*PiT-1*)的mRNA相对表达量显著降低($P < 0.05$),而4.0 mmol/L组的十二指肠上皮细胞中无机磷转运载体2(*PiT-2*)的mRNA相对表达量无显著变化($P > 0.05$)。不同磷浓度对十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*蛋白表达无显著影响($P > 0.05$)。由此可见,随着孵育液磷浓度的增加,细胞磷吸收率增加;当孵育液中磷浓度为4.0 mmol/L时,原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞可通过下调*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1*的mRNA表达来调节磷的吸收。

关键词: 十二指肠上皮细胞;鸡胚;磷;吸收

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2019)09-4186-08

磷是动物机体不可或缺的矿物元素^[1]。对于肉用家禽,磷的作用更为重要。因此,需要在饲料中添加无机矿物质磷来满足肉鸡的生长需要。但是,以植物性饲料为主的肉鸡饲料中的磷大部分以植酸磷的形式存在,很大部分不能被机体吸收利用,未被利用的磷会随粪便排出体外,造成环境污染^[2-3]。因此,在低磷状态下磷在小肠中的转运吸收分子机制还需要更深入的研究,这对于节约饲料资源并减少环境污染有重要意义。研究发现,十二指肠是磷吸收的主要场所,也是Ⅱb型钠磷协同转运载体(type Ⅱb sodium-phosphate co-transporter, *NaPi-Ⅱb*)表达的主要场所^[4-5]。且肉鸡机体可通过调节十二指肠*NaPi-Ⅱb*、无机磷转运载体1(inorganic phosphate transporter 1, *PiT-1*)

和无机磷转运载体2(inorganic phosphate transporter 2, *PiT-2*)的表达,来调节其对磷的吸收^[4]。同时也有大量文献报道,低磷可促进肉鸡小肠*NaPi-Ⅱb*的表达^[6-7]。本实验室张树敏^[8]利用原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞吸收模型,研究了不同磷浓度(0、6和48 mmol/L)下原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞中相关磷转运载体(*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*)mRNA表达水平的变化,但其结果表明,该试验所设6和48 mmol/L的孵育液磷浓度过高,不能解释磷转运吸收提高的分子机制。因此,本试验在以上试验的基础上,通过研究低磷浓度下原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞磷吸收及相关磷转运载体的表达,揭示磷转运吸收的分子机制,并为后续小肠磷吸收分子机制研

收稿日期:2019-03-06

基金项目:国家自然科学基金重点项目(31630073);国家自然科学基金面上项目(31472116);国家重点研发计划项目(2017YFD0502200);国家现代农业产业技术体系岗位专家专项经费(CARS-41);中国农业科学院科技创新工程专项经费(ASTIP-IAS09)

作者简介:吕娜(1993—),女,河北承德人,硕士研究生,从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: 1715803225@qq.com

*通信作者:罗绪刚,研究员,博士生导师, E-mail: wlysz@263.net

究中磷孵育浓度设置奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验采用单因子完全随机设计,在无磷基础液中以磷酸二氢钾(KH_2PO_4)形式设5个磷浓度,分别为0(对照组)、0.5、1.0、2.0和4.0 mmol/L,共5个组,每个组6个重复。

1.2 试验动物

18 胚龄的爱拔益加(AA)肉鸡鸡胚购自河北滦平华都肉鸡公司。

1.3 孵育液的配制

无磷基础液:参考 Bobeck 等^[9]的方法,配制含 137 mmol/L 氯化钠(NaCl)、5.4 mmol/L 氯化钾(KCl)、2.8 mmol/L 氯化钙(CaCl_2)、1.2 mmol/L 硫酸镁(MgSO_4)及 14 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl) (pH 7.4) 的无磷基础液。过滤除菌,4 °C 保存备用。

含磷孵育液:在以上无磷基础液中以 KH_2PO_4 的形式添加不同浓度的磷,过滤除菌,4 °C 保存备用。

1.4 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的原代培养

参考张树敏等^[10]消化、分离细胞的方法,进行肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的原代培养。

1.5 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞吸收模型的评估

在细胞培养 24 和 48 h,对细胞进行细胞跨膜电阻(TEER)值、酚红透过率以及培养液中的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性测定。

1.6 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞不同浓度磷孵育液处理

参考李晓丽^[11]的方法,根据吸收模型的检测结果(见结果中肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞吸收模型的评估),细胞培养 48 h 后,弃去培养基,用 37 °C 无磷基础液润洗几次,然后分别向各个组培养孔上池加入不同浓度磷的孵育液 1.5 mL,下池加入无磷基础液 2.6 mL,培养 87 min 后收样。

