

# 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋鸡生产性能、小肠屏障功能及相关基因表达的影响

武笑天 温 璽 李锐瑞 白 彦 王 瑞 杨 玉\*

(山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801)

**摘要:** 本试验旨在研究饲料中添加不同水平叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋高峰期京红蛋鸡生产性能、蛋品质、小肠组织形态、小肠屏障功能及相关基因表达的影响。试验选用 28 周龄京红蛋鸡 972 只, 随机分为 9 个组, 每组 6 个重复, 每个重复 18 只鸡。采用 2 因素 3 水平试验设计, 分别在基础饲料中添加不同水平的叶酸和维生素 B<sub>12</sub>, 叶酸设 0、2 和 5 mg/kg 3 个添加水平, 维生素 B<sub>12</sub> 设 0、25 和 75 μg/kg 3 个添加水平。试验预试期 2 周, 正试期 8 周。结果表明: 1) 饲料添加叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 及其互作效应对京红蛋鸡生产性能无显著影响 ( $P>0.05$ )。2) 饲料添加 2 mg/kg 叶酸显著提高了蛋形指数、蛋壳厚度、蛋黄颜色和哈氏单位 ( $P<0.05$ ), 添加 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 显著提高了蛋壳厚度和哈氏单位 ( $P<0.05$ ); 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 互作效应显著提高了哈氏单位 ( $P<0.05$ )。3) 饲料添加 2 mg/kg 叶酸显著提高了空肠和回肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度 (V/C) 值 ( $P<0.05$ ), 添加 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 显著提高了十二指肠绒毛高度和 V/C 值 ( $P<0.05$ ); 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 互作效应对十二指肠和空肠绒毛高度和 V/C 值影响显著 ( $P<0.05$ ), 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 添加组显著高于未添加组 ( $P<0.05$ )。4) 饲料添加叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 及其互作效应对十二指肠和空肠闭锁蛋白 (occludin) 和黏蛋白 2 (MUC2) mRNA 相对表达量影响显著 ( $P<0.05$ ), 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 添加组显著高于未添加组 ( $P<0.05$ )。5) 饲料添加 2 mg/kg 叶酸显著降低了十二指肠、空肠和回肠 Toll 样受体 4 (TLR4)、核转录因子-κB (NF-κB)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-1β (IL-1β) mRNA 相对表达量 ( $P<0.05$ ), 显著提高了十二指肠、空肠和回肠白细胞介素-13 (IL-13) mRNA 相对表达量 ( $P<0.05$ ); 添加 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 显著降低了十二指肠、空肠和回肠 TLR4 和 TNF-α mRNA 相对表达量 ( $P<0.05$ ), 显著提高了十二指肠、空肠和回肠白细胞介素-10 (IL-10) mRNA 相对表达量 ( $P<0.05$ )。叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 互作效应对十二指肠和空肠 TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-1β 和 IL-10 mRNA 相对表达量影响显著 ( $P<0.05$ ), 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 添加组十二指肠和空肠 TLR4、NF-κB、TNF-α 和 IL-1β mRNA 相对表达量显著低于未添加组 ( $P<0.05$ ), 十二指肠和空肠 IL-10 mRNA 相对表达量显著高于未添加组 ( $P<0.05$ )。综上所述, 饲料添加适宜水平的叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 能够提高产蛋高峰期京红蛋鸡鸡蛋哈氏单位, 改善小肠组织形态, 改善小肠屏障功能及炎症相关基因的表达, 以饲料 (含 1.35 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>) 中添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub> 效果较好。

**关键词:** 叶酸; 维生素 B<sub>12</sub>; 蛋鸡; 生产性能; 肠道形态; 肠道屏障功能

中图分类号: S831.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)05-2616-15

收稿日期: 2020-12-30

基金项目: 晋中市科技重点研发计划(农业)(Y182011); 健康功能畜产品生产技术研究与应用(201703D211001-05); 山西省现代农业鸡产业技术体系(20201102); 山西省“1331”工程畜牧学重点学科建设(J202011315)

作者简介: 武笑天(1993—), 男, 山西汾阳人, 硕士研究生, 研究方向为家禽营养。E-mail: 374875164@qq.com

\* 通信作者: 杨 玉, 教授, 博士生导师, E-mail: 345605203@qq.com

叶酸又名蝶酰谷氨酸,是畜禽生长发育过程中一种重要的水溶性B族维生素。作为一种单位的受体和供体,叶酸参与动物机体DNA、RNA及各种蛋白质的合成<sup>[1]</sup>,能够影响细胞因子的形成,进而提高动物机体的免疫力。维生素B<sub>12</sub>可以以辅酶的形式提高叶酸的利用率,促进碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢<sup>[2]</sup>。肠道作为营养物质吸收的主要场所,其健康发育对家禽生长至关重要。而家禽肠道健康与肠道黏膜屏障功能密切相关。尹秀玲等<sup>[3]</sup>研究表明,饲料添加0.4、0.5、0.6和1.0 mg/kg叶酸时,雏鸡的体重随之增加,而叶酸缺乏可引起雏鸡免疫力下降,死亡率提高。丑武江等<sup>[4]</sup>研究表明,饲料添加3 mg/kg叶酸可显著提高肉仔鸡的平均日增重和平均日采食量,提高血清中蛋白质的含量,降低料重比。饲料添加10 mg/kg维生素B<sub>12</sub>显著提高了5~15周龄五龙鹅空肠绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度(V/C)值,显著降低了空肠隐窝深度<sup>[5]</sup>。3周龄肉仔鸡饲料中分别添加0.75 mg/kg叶酸和300 mg/kg甜菜碱以及2.25 mg/kg叶酸和300 mg/kg甜菜碱,肉仔鸡饲料转化率和平均日增重均随着叶酸添加水平的提高而提高<sup>[6]</sup>。京红蛋鸡营养标准中叶酸和维生素B<sub>12</sub>的推荐量分别为1.5 mg/kg和25~30 μg/kg。有关叶酸和维生素B<sub>12</sub>缺乏的研究较多,而补充多少叶酸和维生素B<sub>12</sub>可获得较好的肠道免疫性能,仍处于空白。因此,本试验在饲料中添加不同水平的叶酸和维生素B<sub>12</sub>,研究其对产蛋高峰期京红蛋鸡生产性能、蛋品质、小肠屏障功能及相关基因表达的影响,为调控产蛋鸡免疫性能提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验设计和饲料

试验选择972只28周龄健康状况良好、处于产蛋高峰期的京红蛋鸡,随机分成9组,每组6个重复,每个重复18只鸡。采用2因素3水平试验设计,在基础饲料中分别添加0、2和5 mg/kg叶酸和0、25和75 μg/kg维生素B<sub>12</sub>,基础饲料组成及营养水平见表1,试验设计见表2。维生素B<sub>12</sub>由河北某生物工程股份有限公司提供,其有效成分含量≥1%;叶酸由河北某生物科技有限公司提供,其有效成分为95.5%~102.0%。试验预试期2周,饲喂基础饲料,期间各组蛋鸡产蛋率无显著差

异( $P>0.05$ )后开始试验,正试期8周。

表1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	64.50
豆粕 Soybean meal	21.00
棉籽粕 Cottonseed meal	1.00
亚麻籽饼 Linseed meal	2.00
石粉 Limestone	8.50
预混料 Premix <sup>1)</sup>	3.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
粗蛋白质 CP	16.46
有效磷 AP	0.22
赖氨酸 Lys	0.78
蛋氨酸 Met	0.39
苏氨酸 Thr	0.58
钙 Ca	3.50
总磷 TP	0.50
代谢能 ME/(MJ/kg)	11.08
叶酸 Folic acid/(mg/kg)	1.35
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub> /(μg/kg)	25.00

1) 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: CaHPO<sub>4</sub> 10 g, 蛋氨酸 Met 1.4 g, 赖氨酸 Lys 0.4 g, 植酸酶 phytase enzyme 1 000 U, 氯化胆碱 choline chloride 1.0 g, NaCl 3.0 g, VA 14 400 IU, VD<sub>3</sub> 5 400 IU, VK<sub>3</sub> 2 mg, VE 32 mg, VB<sub>1</sub> 2.4 mg, VB<sub>2</sub> 10 mg, VB<sub>6</sub> 4 mg, VB<sub>12</sub> 0.025 mg, 叶酸 folic acid 1 mg, 烟酸 niacin 48 mg, D-泛酸钙 D-calcium pantothenate 14 mg, 生物素 biotin 0.16 mg, Cu 8 mg, Fe 50 mg, Mn 100 mg, Zn 90 mg, I 0.4 mg, Se 0.36 mg, Co 0.26 mg。

2) 粗蛋白质、钙、总磷、叶酸和维生素B<sub>12</sub>为实测值,其余均为计算值。CP, Ca, TP, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> were measured values, while the others were calculated values.

### 1.2 饲养管理

采用3层阶梯式笼养,每笼3只鸡,连续的6笼为1个重复,各重复均匀分布于鸡舍同行中间2层。全程粉料饲养,每天光照时间为16 h,鸡舍温度控制在25℃左右,自由饮水,每天喂食2次(09:00和15:00),自然通风和纵向负压通风相结合,每天16:30拣蛋并记录称重。其他均按养殖场常规方法进行。

表2 试验设计

Table 2 Experiment design

组别 Groups	叶酸添加水平 Folic acid supplemental levels/(mg/kg)	维生素 B <sub>12</sub> 添加水平 Vitamin B <sub>12</sub> supplemental levels/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
I	0	0
II	0	25
III	0	75
IV	2	0
V	2	25
VI	2	75
VII	5	0
VIII	5	25
IX	5	75

### 1.3 样品采集处理和指标测定

#### 1.3.1 生产性能

试验期间以各重复为单位记录每日采食量、产蛋总数、总蛋重、软破蛋数和死淘数,每周计算各组的料蛋比和产蛋率。

#### 1.3.2 蛋品质

试验期间,每周每个重复选取3枚接近平均蛋重的鸡蛋( $n=18$ ),测定蛋形指数、蛋壳强度、蛋壳厚度、蛋黄颜色、哈氏单位、蛋白高度、平均蛋重、蛋黄重及蛋壳重。所用仪器为全自动蛋品分析仪(EA-01,以色列)、ORKA蛋壳强度仪(EFO-501,以色列)、蛋壳厚度仪(MODEL-1061,日本)和数显千分尺(MODEL-P-1)。

#### 1.3.3 小肠组织形态

试验结束时,每重复选取1只鸡,每组6只鸡,禁食12h,采用无菌操作分别取十二指肠、空肠和回肠的同一部位放于75%的中性甲醛中,在4℃环境中保存。按照常规方法制作石蜡切片,利用Image-Pro Plus软件测量小肠各部位绒毛高度和隐窝深度,并计算V/C值。每个样本观察2个非连续切片,每张切片选取3个视野,每个视野分别测定10组数据,其平均值作为1个测定数据。

#### 1.3.4 小肠总RNA提取和反转录

鸡颈静脉放血致死,采用无菌操作迅速取出十二指肠、空肠和回肠同一部位放入液氮中,置于

-80℃待测。采用Trizol法分别提取十二指肠、空肠和回肠组织总RNA。用核酸蛋白仪测定RNA完整性、浓度和纯度。按照反转录试剂盒说明合成cDNA,-20℃保存备用。

#### 1.3.5 引物设计

根据NCBI测序数据库中闭锁蛋白(occludin)、闭合蛋白-1(claudin-1)、闭合小环蛋白-1(ZO-1)、黏蛋白2(MUC2)、Toll样受体4(TLR4)、核转录因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-10(IL-10)和白细胞介素-13(IL-13)基因的mRNA序列,以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)基因作为内参基因,用Primer-BLAST设计上述引物(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表3。

#### 1.3.6 实时荧光定量PCR

以合成的cDNA为模板,按照SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒说明,在实时荧光定量PCR仪上进行,反应条件为:95℃预变性30s,95℃变性5s,60℃退火30s,共40个循环。采用相对定量分析法,以 $\beta$ -actin作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因mRNA相对表达量。

### 1.4 数据处理和统计分析

试验数据经Excel 2010初步整理后,应用SAS 9.2软件中的一般线性模型(GLM)程序按试验设计对数据进行方差分析,以重复为试验单元,模型的主要效应包括叶酸、维生素B<sub>12</sub>处理以及二者之间的互作效应。 $F$ 检验显著差异者,以最小显著差异(LSD)法比较平均值间的差异显著性。结果以平均值和均值标准误(SEM)表示。 $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶酸和维生素B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡生产性能的影响

由表4可知,饲料添加不同水平的叶酸和维生素B<sub>12</sub>及其互作效应对产蛋高峰期京红蛋鸡的平均日采食量、平均蛋重、料蛋比和产蛋率均无显著影响( $P>0.05$ )。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')	引物长度 Primer length/bp
闭锁蛋白 Occludin	D21837.1	F:ACGGCAGCACCTACCTCAA	19
		R:GGGCGAAGAAGCAGATGAG	19
闭合蛋白-1 Claudin-1	AY750897.1	F:CATACTCCTGGGTCTGGTTGGT	22
		R:GACAGCCATCCGCATCTTCT	20
闭合小环蛋白-1 ZO-1	XM_021098886.1	F:CTTCAGGTGTTTCTCTTCCTCCTC	24
		R:CTGTGGTTTCATGGCTGGATC	21
黏蛋白 2 MUC2	XM_41035	F:TTCATGATGCCTGCTCTTGTTG	23
		R:CCTGAGCCTTGGTACATTCTTGT	22
Toll 样受体 4 TLR4	AY648165.1	F:GGCTCAACCTCACGTTGGTA	20
		R:AGTCCGTTCTGAAATCCCGT	20
核转录因子- $\kappa$ B NF- $\kappa$ B	NM_205129	F:GTGTGAAGAAACGGGAAGCTG	20
		R:GGCACGGTTGTCATAGATGG	20
肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$	NM_214022.1	F:GAGCGTTGACTTGGCTGTC	19
		R:AAGCAACAACCAGCTATGCAC	21
白细胞介素-1 $\beta$ IL-1 $\beta$	NM_214005.1	F:ACTGGGCATCAAGGGCTA	18
		R:GGTAGAAGATGAAGCGGGTC	20
白细胞介素-10 IL-10	NM_001004414.2	F:GCTGCGCTTCTACACAGATG	20
		R:TCCCGTTCTCATCCATCTTCTC	22
白细胞介素-13 IL-13	AJ621250.1	F:TCAAGGATCGGAAGCTGTCA	20
		R:GTCCTTCTGCAGTCGGTCA	20
$\beta$ -肌动蛋白 $\beta$ -actin	L08165.1	F:CAACACAGTGCTGTCTGGTG	20
		R:ATCGTACTCTGCTTGCTGAT	20

表 4 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡生产性能的影响Table 4 Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on performance of *Jinghong* laying hens at peak production