1.7 样品采集与制备

磷孵育液的收集:孵育 87 min 时,将各组培养孔下池孵育液收集于离心管中,-20 °C 保存,以备测定其中磷含量。

NaPi- II b 、 PiT-1 和 PiT-2 mRNA 以及翻译蛋白表达的细胞样品收集:孵育 87 min 时,立即将各培养孔上池中孵育液全部吸出,测定 mRNA 表达

的细胞每孔加入 0.5 mL 预冷的 Trizol,冰上裂解 5 min;测定翻译蛋白表达的细胞每孔加入 0.2 mL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 10 min。收样,于-80 °C 保存,以备后续测定 NaPi- II b 、 PiT-1 和 PiT-2 mRNA 以及翻译蛋白表达。

1.8 样品分析

TEER 值、酚红透过率、磷含量均参考张树敏^[8]的方法进行测定。细胞培养液中 LDH 活性根据南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行测定。

采用实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)分析原代培养十二指肠上皮细胞中 NaPi- II b 、 PiT-1 和 PiT-2 的 mRNA 相对表达量^[12-13],所用引物均购于北京 Invitrogen 公司,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)与 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算以上 3 种目的基因的相对表达量。引物序列详细信息见表 1。

采用 Western blotting 方法分析原代培养十二指肠上皮细胞中 NaPi- II b 、 PiT-1 和 PiT-2 翻译蛋白的相对表达量^[14-15]。以 GAPDH 蛋白作为内参,分别计算以上 3 种目的蛋白的相对表达量。各蛋白的一抗来源及稀释倍数如下: GAPDH 购自北京华兴博创基因技术有限公司,货号 HX1828,稀释倍数 1:5 000; NaPi- II b 购自北京博奥森生物技术有限公司,货号 bs-0856R,稀释倍数 1:2 000; PiT-1 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号 SC-98814,稀释倍数 1:500; PiT-2 购自英国 Abcam 公司,货号 ab64412,稀释倍数 1:5 000。

1.9 数据统计分析

用 SAS 9.2 软件中一般线性模型^[16]程序对所有数据进行单因素方差分析,差异显著者,以最小显著差数法(LSD)比较各平均值间的差异显著性。用不相关比较法分析各指标随磷添加水平的线性或二次曲线反应^[17-19]。以每个重复分析样本作为 1 个试验单元。以 $P < 0.05$ 作为数据差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞吸收模型的评估

由表 2 可见,在细胞分别培养 24 和 48 h 时,TEER 值均高于 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$,酚红透过率均小于 5%,LDH 活性处于较低水平。但 48 h 的 TEER 值与酚红透过率同 24 h 相比差异显著($P < 0.05$)。因此,使用培养 48 h 细胞进行磷吸收率试验。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Genes	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequences (5'—3')	退火温度 Tm/°C	产物长度 Product length/bp
Ⅱ b 型钠磷协同转运载体 <i>NaP-Ⅱ b</i>	NM-204474.1	F: CTGGATGCACTCCCTAGAGC R: TTATCTTTGGCACCCCTCCTG	60	128
无机磷转运载体 1 <i>PiT-1</i>	XM-015297502.1	F: GCTCGTGGCTTCGTTCTTG R: GGACCATTTGACGCCTTTCT	60	108
无机磷转运载体 2 <i>PiT-2</i>	NM-001305398.1	F: GCAGCAGATACATCAACTC R: ATTTCCACTCCACCCTC	54	153
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	K01458	F: CTTTGGCATTGTGGAGGGTC R: ACGCTGGGATGATGTTCTGG	55	128
β-肌动蛋白 β-actin	NM-205518.1	F: ACCTGAGCGCAAGTACTCTGTCT R: CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	60	95

表 2 不同培养时间点原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的 TEER 值、酚红透过率及 LDH 活性
Table 2 TEER value, phenol red transmittance and LDH activity in primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos at different culture time ($n=12$)

培养时间 Culture time/h	TEER 值 TEER value/ $\Omega \cdot \text{cm}^2$	酚红透过率 Phenol red transmittance/%	LDH 活性 LDH activity/(U/L)
24	327	1.28	258
48	446	1.06	270
集合标准误 Pooled SE	4.78	0.07	3.63
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	<0.000 1	0.04	0.39