项目 Items	平均日采食量 ADFI/g	平均蛋重 Average egg weight/g	料蛋比 Feed/egg	产蛋率 Laying rate/%		
				预试期 Adjustment period	正试期 Experimental period	
组别 Groups						
I	126.87	64.74	2.22	88.05	88.41	
II	127.76	64.56	2.21	88.53	89.65	
III	128.82	64.98	2.19	90.15	90.40	
IV	129.34	64.99	2.18	89.44	91.21	
V	129.52	65.21	2.15	90.79	92.31	
VI	126.76	65.10	2.16	87.48	90.10	
VII	126.18	63.07	2.20	89.83	90.61	
VIII	128.68	66.11	2.20	88.40	88.26	
IX	129.20	65.67	2.22	87.23	88.80	
SEM	2.04	0.65	0.06	0.02	1.34	
主效应分析 Main effect analysis						
叶酸 Folic acid/ (mg/kg)	0	127.82	64.76	2.21	88.91	89.48
	2	128.54	65.10	2.17	89.24	91.20
	5	128.02	64.95	2.21	88.49	89.22

续表 4

项目 Items	平均日采食量 ADFI/g	平均蛋重 Average egg weight/g	料蛋比 Feed/egg	产蛋率 Laying rate/%	
				预试期 Adjustment period	正试期 Experimental period
SEM	1.18	0.38	0.04	0.01	0.77
维生素 B <sub>12</sub>	0	127.46	64.26	2.20	89.11
Vitamin B <sub>12</sub> /	25	128.65	65.30	2.19	89.24
( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	75	128.26	65.25	2.19	88.29
SEM	1.18	0.38	0.04	0.01	0.77
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value					
叶酸 Folic acid	0.904	0.814	0.613	0.899	0.174
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub>	0.768	0.104	0.944	0.818	0.948
叶酸×维生素 B <sub>12</sub>	0.680	0.103	0.997	0.653	0.423
Folic acid×vitamin B <sub>12</sub>					

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 肩标无字母或相同小写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 no letter or the same small letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below.

## 2.2 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋高峰期京红蛋鸡蛋品质的影响

由表 5 可知, 饲料添加叶酸对产蛋高峰期京红蛋鸡蛋形指数、蛋壳厚度、哈氏单位和蛋壳比率有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 饲料添加维生素 B<sub>12</sub> 对蛋壳厚度和哈氏单位有显著影响 ( $P < 0.05$ )。叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 的互作效应除对哈氏单位有显著影响 ( $P < 0.05$ ) 外, 对其余指标均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。各叶酸或维生素 B<sub>12</sub> 添加组 (II ~ IX 组) 哈氏单位均显著高于未添加组 (I 组) ( $P < 0.05$ ), 且以 V 组 (添加 2 mg/kg 叶酸+25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  维生素 B<sub>12</sub>) 最高。

## 2.3 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠组织形态的影响

由表 6 可知, 饲料添加叶酸对产蛋高峰期京红蛋鸡空肠和回肠绒毛高度和 V/C 值均有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 饲料添加维生素 B<sub>12</sub> 对十二指肠和回肠绒毛高度和 V/C 值有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 的互作效应对十二指肠和空肠绒毛高度和 V/C 值有显著影响 ( $P < 0.05$ )。II 组、IV 组、V 组和 VIII 组十二指肠绒毛高度显著高于 I 组 ( $P < 0.05$ ), V 组十二指肠 V/C 值显著高于 I 组和 VII 组 ( $P < 0.05$ ); V 组空肠绒毛高度和 V/C 值显著高于 I 组和 II 组 ( $P < 0.05$ )。结果表明, V 组蛋鸡小肠组织形态得到改善, 小肠吸收能力得以增强。

## 2.4 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠屏障功能相关基因表达的影响

由表 7 可知, 饲料添加叶酸、维生素 B<sub>12</sub> 及其互作效应能显著提高产蛋高峰期京红蛋鸡十二指

肠 occludin、claudin-1、ZO-1 和 MUC2 mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ )。V 组十二指肠 occludin、ZO-1 mRNA 相对表达量均显著高于 I 组、II 组、III 组、IV 组、VII 组和 IX 组 ( $P < 0.05$ ), VI 组十二指肠 claudin-1 mRNA 相对表达量显著高于除 V 组外的其他组 ( $P < 0.05$ ), V 组十二指肠 MUC2 mRNA 相对表达量显著高于除 VI 组外的其他组 ( $P < 0.05$ ), VIII 组十二指肠 MUC2 mRNA 相对表达量显著高于 I 组 ( $P < 0.05$ )。

饲料添加叶酸对空肠 occludin、claudin-1 和 MUC2 mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 对 ZO-1 mRNA 相对表达量无显著影响 ( $P > 0.05$ ); 饲料添加维生素 B<sub>12</sub> 仅对空肠 MUC2 mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 的互作效应对空肠 occludin、ZO-1 和 MUC2 mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ )。V 组空肠 occludin mRNA 相对表达量显著高于 I 组和 IX 组 ( $P < 0.05$ ), III 组空肠 ZO-1 mRNA 相对表达量显著高于 I 组 ( $P < 0.05$ ), V 组空肠 MUC2 mRNA 相对表达量显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。

饲料添加叶酸仅对回肠 occludin mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 饲料添加维生素 B<sub>12</sub> 对回肠 occludin 和 MUC2 mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 的互作效应对回肠 occludin 和 MUC2 mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P < 0.05$ )。V 组和 VI 组回肠 occludin mRNA 相对表达量显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), VI 组回肠 MUC2 mRNA 相对表达量显著高于 I 组、II 组、IV 组和 IX 组 ( $P < 0.05$ )。

表 5 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡蛋品质的影响  
Table 5 Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on egg quality of Jinghong laying hens at peak production

项目 Items	蛋形指数 Egg shape index	蛋壳强度 Egg shell strength/kgf	蛋壳厚度 Egg shell thickness/mm	蛋黄颜色 Yolk color	哈氏单位 Haugh unit	蛋白高度 Albumen height/mm	蛋黄比率 Egg yolk ratio/%	蛋壳比率 Egg shell ratio/%	蛋白比率 Egg white ratio/%
组别 Groups									
I	1.27	4.00	0.357	5.61	84.78 <sup>b</sup>	8.29	24.62	11.08	64.30
II	1.28	4.10	0.366	5.72	89.46 <sup>a</sup>	8.33	24.04	11.03	64.93
III	1.27	4.18	0.367	5.73	89.34 <sup>a</sup>	8.26	25.46	10.76	63.78
IV	1.28	4.23	0.366	5.92	88.86 <sup>a</sup>	8.34	24.64	10.50	64.86
V	1.28	4.32	0.390	6.01	90.30 <sup>a</sup>	8.78	24.28	10.69	65.04
VI	1.28	4.17	0.367	6.13	89.61 <sup>a</sup>	8.26	24.17	10.53	65.30
VII	1.28	4.23	0.364	5.61	88.72 <sup>a</sup>	8.29	24.40	11.06	64.53
VIII	1.27	4.08	0.371	5.79	89.86 <sup>a</sup>	8.35	23.61	10.90	65.50
IX	1.27	4.04	0.369	5.81	88.41 <sup>a</sup>	8.24	24.46	10.67	64.87
SEM	0.01	0.10	0.005	0.18	0.73	0.15	0.47	0.18	0.54
主效应分析 Main effect analysis									
叶酸 Folic acid/ (mg/kg)	0 2 5	4.09 4.24 4.12	0.363 <sup>b</sup> 0.374 <sup>a</sup> 0.368 <sup>ab</sup>	5.69 <sup>b</sup> 6.02 <sup>a</sup> 5.74 <sup>ab</sup>	87.86 <sup>b</sup> 89.59 <sup>a</sup> 88.99 <sup>ab</sup>	8.29 8.46 8.30	24.71 24.37 24.16	10.95 <sup>a</sup> 10.57 <sup>b</sup> 10.88 <sup>a</sup>	64.34 65.06 64.96
SEM	0.00	0.06	0.003	0.11	0.42	0.09	0.27	0.10	0.31
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub> / (μg/kg)	0 25 75	4.15 4.17 4.13	0.326 <sup>b</sup> 0.376 <sup>a</sup> 0.368 <sup>ab</sup>	5.71 5.84 5.89	87.45 <sup>b</sup> 89.87 <sup>a</sup> 89.12 <sup>a</sup>	8.31 8.49 8.26	24.55 23.98 24.70	10.88 10.87 10.65	64.56 65.15 64.64
SEM	0.00	0.06	0.00	0.11	0.42	0.09	0.27	0.10	0.31
P 值 P-value									
叶酸 Folic acid	0.039	0.134	0.041	0.063	0.020	0.303	0.352	0.025	0.214
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub>	0.779	0.877	0.011	0.479	0.001	0.150	0.141	0.209	0.355
叶酸×维生素 B <sub>12</sub> Folic acid×vitamin B <sub>12</sub>	0.510	0.351	0.171	0.998	0.017	0.531	0.515	0.773	0.705