2.2 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞中磷吸收率的影响

皮细胞中磷吸收率呈线性或二次曲线增加 ($P < 0.05$)。

由表 3 可见,随着磷浓度的增加,十二指肠上

表 3 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞中磷吸收率的影响

Table 3 Effects of different phosphorus concentrations on phosphorus absorption percentage in primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos ($n=6$)

磷浓度 Phosphorus concentrations/(mmol/L)	磷吸收率 Phosphorus absorption percentage
0	0 ^c
0.5	10.8 ^d
1.0	16.5 ^c
2.0	18.7 ^b
4.0	21.7 ^a
集合标准误 Pooled SE	0.69
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	
磷浓度 Phosphorus concentration	<0.000 1
线性 Linear	<0.000 1
二次曲线 Quadratic	<0.000 1

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

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

2.3 不同磷浓度对原代培养十二指肠上皮细胞 *NaPi- II b*、*PiT-1* 和 *PiT-2* mRNA 表达的影响

由表 4 可见,十二指肠上皮细胞中 *NaPi- II b* 的 mRNA 相对表达量随着磷浓度的升高呈线性降低 ($P < 0.05$)。与对照组相比,4.0 mmol/L 组的十

二指肠上皮细胞中 *NaPi- II b* 和 *PiT-1* 的 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$),而 4.0 mmol/L 组的十二指肠上皮细胞中 *PiT-2* 的 mRNA 相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。

表 4 不同磷浓度对原代培养十二指肠上皮细胞 *NaPi- II b*、*PiT-1* 和 *PiT-2* mRNA 表达的影响

Table 4 Effects of different phosphorus concentrations on *NaPi- II b*, *PiT-1* and *PiT-2* mRNA expression in primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos ($n=5$)

磷浓度 Phosphorus concentrations/(mmol/L)	II b 型钠磷协同转运载体 <i>NaPi- II b</i>	无机磷转运载体 1 <i>PiT-1</i>	无机磷转运载体 2 <i>PiT-2</i>
0	1.00 ^a	1.00 ^{ab}	1.00 ^{ab}
0.5	0.99 ^a	0.94 ^{abc}	0.90 ^{abc}
1.0	0.92 ^a	0.72 ^{bc}	0.72 ^c
2.0	0.81 ^a	1.16 ^a	1.11 ^a
4.0	0.49 ^b	0.70 ^c	0.81 ^{bc}
集合标准误 Pooled SE	0.08	0.09	0.07
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value			
磷浓度 Phosphorus concentration	<0.01	0.01	<0.01
线性 Linear	<0.01	0.13	0.41
二次曲线 Quadratic	0.11	0.16	0.41

2.4 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠细胞中 *NaPi- II b*、*PiT-1*、*PiT-2* 蛋白表达的影响

由表 5 可见,不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡

胚十二指肠上皮细胞中 *NaPi- II b*、*PiT-1* 和 *PiT-2* 蛋白表达无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 5 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠细胞中 *NaPi- II b*、*PiT-1* 和 *PiT-2* 蛋白表达的影响

Table 5 Effects of different phosphorus concentrations on *NaPi- II b*, *PiT-1* and *PiT-2* protein expression in primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos ($n=6$)

磷浓度 Phosphorus concentrations/(mmol/L)	II b 型钠磷协同转运载体 <i>NaPi- II b</i>	无机磷转运载体 1 <i>PiT-1</i>	无机磷转运载体 2 <i>PiT-2</i>
0	1.00	1.00	1.00
0.5	0.95	0.96	0.74
1.0	0.94	0.98	0.83
2.0	1.03	1.04	0.96
4.0	0.86	1.16	0.75
集合标准误 Pooled SE	0.06	0.05	0.08
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.36	0.08	0.11

3 讨论

3.1 原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞吸收模型的评估

细胞吸收模型是否建立成功通常通过细胞 TEER 值和酚红透过率的大小来判断。据文献报道,当 TEER 值大于 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$,酚红透过率小于

5%时,即表明单层细胞吸收模型建立成功^[20-22]。而 LDH 是在细胞浆内糖酵解过程中起催化作用的一种酶。在细胞培养过程中,如果细胞膜在外界环境的作用下受损破裂,它就会从细胞内漏出到细胞外的培养液中^[23-24]。因此,LDH 活性大小可以用来间接衡量细胞的活力。本试验中在细胞培养 48 h 时,细胞 TEER 值和酚红透过率比 24 h