表 6 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠组织形态的影响  
 Table 6 Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on small intestinal tissue morphology of Jinghong laying hens at peak production

项目 Items	十二指肠 Duodenum				空肠 Jejunum				回肠 Ileum			
	绒毛高度/ Villus height/ μm	隐窝深度/ Crypt depth/ μm	绒毛高度/ 隐窝深度 V/C	绒毛高度/ Villus height/ μm	隐窝深度/ Crypt depth/ μm	绒毛高度/ 隐窝深度 V/C	绒毛高度/ Villus height/ μm	隐窝深度/ Crypt depth/ μm	绒毛高度/ 隐窝深度 V/C	绒毛高度/ Villus height/ μm	隐窝深度/ Crypt depth/ μm	绒毛高度/ 隐窝深度 V/C
组别 Groups												
I	1 170.91 <sup>b</sup>	189.44	6.21 <sup>b</sup>	1 133.40 <sup>b</sup>	176.34	6.43 <sup>b</sup>	911.05	147.92	6.17			
II	1 555.60 <sup>a</sup>	181.86	8.57 <sup>ab</sup>	1 037.23 <sup>b</sup>	171.38	6.04 <sup>b</sup>	905.90	142.55	6.48			
III	1 387.59 <sup>ab</sup>	164.88	8.42 <sup>ab</sup>	1 246.62 <sup>ab</sup>	167.48	7.45 <sup>ab</sup>	1 122.99	136.68	8.22			
IV	1 468.60 <sup>a</sup>	192.79	7.63 <sup>ab</sup>	1 274.74 <sup>ab</sup>	168.94	7.56 <sup>ab</sup>	1 067.91	138.31	7.73			
V	1 527.95 <sup>a</sup>	173.97	8.78 <sup>a</sup>	1 447.36 <sup>a</sup>	162.75	8.94 <sup>a</sup>	1 101.28	130.63	8.43			
VI	1 337.57 <sup>ab</sup>	187.58	7.14 <sup>ab</sup>	1 280.86 <sup>ab</sup>	162.18	7.91 <sup>ab</sup>	1 153.48	133.29	8.66			
VII	1 375.81 <sup>ab</sup>	200.84	6.85 <sup>b</sup>	1 336.23 <sup>ab</sup>	169.92	7.88 <sup>ab</sup>	924.64	130.88	7.09			
VIII	1 568.10 <sup>a</sup>	203.61	7.73 <sup>ab</sup>	1 275.71 <sup>ab</sup>	165.53	7.71 <sup>ab</sup>	1 003.55	140.49	7.13			
IX	1 429.16 <sup>ab</sup>	195.79	7.31 <sup>ab</sup>	1 251.79 <sup>ab</sup>	167.77	7.48 <sup>ab</sup>	1 151.79	141.10	8.20			
SEM	53.67	5.42	0.38	51.51	4.06	0.39	46.67	5.97	0.42			
主效应分析 Main effect analysis												
叶酸	0	1 371.36	7.74	1 139.08 <sup>b</sup>	171.73	6.64 <sup>b</sup>	979.98 <sup>b</sup>	142.38	6.96 <sup>b</sup>			
Folic acid/ (mg/kg)	2	1 444.71	7.86	1 334.32 <sup>a</sup>	164.63	8.14 <sup>a</sup>	1 107.56 <sup>a</sup>	134.08	8.27 <sup>a</sup>			
5	1 457.69	200.08 <sup>a</sup>	7.30	1 287.91 <sup>a</sup>	167.74	7.69 <sup>a</sup>	1 026.66 <sup>b</sup>	137.49	7.47 <sup>b</sup>			
SEM	30.99	3.13	0.22	29.74	2.34	0.23	26.94	3.45	0.25			
维生素 B <sub>12</sub>	0	1 338.44 <sup>b</sup>	6.90 <sup>c</sup>	1 248.12	171.73	7.29	967.87 <sup>b</sup>	139.04	7.00 <sup>b</sup>			
Vitamin B <sub>12</sub> / (μg/kg)	25	1 550.55 <sup>a</sup>	8.36 <sup>a</sup>	1 253.43	166.55	7.57	1 003.58 <sup>b</sup>	137.89	7.35 <sup>b</sup>			
75	1 384.77 <sup>b</sup>	182.75 <sup>b</sup>	7.32 <sup>b</sup>	1 259.76	165.81	7.61	1 142.76 <sup>a</sup>	137.02	8.36 <sup>a</sup>			
SEM	30.99	3.13	0.22	29.74	2.34	0.23	26.94	3.45	0.25			
P 值 P-value												
叶酸 Folic acid	0.134	<0.001	0.200	0.005	0.128	0.001	0.012	0.257	0.005			
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub>	<0.001	0.049	0.001	0.963	0.179	0.556	0.001	0.918	0.003			
叶酸×维生素 B <sub>12</sub> Folic acid×vitamin B <sub>12</sub>	0.034	0.059	0.026	0.014	0.922	0.036	0.377	0.398	0.452			

表 7 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期红蛋鸡小肠屏障功能相关基因表达的影响  
 Table 7 Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on expression of genes related to small intestinal barrier function of Jinghong laying hens at peak production

项目 Items	十二指肠 Duodenum				空肠 Jejunum				回肠 Ileum			
	闭锁蛋白 Occludin	闭合蛋白-1 Claudin-1	环蛋白-1 ZO-1	黏蛋白 2 MUC2	闭锁蛋白 Occludin	闭合蛋白-1 Claudin-1	环蛋白-1 ZO-1	黏蛋白 2 MUC2	闭锁蛋白 Occludin	闭合蛋白-1 Claudin-1	环蛋白-1 ZO-1	黏蛋白 2 MUC2
组别 Groups												
I	1.028 <sup>b</sup>	1.017 <sup>b</sup>	1.013 <sup>b</sup>	1.001 <sup>c</sup>	1.001 <sup>b</sup>	1.002	1.002 <sup>b</sup>	1.000 <sup>c</sup>	1.001 <sup>b</sup>	1.011	1.002	1.002 <sup>b</sup>
II	1.159 <sup>b</sup>	1.092 <sup>b</sup>	1.139 <sup>b</sup>	1.171 <sup>bc</sup>	1.217 <sup>ab</sup>	1.116	1.046 <sup>ab</sup>	1.250 <sup>c</sup>	1.075 <sup>b</sup>	0.967	1.194	1.104 <sup>b</sup>
III	1.311 <sup>b</sup>	1.237 <sup>b</sup>	1.153 <sup>b</sup>	1.177 <sup>bc</sup>	1.198 <sup>ab</sup>	1.103	1.236 <sup>a</sup>	1.561 <sup>bc</sup>	0.993 <sup>b</sup>	1.030	1.183	1.108 <sup>ab</sup>
IV	1.141 <sup>b</sup>	1.259 <sup>b</sup>	1.193 <sup>b</sup>	1.134 <sup>bc</sup>	1.211 <sup>ab</sup>	1.161	1.128 <sup>ab</sup>	2.013 <sup>b</sup>	1.072 <sup>b</sup>	1.116	1.144	1.030 <sup>b</sup>
V	2.821 <sup>a</sup>	2.497 <sup>ab</sup>	1.777 <sup>a</sup>	1.525 <sup>a</sup>	1.373 <sup>a</sup>	1.185	1.138 <sup>ab</sup>	2.884 <sup>a</sup>	1.259 <sup>a</sup>	1.104	1.190	1.127 <sup>ab</sup>
VI	2.699 <sup>a</sup>	3.168 <sup>a</sup>	1.664 <sup>b</sup>	1.324 <sup>ab</sup>	1.352 <sup>ab</sup>	1.139	1.100 <sup>ab</sup>	2.109 <sup>b</sup>	1.320 <sup>a</sup>	1.043	1.113	1.297 <sup>a</sup>
VII	1.122 <sup>b</sup>	1.709 <sup>b</sup>	1.257 <sup>b</sup>	1.202 <sup>bc</sup>	1.317 <sup>ab</sup>	1.046	1.132 <sup>ab</sup>	1.850 <sup>b</sup>	1.063 <sup>b</sup>	1.046	1.057	1.119 <sup>ab</sup>
VIII	1.725 <sup>ab</sup>	1.770 <sup>b</sup>	1.214 <sup>b</sup>	1.249 <sup>b</sup>	1.180 <sup>ab</sup>	1.056	1.158 <sup>ab</sup>	1.978 <sup>b</sup>	1.039 <sup>b</sup>	1.002	1.238	1.124 <sup>ab</sup>
IX	1.438 <sup>b</sup>	1.791 <sup>b</sup>	1.208 <sup>b</sup>	1.211 <sup>bc</sup>	1.135 <sup>b</sup>	1.076	1.077 <sup>ab</sup>	1.581 <sup>bc</sup>	1.074 <sup>b</sup>	1.073	1.111	1.101 <sup>b</sup>
SEM	0.241	0.264	0.075	0.044	0.046	0.035	0.040	0.114	0.032	0.145	0.107	0.038
主效应分析 Main effect analysis												
叶酸	0	1.115 <sup>c</sup>	1.102 <sup>b</sup>	1.116 <sup>c</sup>	1.139 <sup>b</sup>	1.074 <sup>b</sup>	1.095	1.270 <sup>c</sup>	1.023 <sup>b</sup>	1.003	1.126	1.071
Folic acid/ (mg/kg)	2	2.220 <sup>a</sup>	2.308 <sup>a</sup>	1.545 <sup>a</sup>	1.328 <sup>a</sup>	1.162 <sup>a</sup>	1.122	2.335 <sup>a</sup>	1.217 <sup>a</sup>	1.088	1.149	1.152
SEM	5	1.429 <sup>b</sup>	1.757 <sup>b</sup>	1.226 <sup>b</sup>	1.221 <sup>b</sup>	1.211 <sup>b</sup>	1.122	1.803 <sup>b</sup>	1.059 <sup>b</sup>	1.040	1.135	1.115
维生素 B <sub>12</sub>	0	1.097 <sup>b</sup>	1.328 <sup>b</sup>	1.154 <sup>b</sup>	1.112 <sup>c</sup>	1.177	1.087	1.621 <sup>b</sup>	1.045 <sup>b</sup>	1.058	1.067	1.051 <sup>b</sup>
Vitamin B <sub>12</sub> / (μg/kg)	25	1.902 <sup>a</sup>	1.786 <sup>a</sup>	1.377 <sup>a</sup>	1.315 <sup>a</sup>	1.257	1.114	2.037 <sup>a</sup>	1.124 <sup>a</sup>	1.024	1.208	1.118 <sup>a</sup>
SEM	75	1.816 <sup>a</sup>	2.065 <sup>a</sup>	1.342 <sup>a</sup>	1.237 <sup>b</sup>	1.228	1.138	1.750 <sup>b</sup>	1.129 <sup>a</sup>	1.049	1.136	1.169 <sup>a</sup>
P值 P-value												
叶酸 Folic acid	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.005	0.632	<0.001	<0.001	0.774	0.966	0.061
维生素 B <sub>12</sub> Vitamin B <sub>12</sub>	0.001	0.010	0.004	<0.001	0.121	0.240	0.327	0.001	0.008	0.958	0.302	0.005
叶酸×维生素 B <sub>12</sub> Folic acid×vitamin B <sub>12</sub>	0.029	0.020	0.005	0.011	0.002	0.401	0.008	0.001	0.003	0.990	0.869	0.019



## 2.5 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠炎症相关基因表达的影响

由表 8 可知,除饲料添加维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡十二指肠 *IL-13* mRNA 相对表达量无显著影响 ( $P>0.05$ ) 外,饲料添加叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对十二指肠炎症相关基因表达均有显著影响 ( $P<0.05$ );叶酸和维生素 B<sub>12</sub>的互作效应对十二指肠 *TLR4*、*NF-κB*、*IL-1β* 和 *IL-10* mRNA 相对表达量有显著影响 ( $P<0.05$ )。除 II 组十二指肠 *NF-κB* mRNA 相对表达量与 I 组无显著差异 ( $P>0.05$ ) 外,II ~ IX 组十二指肠 *TLR4*、*NF-κB*、*TNF-α* 和 *IL-1β* mRNA 相对表达量均显著低于 I 组 ( $P<0.05$ ),II 组、V 组和 VI 组十二指肠 *IL-10* mRNA 相对表达量显著高于 I 组 ( $P<0.05$ )。

除饲料添加维生素 B<sub>12</sub>对空肠 *IL-1β* mRNA 相对表达量无显著影响 ( $P>0.05$ ) 外,饲料添加叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对空肠炎症相关基因表达均有显著影响 ( $P<0.05$ );叶酸和维生素 B<sub>12</sub>的互作效应对空肠 *TLR4*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-10* mRNA 相对表达量均有显著影响 ( $P<0.05$ )。V 组空肠 *TLR4* mRNA 相对表达量显著低于 IX 组 ( $P<0.05$ ),II ~ IX 组空肠 *NF-κB* mRNA 相对表达量显著低于 I 组 ( $P<0.05$ ),I 组和 III 组空肠 *TNF-α* mRNA 相对表达量显著高于 IV 组、V 组、VI 组和 VII 组 ( $P<0.05$ ),除 III 组外,其他各添加组空肠 *IL-1β* mRNA 相对表达量均显著低于 I 组 ( $P<0.05$ ),V 组空肠 *IL-10* mRNA 相对表达量显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。

饲料添加叶酸除对回肠 *IL-1β* 和 *IL-10* mRNA 相对表达量无显著影响 ( $P>0.05$ ) 外,对其他指标均有显著影响 ( $P<0.05$ );饲料添加维生素 B<sub>12</sub>对回肠 *TLR4*、*TNF-α*、*IL-10* 和 *IL-13* mRNA 相对表达量均有显著影响 ( $P<0.05$ );叶酸和维生素 B<sub>12</sub>的互作效应对回肠 *TLR4*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-10* 和 *IL-13* mRNA 相对表达量均无显著影响 ( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡生产性能的影响