更符合文献报道中的要求,且LDH活性处于较低水平,细胞状态良好,因此可以进行下一步的试验。

3.2 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞磷吸收率的影响

曹满湖^[25]研究发现,大鼠血清磷含量随着饲料磷水平的升高而升高;也有研究表明,高磷可以显著上调蛋鸡血清中的磷含量^[26];同样地,本实验室前期在肉仔鸡的研究中也发现了此规律,但当饲料非植酸磷水平升高到一定程度时,血清磷含量不再升高达到峰值^[6-7]。徐运杰^[27]通过外翻肠囊法研究发现,当培养液中的磷浓度在1.56~6.25 mmol/L时,肠囊的磷吸收与培养液中的磷含量呈正相关,但当磷浓度增加到12.00 mmol/L时,十二指肠肠囊的磷吸收量开始下降,磷吸收率与培养液中磷浓度呈负相关。张树敏^[8]通过体外原代培养十二指肠上皮细胞的方法得出,十二指肠对磷的吸收率随着磷浓度的增加而增加;但当磷浓度升高至24 mmol/L时,磷吸收率出现平台,不再随磷浓度的升高而升高。本试验所得磷吸收特点与以上报道基本相似,可能是由于试验中所设磷浓度较低,最高为4.0 mmol/L,因此并未出现以上文献报道中所出现的平台。

3.3 不同磷浓度对原代培养十二指肠上皮细胞*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2* mRNA表达的影响

目前已有大量文献表明,小肠中主要参与无机磷吸收的转载体为*NaPi-Ⅱb*^[28-31],对于*PiT-1*和*PiT-2*与小肠磷吸收关系的研究还比较少。Liu等^[32]研究发现,肉仔鸡十二指肠中*NaPi-Ⅱb* mRNA的表达随着灌注液中无机磷浓度的增加而显著降低;同样的,Hu等^[33]研究发现,肉仔鸡十二指肠中*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1* mRNA的表达随着饲料磷浓度的增加而显著降低;张树敏^[8]用原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的方法发现,随着孵育液磷浓度的增加,十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1* mRNA的表达显著降低。本试验中,*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1* mRNA表达与上述报道一致,当磷浓度升高至4.0 mmol/L时,十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1*的mRNA相对表达量显著降低,表明当磷浓度较高时,可通过抑制十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*和*PiT-1* mRNA的表达,来调节对磷的吸收。大量研究表明,饲喂低磷饲料可显著提高*NaPi-Ⅱb* mRNA的表达^[6-7],其原因可

能是在低磷状态下,机体要通过上调*NaPi-Ⅱb* mRNA的表达来增加肠道对磷的吸收以满足机体的需要。与以上报道不同,本试验中较低浓度磷(0.5~2.0 mmol/L)处理对十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*的mRNA表达无显著影响,原因可能是由于在细胞培养模型构建时,培养液中的磷足够维持细胞自身的生长与代谢,所以使得细胞对试验中的低浓度磷反应不敏感。张树敏^[8]和Hu等^[33]的研究表明,原代培养鸡胚十二指肠上皮细胞或小肠的*PiT-2* mRNA表达随磷浓度的升高而显著升高。本试验中,*PiT-2* mRNA的表达与以上报道不一致的原因,可能是本试验中所设磷浓度比较低,使得*PiT-2* mRNA的表达对磷浓度反应不敏感造成的。

3.4 不同磷浓度对原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*蛋白表达的影响

有研究表明,低磷饲料可以促进小鼠小肠*NaPi-Ⅱb*蛋白的表达^[34]。在肉鸡的十二指肠中也发现了类似的规律,饲喂低磷饲料同样可以促进肉鸡十二指肠*NaPi-Ⅱb*蛋白的表达^[4]。胡义信^[6]研究发现,随着磷浓度的升高,十二指肠中*NaPi-Ⅱb*和*PiT-2*的蛋白表达显著升高,而*PiT-1*的蛋白表达则显著降低。本试验中,*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*蛋白表达并不随磷浓度的变化而变化,其原因可能是研究方法不同造成的。张树敏^[8]通过原代培养十二指肠上皮细胞方法的研究表明,与对照组相比,添加6 mmol/L的磷对肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*蛋白表达均无显著影响。本试验中,随着孵育液中磷浓度增加至4.0 mmol/L,肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞中*NaPi-Ⅱb*、*PiT-1*和*PiT-2*蛋白表达无显著变化,本试验结果与张树敏^[8]研究结果相一致。本研究中,磷转运载体的蛋白表达未出现变化的原因可能是由于在细胞培养模型构建时,培养液中的磷足够维持细胞自身的生长与代谢,从而不需要调节磷相关转运载体的蛋白表达来调节对磷的吸收;也可能是磷转运载体的蛋白表达相对于mRNA表达有所延迟。