叶酸是水溶性 B 族维生素,维生素 B<sub>12</sub>作为一

碳代谢的辅酶,两者都可以做为氨基酸互变中一碳集团的载体参与蛋白质的生物合成,对生命早期的生长发育非常重要<sup>[7]</sup>。雏鸡缺乏叶酸会出现生长不良,羽毛生长凌乱、色泽不佳,贫血及骨粗短症以及免疫功能低下等症状;缺乏维生素 B<sub>12</sub>则可能表现为厌食、生长不良和贫血等。李轶伟等<sup>[8]</sup>研究表明,肉鸡基础饲料中添加叶酸可显著提高其平均日增重,且以 3 mg/kg 叶酸添加组效果最好。薛安永等<sup>[9]</sup>研究表明,饲料添加 1.64 mg/kg 叶酸能显著提高 8 周龄肉鸡平均日采食量和平均日增重。Jing 等<sup>[10]</sup>研究表明,在小麦-豆粕型饲料中添加 4 mg/kg 叶酸饲喂 24 周龄蛋鸡 8 周显著提高了其蛋重和日产蛋重。Bagheri 等<sup>[11]</sup>研究表明,饲料添加叶酸能够显著提高 52~58 周龄蛋鸡的产蛋率和平均蛋重。但也有研究表明,饲料添加叶酸对蛋鸡的生产性能无显著影响<sup>[12-17]</sup>,这与本试验研究结果一致。

### 3.2 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡蛋品质的影响

评价蛋品质的常规指标包括蛋形指数、蛋壳强度、蛋壳厚度、蛋黄颜色、哈氏单位和蛋白高度等。叶酸以四氢叶酸形式参与蛋氨酸、组氨酸及丝氨酸等氨基酸代谢,维生素 B<sub>12</sub>可使叶酸转变为四氢叶酸,从而提高叶酸的利用率<sup>[18]</sup>。而蛋氨酸又是家禽玉米-豆粕型饲料中的第一限制性氨基酸,其代谢直接影响蛋鸡的生产性能及蛋壳质量。El-Husseiny 等<sup>[19]</sup>研究表明,叶酸、维生素 B<sub>12</sub>和蛋氨酸的互作效应可显著增加 28~43 周龄白羽蛋鸡蛋壳比重,但对蛋壳厚度无显著影响。叶酸和维生素 B<sub>12</sub>的添加可改善 33 周龄蛋鸡的蛋壳强度,其中 0.5 mg/kg 叶酸+0.01 mg/kg 维生素 B<sub>12</sub>组蛋壳强度最大为 4.2 kg/cm<sup>2</sup>,比对照组提高了 17.32%<sup>[20]</sup>。本试验中,饲料添加叶酸显著提高了蛋鸡的蛋形指数和蛋壳厚度;叶酸和维生素 B<sub>12</sub>互作效应显著提高了鸡蛋哈氏单位,且当添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>时,哈氏单位最高。而哈氏单位越高,表明鸡蛋蛋白品质越好,这也说明饲料添加叶酸和维生素 B<sub>12</sub>后,鸡蛋哈氏单位得到了改善。



### 3.3 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠组织形态的影响

家禽叶酸的主要吸收位点是十二指肠和空肠。肠道作为营养物质吸收的主要场所,其健康发育对家禽生长至关重要。肠道绒毛高度、隐窝深度及 V/C 值能反映肠道健康情况。肠黏膜组织结构的完整性是衡量肠免疫功能的重要指标<sup>[21]</sup>。绒毛的发育程度不仅反映肠黏膜结构的完整性,而且决定了机体对营养物质的吸收能力。绒毛越长,肠道与营养物质的接触面积越大,营养物质的吸收就越好<sup>[22]</sup>;隐窝深度异常加深与增生,可能意味着肠黏膜发生病变<sup>[23]</sup>,因此 V/C 值能够反映肠黏膜形态结构及功能的整体状况<sup>[24]</sup>。本试验结果发现,饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>时,产蛋鸡十二指肠和空肠绒毛高度和 V/C 值均显著高于未添加组,且料蛋比降低、产蛋率提高,说明添加适量的叶酸和维生素 B<sub>12</sub>可改善肠道黏膜组织形态,促进肠道对营养物质的吸收。

### 3.4 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠屏障功能相关基因表达的影响

肠道黏膜屏障功能和结构的完整性对维持家禽肠道健康和生产具有重要的意义。完整的肠道黏膜屏障包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障和微生物屏障<sup>[25]</sup>。机械屏障是由肠黏膜上皮细胞、细胞间紧密连接等结构组成,是肠道屏障中尤为重要的一部分。紧密连接是由若干种特定功能蛋白所组成,其中 occludin、claudin-1 和 ZO-1 是 3 种关键的蛋白组分<sup>[26]</sup>。研究发现,occludin、claudin-1 和 ZO-1 减少会增加肠道通透性,因此在肠道紧密连接屏障中发挥着重要作用<sup>[27]</sup>。化学屏障主要是指覆盖在肠上皮细胞的黏液层。黏液层是机体抵御肠道病原微生物入侵的第 1 道防线,MUC2 是由杯状细胞分泌,是形成小肠黏液层的主要黏蛋白,因此 MUC2 表达量是作为评价肠道健康状态的重要指标之一<sup>[28]</sup>。MUC2 构成的凝胶黏液层结构牢固并保持高度稳定性,能够有效地保护肠上皮细胞和发挥屏障保护作用<sup>[29]</sup>。叶酸与维生素 B<sub>12</sub>联合应用的研究常见于医学报道,而在家禽营养学上的研究基本处于空白。本试验结果表明,饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>使得产蛋鸡十二指肠和空肠 occludin 和 MUC2 mRNA 相对表达量显著提高,这说明饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>可降低家禽

肠道通透性,抵制病原微生物入侵,阻止细菌在肠黏膜表面黏附,进而提高十二指肠和空肠对营养物质的吸收率,这与本试验发现饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>显著提高十二指肠和空肠绒毛高度和 V/C 值的结果相一致。因此我们推测叶酸和维生素 B<sub>12</sub>可能通过影响 V/C 值、肠道紧密连接蛋白以及 MUC2 表达的方式来维持和改善肠道物理和化学屏障功能,促进肠道对营养物质的消化吸收。

### 3.5 叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对产蛋高峰期京红蛋鸡小肠炎症相关基因表达的影响

肠道免疫屏障主要由肠道淋巴组织及免疫细胞构成,通过分泌免疫球蛋白、细胞因子和干扰素等维持肠道稳态。研究发现,TLR4 与肠上皮细胞屏障完整性相关。TLR4 在肠黏膜炎症性疾病中调控炎症性发展,并且 TLR4 的表达水平会上升<sup>[30]</sup>。TLR4 基因表达可影响下游信号通路促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-1β 的产生。肠道 TNF-α、IL-1β 能够引起炎症介质释放,参与肠道炎症性疾病的发展过程。抗炎性细胞因子 IL-10 和 IL-13 能够在体内抑制活化的 T 细胞产生炎症细胞因子,抑制炎症反应的发生。叶酸和维生素 B<sub>12</sub>缺乏将导致白细胞数量减少,淋巴细胞功能损害,进而影响体液免疫,造成中性粒细胞杀菌能力下降<sup>[31]</sup>。高庆<sup>[32]</sup>研究表明,饲料添加适宜剂量的叶酸可明显改善机体免疫机能,提高仔猪抗病毒的能力。Abd Allah 等<sup>[33]</sup>研究表明,饲料添加叶酸可以降低小鼠肝脏炎症因子 NF-κB 和 IL-1β 的表达。本试验结果表明,饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>显著降低十二指肠和空肠 TLR4、TNF-α 和 IL-1β mRNA 相对表达量,显著降低下游转录因子 NF-κB mRNA 相对表达量,从而减少了肠道炎症性疾病的发生,说明饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>对该段肠道健康有正向调节作用。但在回肠中,叶酸和维生素 B<sub>12</sub>互作效应对 TNF-α 和 IL-1β mRNA 相对表达量未产生显著影响,说明叶酸和维生素 B<sub>12</sub>互作效应在不同肠道间存在一定的差异性。这可能与叶酸在十二指肠和空肠中吸收有关。本试验同时发现,饲料添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>能够提高十二指肠和空肠 IL-10 mRNA 相对表达量,说明叶酸和维生素 B<sub>12</sub>互作可以通过增强体液免疫,维护肠道健康。

## 4 结 论

饲料添加适宜水平的叶酸和维生素 B<sub>12</sub>可提高产蛋高峰期京红蛋鸡鸡蛋的哈氏单位,改善十二指肠和空肠的组织形态,上调十二指肠和空肠 occludin、ZO-1、MUC2 和 IL-10 mRNA 的表达,下调十二指肠和空肠 NF-κB、TLR4 及其下游信号通路 TNF-α 和 IL-1β mRNA 的表达,进而增强肠道免疫功能。本试验中,以饲料(含 1.35 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>)添加 2 mg/kg 叶酸和 25 μg/kg 维生素 B<sub>12</sub>效果较好。

## 参考文献:

- [ 1 ] 盘瑶晖.叶酸在动物生产中的应用[J].饲料与畜牧, 2015(11):45-47.  
PAN Y H. Application of folic acid in animal production[J]. Feed and Animal Husbandry, 2015(11):45-47. (in Chinese)
- [ 2 ] 赵翰卿,李欣怡,汪瑞琦,等.维生素家族对免疫细胞影响的研究进展[J].生命科学,2020,32(4):343-348.  
ZHAO H Q, LI X Y, WANG R Q, et al. Research progress of the vitamin family on immunocytes[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2020, 32(4):343-348. (in Chinese)
- [ 3 ] 尹秀玲,薛瑞辰,张富梅,等.雏鸡叶酸需要量的试验观察[J].畜牧与兽医,2002,34(4):7-8.  
YIN X L, XUE R C, ZHANG F M, et al. Folic acid requirement in female chicken[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2002, 34(4):7-8. (in Chinese)
- [ 4 ] 丑武江,郭雄全,葛文霞.叶酸对肉仔鸡蛋白质和生产性能影响的研究[J].新疆农业科学,2009,46(5):1140-1143.  
CHOU J W, GUO X Q, GE W X. Effect of folic acid on protein and production performance of broilers[J]. Xinjiang Agricultural Science, 2009, 46(5):1140-1143. (in Chinese)
- [ 5 ] 龙建华,王宝维,孔敏,等.饲料中维生素 B<sub>12</sub>添加水平对 5~15 周龄五龙鹅生长性能、肠道发育和盲肠菌群结构的影响[J].动物营养学报,2018,30(10):3930-3940.  
LONG J H, WANG B W, KONG M, et al. Effects of vitamin B<sub>12</sub> supplemental level on growth performance, intestinal development and microflora structure in cecum of Wulong geese aged from 5 to 15 weeks [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(10):3930-3940. (in Chinese)
- [ 6 ] 鲁建伟.日粮中添加叶酸和甜菜碱对肉仔鸡生理生化 and 生产性能影响的研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2000.  
LU J W. Effect of dietary folic acid and betaine addition on the performance of broilers [D]. Master's Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000. (in Chinese)
- [ 7 ] 柳桢.母乳中叶酸与维生素 B<sub>12</sub> 研究进展[J].卫生研究,2013,42(2):331-335.  
LIU Z. Progress of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in breast milk[J]. Journal of Hygiene Reserch, 2013, 42(2):331-335. (in Chinese)
- [ 8 ] 李轶伟,张卫东,刘照文.叶酸对肉仔鸡生产性能影响的研究[J].畜牧业环境,2020(5):37-38.  
LI Y W, ZHANG W D, LIU Z W. Study on the effect of folic acid on broiler performance[J]. Animal Industry and Environment, 2020(5):37-38. (in Chinese)
- [ 9 ] 薛安永,曹体婷,孙永强,等.叶酸对肉杂鸡日增重及血液生化指标的影响[J].上海畜牧兽医通讯,2008(4):60-61.  
XUE A Y, CAO T T, SUN Y Q, et al. Effect of folic acid on daily gain and blood biochemical indexes of broilers[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008(4):60-61. (in Chinese)
- [ 10 ] JING M, MUNYAKA P M, TACTACAN G B, et al. Performance, serum biochemical responses, and gene expression of intestinal folate transporters of young and older laying hens in response to dietary folic acid supplementation and challenge with *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. Poultry Science, 2014, 93(1):122-131.
- [ 11 ] BAGHERI S, JANMOHAMMADI H, MALEKI R, et al. Laying hen performance, egg quality improved and yolk 5-methyltetrahydrofolate content increased by dietary supplementation of folic acid[J]. Animal Nutrition, 2019, 5(2):130-133.
- [ 12 ] 田传欢,张俊平,唐守营,等.添加叶酸对蛋鸡生产性能及鸡蛋中叶酸含量的影响[J].饲料工业,2015,36(增刊2):34-36.  
TIAN C H, ZHANG J P, TANG S Y, et al. Effects of dietary folic acid supplementation on the performance and egg folate content of laying hens[J]. Feed Industry, 2015, 36(Suppl.2):34-36. (in Chinese)
- [ 13 ] HEBERT K, HOUSE J D, GUENTER W. Effect of di-