4 结论

随着孵育液磷浓度的增加,细胞磷吸收率增加;当孵育液中磷浓度为4.0 mmol/L时,原代培

养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞能通过下调 *NaPi-II b* 和 *PiT-1* 的 mRNA 表达来调节磷的吸收。

参考文献:

- [1] BERNDT T, KUMAR R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis [J]. *Physiology*, 2009, 24(1) : 17-25.
- [2] WALDROUP P W. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry [J]. *Poultry Science*, 1999, 78(5) : 683-691.
- [3] CORDELL D, DRANGERT J O, WHITE S. The story of phosphorus: global food security and food for thought [J]. *Global Environmental Change*, 2009, 19(2) : 292-305.
- [4] FANG R J, XIANG Z F, CAO M H, et al. Different phosphate transport in the duodenum and jejunum of chicken response to dietary phosphate adaptation [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, 25(10) : 1457-1465.
- [5] HAN J C, YANG X D, ZHANG T, et al. Effects of 1α -hydroxycholecalciferol on growth performance, parameters of tibia and plasma, meat quality, and type II b sodium phosphate cotransporter gene expression of one-to twenty-one-day-old broilers [J]. *Poultry Science*, 2009, 88(2) : 323-329.
- [6] 胡义信. 饲料非植酸磷水平对肉仔鸡小肠磷吸收及其相关磷转运载体基因表达的影 [D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [7] 刘松柏. 肉仔鸡对饲料标准磷利用率、可利用磷需要量及小肠磷吸收机制研究 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [8] 张树敏. 磷在原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的转运吸收及相关磷转运载体基因表达的研究 [D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [9] BOBECK E A, HELLESTAD E M, SAND J M, et al. Oral peptide specific egg antibody to intestinal sodium-dependent phosphate co-transporter-2b is effective at altering phosphate transport *in vitro* and *in vivo* [J]. *Poultry Science*, 2015, 94(6) : 1128-1137.
- [10] 张树敏, 廖秀冬, 吕林, 等. 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的体外分离、鉴定及其原代培养吸收模型的构建与评估 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30(8) : 3159-3167.
- [11] 李晓丽. Caco-2 细胞对不同形态锰的吸收及机制研究 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [12] ZHANG L Y, LU L, ZHANG L Y, et al. The chemical characteristics of organic iron sources and their relative bioavailabilities for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet [J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(6) : 2378-2396.
- [13] 朱勇文. 饲料锰、锌对肉鸡的抗热应激效应及其分子机制的研究 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [14] ZHU Y W, LU L, LI W X, et al. Effect of dietary manganese on antioxidant status and expression levels of heat-shock proteins and factors in tissues of laying broiler breeders under normal and high environmental temperatures [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(12) : 1965-1974.
- [15] 张伶俐. 有机铁源的化学特性、对肉仔鸡的相对生物学利用率及其小肠铁吸收研究 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [16] SAS. SAS user, s guide statistics. Version 9.0 [M]. Cary NC: SAS Institute Inc., 2003.
- [17] LIAO X D, MA C Y, LU L, et al. Determination of dietary iron requirements by full expression of iron-containing cytochrome c oxidase in the heart of broilers from 22 to 42 d of age [J]. *British Journal of Nutrition*, 2017, 118(7) : 493-499.
- [18] LU L, CHANG B, LIAO X D, et al. Use of molecular biomarkers to estimate manganese requirements for broiler chickens from 22 to 42 d of age [J]. *British Journal of Nutrition*, 2016, 116(9) : 1512-1518.
- [19] MA X Y, LIAO X D, LU L, et al. Determination of dietary iron requirements by full expression of iron-containing enzymes in various tissues of broilers [J]. *The Journal of Nutrition*, 2016, 146(11) : 2267-2273.
- [20] KAMILOGLU S, GROOTAERT C, CAPANOGLU E, et al. Anti-inflammatory potential of black carrot (*Daucus carota* L.) polyphenols in a co-culture model of intestinal Caco-2 and endothelial EA.hy926 cells [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 61(2) : 1600455.
- [21] LI X L, XIE J J, LU L, et al. Kinetics of manganese transport and gene expressions of manganese transport carriers in Caco-2 cell monolayers [J]. *Biometals*, 2013, 26(6) : 941-953.
- [22] 许玲芬, 张雪娇, 林楠, 等. Caco-2 建立肠黏膜屏障模型及其在通透性研究中的应用 [J]. *国际儿科学杂志*, 2016, 43(3) : 239-243.
- [23] 阎军, 王天佑, 彭亮, 等. 细胞培养液中微量乳酸脱氢酶的荧光分光光度测定法 [J]. *生理科学*, 1989, 9(2) : 57-60.
- [24] 洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶

- 漏出率的比色测定及其应用[J].细胞生物学杂志, 2004, 26(1):89-92.
- [25] 曹满湖.日粮磷水平和 VD_3 对 Na^+/Pi -II b mRNA 表达和磷吸收的影响[D].博士学位论文.长沙:湖南农学大学,2010.
- [26] 厉鹏.蛋鸡钙磷转运体表达的影响因素研究[D].硕士学位论文.泰安:山东农学大学,2018.
- [27] 徐运杰.鸡小肠离体培养条件优化及在饲料磷效价评定中的应用研究[D].硕士学位论文.长沙:湖南农学大学,2009.
- [28] XIANG Z F, FANG R J, HU L C, et al. Molecular cloning and functional characterization of swine sodium dependent phosphate cotransporter type II b (*NaPi-II b*) gene [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(12):10557-10564.
- [29] 胡龙昌,方热军.神经肽 Y 对猪小肠上皮细胞 $NaPi$ -II b 蛋白表达及无机磷吸收的影响[J].畜牧兽医学报,2014,45(10):1640-1647.
- [30] SABBAGH Y, O' BRIEN S P, SONG W P, et al. Intestinal Npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis[J].Journal of the American Society of Nephrology, 2009, 20(11):2348-2358.
- [31] WONG S H, GAO A, WARD S, et al. Development of a label-free assay for sodium-dependent phosphate transporter $NaPi$ -II b [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2012, 17(6):829-834.
- [32] LIU S B, HU Y X, LIAO X D, et al. Kinetics of phosphorus absorption in ligated small intestinal segments of broilers [J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(8):3312-3320.
- [33] HU Y X, LIAO X D, WEN Q, et al. Phosphorus absorption and gene expression levels of related transporters in the small intestine of broilers [J]. British Journal of Nutrition, 2018, 119(12):1346-1354.
- [34] SEGAWA H, KANEKO I, YAMANAKA S, et al. Intestinal Na - Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice [J]. American Journal of Physiology-renal Physiology, 2004, 287(1):F39-F47.

Phosphorus Absorption and Related Transporter Expression under Low Phosphorus Concentrations in Primarily Cultured Duodenal Epithelial Cells of Broiler Embryos

LYU Na LYU Lin LIAO Xiudong ZAHNG Liyang LUO Xugang*

(*Mineral Nutrition Research Division, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*)

Abstract: The aim of the study was to investigate the phosphorus absorption and related transporter expression under low phosphorus concentrations in primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos. A single-factor completely randomized design was used in this experiment, the cells were randomly assigned to 5 groups with 6 replicates per group, and then treated with 0 (control group), 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mmol/L phosphorus for 87 min, respectively. The results showed that different phosphorus concentrations had significant effect on phosphorus absorption percentage in duodenal epithelial cells ($P < 0.05$), and the phosphorus absorption percentage was linear or quadratic increased with phosphorus concentration increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA relative expressions of type II b sodium-phosphate cotransporter (*NaPi-II b*) and inorganic phosphate transporter 1 (*PiT-1*) in duodenal epithelial cells of 4.0 mmol/L group were significantly decreased ($P < 0.05$), but the mRNA relative expression of inorganic phosphate transporter 2 (*PiT-2*) in duodenal epithelial cells of 4.0 mmol/L group had no significant change ($P > 0.05$). Different phosphorus concentrations had no significant effects on the protein expressions of NaPi-II b, PiT-1 and PiT-2 in duodenal epithelial cells ($P > 0.05$). In conclusion, with the incubation solution phosphorus concentration increased, the cell phosphorus absorption percentage increase; when the incubation solution phosphorus concentration is 4.0 mmol/L, the primarily cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos can regulate the phosphorus absorption by reducing the mRNA expressions of *NaPi-II b* and *PiT-1*. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(9):4186-4193]

Key words: duodenal epithelial cells; broiler embryos; phosphorus; absorption