- etary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens[J]. *Poultry Science*, 2005, 84(10): 1533-1538.
- [14] ROTH-MAIER D A, BÖHMER B M. Fortification of eggs with folic acid as a possible contribution to enhance the folic acid status of populations[J]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2007, 77(4): 297-301.
- [15] JANIST N, SRICHANA P, ASAWAKARN T, et al. Effect of supplementing the laying hen diets with choline, folic acid, and vitamin B<sub>12</sub> on production performance, egg quality, and yolk phospholipid[J]. *Livestock Science*, 2019, 223: 24-31.
- [16] TACTACAN G B, RODRIGUEZ-LECOMPTE J C, KO, et al. The adaptive transport of folic acid in the intestine of laying hens with increased supplementation of dietary folic acid[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(1): 121-128.
- [17] MCCANN M E E, MCCRACKEN K J, HOEY L, et al. Effect of dietary folic acid supplementation on the folate content of broiler chicken meat[J]. *British Poultry Science*, 2004, 45(1): 65-66.
- [18] 赵伟超, 王志刚. 维生素 B<sub>12</sub> 研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(10): 147-148.  
ZHAO W C, WANAG Z G. Research progress of vitamin B<sub>12</sub>[J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 34(10): 147-148. (in Chinese)
- [19] EL-HUSSEINY O M E, SOLIMAN A Z, OMARA I I, et al. Evaluation of dietary methionine, folic acid and cyanocobalamin B<sub>12</sub> and their interactions in laying hen performance[J]. *International Journal of Poultry Science*, 2008, 7(5): 461-469.
- [20] 何欣, 王晓霞, 滑静. 饲料氰钴素 (VB<sub>12</sub>) 及叶酸 (VB<sub>11</sub>) 水平对蛋鸡生产性能及血液生化指标的影响[J]. *北京农学院学报*, 2001, 16(3): 51-53.  
HE X, WANG X X, H J. Effects of vitamin B<sub>11</sub> and B<sub>12</sub> on the performance and blood index of layers[J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2001, 16(3): 51-53. (in Chinese)
- [21] 赵怀宝. 丁酸钠对家禽肠道健康影响的研究进展[J]. *饲料研究*, 2020, 43(8): 126-129.  
ZHAO H B. Research progress on the effects of sodium butyrate on poultry intestinal health[J]. *Feed Research*, 2020, 43(8): 126-129. (in Chinese)
- [22] MEKBUNGWAN A, YAMAUCHI K. Growth performance and histological intestinal alterations in piglets fed dietary raw and heated pigeon pea seed meal[J]. *Histology and Histopathology*, 2004, 19(2): 381-389.
- [23] WALTON K D, WHIDDEN M, KOLTERUD Å, et al. Villification in the mouse: BMP signals control intestinal villus patterning[J]. *Development*, 2016, 143(3): 427-436.
- [24] RIASI A, MAHDAVI A H, BAYAT E. Effect of different levels of raw and heated grass pea seed (*Lathyrus sativus*) on nutrient digestibility, intestinal villus morphology and growth performance of broiler chicks[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99(5): 924-931.
- [25] 冯焱, 张芬鹤, 李建慧. 家禽肠道黏膜屏障结构及功能研究进展[J]. *中国家禽*, 2016, 38(4): 1-4.  
FEN Y, ZHANG F Q, LI L H. Research progress on the structure and function of intestinal mucosal barrier in poultry[J]. *China Poultry*, 2016, 38(4): 1-4. (in Chinese)
- [26] PORITZ L S, GARVER K I, TILBERG A F, et al. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly[J]. *Journal of Surgical Research*, 2004, 116(1): 14-18.
- [27] WANG B, FENG L, JIANG W D, et al. Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF-κB, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 125-137.
- [28] KIM Y S, HO S B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress[J]. *Current Gastroenterology Reports*, 2010, 12(5): 319-330.
- [29] 解玉怀, 王丽雪, 杨维仁, 等. 植物提取物对畜禽肠道免疫的影响及其调控机制[J]. *草业科学*, 2018, 35(10): 2500-2511.  
XIE Y H, WANG L X, YANG W R, et al. Effect on livestock gut mucosal immunity of plant extract and its mechanism[J]. *Pratacultural Science*, 2018, 35(10): 2500-2511. (in Chinese)
- [30] CARIO E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010, 16(9): 1583-1597.
- [31] 程漫漫, 王宝维, 张廷荣, 等. 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对五龙鹅肝脏中磷脂酸磷酸酯酶 1 基因表达量的影响及其与血清脂类代谢、脂肪沉积和肉质指标的相关性分析[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 669-680.

CHENG M M, WANG B W, ZHANG Y R, et al. Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on liver lipid phosphate phosphohydrolase 1 gene expression and its correlation with serum lipid metabolism, fat deposition and meat quality indices of wulong geese [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31 (2): 669–680. (in Chinese)

[32] 高庆. 饲料添加叶酸对断奶仔猪生产性能和免疫功能的影响研究 [D]. 博士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2011.

GAO Q. Effects of dietary supplementation with folic acid on growth performance and immune function in weanling pig [D]. Ph. D. Thesis. Sichuan Agricultural University, 2011. (in Chinese)

[33] ABD ALLAH E S H, BADARY D M. Folic acid protects against lead acetate-induced hepatotoxicity by decreasing NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  production and lipid peroxidation mediated cell injury [J]. Pathophysiology, 2017, 24(1): 39–44.

## Effects of Folic Acid and Vitamin B<sub>12</sub> on Performance, Small Intestinal Barrier Function and Related Gene Expression of Laying Hens

WU Xiaotian WEN Zhao LI Ruirui BAI Yan WANG Rui YANG Yu\*

(College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of dietary different levels of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on performance, egg quality, small intestinal tissue morphology, small intestinal barrier function and related gene expression of *Jinghong* laying hens at peak production. A total of 972 *Jinghong* laying hens at 28 weeks of age were randomly divided into 9 groups with 6 replicates per group and 18 hens per replicate. Using a two factors with three levels experimental design, the experimental diets were supplemented with folic acid and vitamin B<sub>12</sub> at different doses in the basal diet, the folic acid was set at three supplemental levels of 0, 2 and 5 mg/kg, and vitamin B<sub>12</sub> was set at three supplemental levels of 0, 25 and 75  $\mu$ g/kg, respectively. The adjustment period lasted for 2 weeks, and the experimental period lasted for 8 weeks. The results showed as follows: 1) dietary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> and their interaction had no significant effects on the performance of *Jinghong* laying hens ( $P > 0.05$ ). 2) Dietary 2 mg/kg folic acid significantly increased the egg shape index, egg shell thickness, yolk color and Haugh unit ( $P < 0.05$ ), dietary 25  $\mu$ g/kg vitamin B<sub>12</sub> significantly increased the egg shell thickness and Haugh unit ( $P < 0.05$ ), and their interaction significantly increased the Haugh unit ( $P < 0.05$ ). 3) Dietary 2 mg/kg folic acid significantly increased the villus height and villus height to crypt depth ratio (V/C) in jejunum and ileum ( $P < 0.05$ ), dietary 25  $\mu$ g/kg vitamin B<sub>12</sub> significantly increased the villus height and V/C in duodenum ( $P < 0.05$ ). The interaction of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> had a significant effect on the villus height and V/C in duodenum and jejunum ( $P < 0.05$ ), which in the 2 mg/kg folic acid and 25  $\mu$ g/kg vitamin B<sub>12</sub> supplemental group were significantly higher than those in the untreated group ( $P < 0.05$ ). 4) Dietary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> and their interaction had significant effects on the mRNA relative expression levels of occludin and mucins 2 (*MUC2*) in duodenum and jejunum ( $P < 0.05$ ), which in the 2 mg/kg folic acid and 25  $\mu$ g/kg vitamin B<sub>12</sub> supplemental group were significantly higher than those in the untreated group ( $P < 0.05$ ). 5) Dietary 2 mg/kg folic acid significantly decreased the mRNA relative expression levels of Toll-like receptor 4 (*TLR4*), nuclear factor- $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*), tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) and in-

terleukin-1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) ( $P < 0.05$ ), and significantly increased the interleukin-13 (*IL-13*) mRNA relative expression level ( $P < 0.05$ ) in duodenum, jejunum and ileum; dietary 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vitamin B<sub>12</sub> significantly decreased the mRNA relative expression levels of *TLR4* and *TNF- $\alpha$*  ( $P < 0.05$ ), and significantly increased the interleukin-10 (*IL-10*) mRNA expression level in duodenum, jejunum and ileum ( $P < 0.05$ ). The interaction of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> had a significant effect on the mRNA relative expression levels of *TLR4*, *NF- $\kappa\text{B}$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  and *IL-10* in duodenum and jejunum ( $P < 0.05$ ). The mRNA relative expression levels of *TLR4*, *NF- $\kappa\text{B}$* , *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  in duodenum and jejunum in the 2 mg/kg folic acid and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vitamin B<sub>12</sub> supplemental group were significantly lower than those in the untreated group ( $P < 0.05$ ), and the *IL-10* mRNA relative expression level in duodenum and jejunum was significantly higher than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ). In conclusion, appropriate level of dietary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> can improve the egg Haugh unit, small intestinal tissue morphology, small intestinal barrier function and expression of genes related to intestinal inflammation of *Jinghong* laying hens at peak production. It is better to add 2 mg/kg folic acid and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vitamin B<sub>12</sub> to the diet (containing 1.35 mg/kg folic acid and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vitamin B<sub>12</sub>). [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(5):2616-2630 ]

**Key words:** folic acid; vitamin B<sub>12</sub>; laying hens; performance; intestinal morphology; intestinal barrier function