



NCG 对热应激大骨鸡精液品质影响的研究

李佳慧,张焕琪,施佐,马巍,王春强*

(锦州医科大学畜牧兽医学院,辽宁锦州 121001)

摘要: 试验旨在探究热应激条件下日粮中添加不同浓度 N-羧甲酰谷氨酸(NCG) 对大骨鸡精液品质的影响。选取 48 只 25 周龄大骨鸡,随机分为 4 组,每组 12 只鸡,对照组饲喂基础日粮,N1、N2、N3 组分别在基础日粮中添加 0.08%、0.12%、0.16% NCG,每周对大骨鸡精液运动性能、活率、畸形率及抗氧化指标进行检测,试验期共计 90 d。结果表明:与对照组相比,试验组精子活力、质膜完整性与直线速率等显著提高($P < 0.05$),摆动性、鞭打频率差异不显著($P > 0.05$),精子畸形率显著下降($P < 0.05$);N1 组超氧化物歧化酶(SOD)活性最低,N3 组最高,N1 组与 N3 组间显著差异($P < 0.05$);各组间过氧化氢酶(CAT)活性、丙二醛(MDA)含量均无显著差异($P > 0.05$)。说明日粮中添加不同水平 NCG 降低了热应激对大骨鸡精液品质造成的不良反应,其中 N3 组效果最佳。

关键词: NCG;热应激;大骨鸡;精液品质;抗氧化指标

中图分类号: S831.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19848/j.cnki.ISSN 1005-2739.2023.10.0009

热应激是指动物在高温环境下无法通过自身的调节机制维持正常的体温,导致生理和行为上的改变^[1]。热应激持续时间过长或温度过高时,可以引起动物一系列生理和行为上的反应,如呼吸急促、翅膀张开、身体抽搐、昏昏欲睡、昏迷等现象,对动物造成严重影响^[2]。热应激可导致雄性动物精液质量、抗氧化指标下降;诱导大骨鸡机体产生氧化应激,对大骨鸡繁殖性能造成严重影响。这些影响可能是由于热应激导致激素分泌变化而引起的^[3]。为了缓解热应激对动物繁殖性能造成影响,可以在饲料中添加一些抗应激添加剂。

目前 N-羧甲酰谷氨酸(N-carbamylglutamate, NCG)已经成为动物日粮的常规添加剂。NCG 为白色结晶粉末或无色透明晶体,化学性质稳定,是精氨酸的一种有效前体^[4]。NCG 是 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)的功能类似物,成本低廉,在瘤胃中添加量较小。在妊娠母猪日粮中添加 NCG,能够显著降低胚胎死亡率,改善产仔性能,显著增加窝产活仔数及窝重^[5]。在大骨鸡饲料中添加 NCG,

可以通过调节机体代谢增强机体的抵抗力,减少因热应激引起的繁殖功能减退等^[6]。因此,夏季高温季节在大骨鸡饲料中添加 NCG 可以有效地缓解热应激造成的不良影响,促进大骨鸡生长速度和繁殖性能的提高,提高畜牧业的经济效益和社会效益^[7]。试验旨在研究热应激条件下日粮中添加不同浓度 NCG 对大骨鸡精液品质的影响,为进一步提高大骨鸡精液品质及繁殖性能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及分组情况

体重相近的 25 周龄雄性大骨鸡 48 只,锦州医科大学动物实验中心提供;NCG,江西省元昌工业有限公司提供。

将 48 只大骨鸡机分成 4 组,每组 12 只,对照组饲喂基础日粮,N1、N2、N3 组分别在基础日粮中添加 NCG 0.08%、0.12%、0.16%。

1.2 饲养管理

饲养模式采用单层笼养,试验期间于每日

收稿日期:2023-10-07

基金项目:辽宁省科技厅科技特派项目(2022JH5/10400133)

作者简介:李佳慧(1999—),女,硕士研究生,研究方向为动物遗传与繁育,2421222406@qq.com.

通信作者:王春强(1980—),男,教授,博士,硕士生导师,研究方向为动物遗传与繁育,153373682@qq.com.

08:00、12:00 和 18:00 各喂一次,自由饮水,执行常规免疫程序和饲养管理。试验共计 90 d,其中适应期 30 d,饲喂基础日粮,正试期 60 d,进行热应激处理。每周采集精液对大骨鸡精液品质进行检测。舍内每天光照 12 h。日常舍内温度 30 ℃ 持续 4~6 h,中午温度可达 35 ℃。为了避免温度过高对大骨鸡产生的危害,应及时监测舍内温度,保持 4~6 h 高温后进行降温。

1.3 精液的采集

采用腹背式按摩法采集精液,将精液置于 37 ℃ 恒温箱进行保温,先取 10 μL 原精用显微镜初步观察原精的活力与密度,进行精液品质评估,活力低于 80% 的精液弃用,将活力高于 80% 的精液按照 1:3 比例加入稀释液,再进行各项指标的检测。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 精子活率

取洁净试管,滴加 1 滴新鲜采集的精液和 1~2 滴伊红染色液,混匀,静置 30 s 后滴加 3 滴苯胺黑染色液,混匀放置 30~60 s。在载玻片上滴加 1 滴染色后精液,于显微镜下计数。在 1 000 倍镜下数 200 个精子,分别数出死精子和活精子,并计算各自的百分率。活精子的头部不易被染色,显微镜下观察时,精子的头部呈透明且无色;而死亡精子则因伊红染色液渗透到了细胞质,精子头部被染为红色,苯胺黑将背景染为黑色,使精子头部清晰可见。

1.4.2 质膜完整性

低渗肿胀试验(HOST)是一种评估精子质膜完整性的试验方法,当精子在低渗溶液中时水分子可以通过精子膜进入精子,使精子体积增大而膨胀。因此,通过观察精子的低渗膨胀情况可以评估精子膜的完整性。

质膜完整率(%) = 卷尾精子数/总精子数 × 100。

1.4.3 精子形态学

采用 G250 染色法染色,观察精子形态是否为正常。

畸形率(%) = 畸形精子数/计数精子总数 × 100。

1.4.4 精子运动性能

使用迈朗动物精子全自动分析仪检测精子活力、鞭打频率、直线速率、路径速率、曲线速率、侧摆幅值、移动角度、前向性。

1.4.5 抗氧化指标

将解冻后的精子按比例稀释至检测样品浓度,按试剂盒说明测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化

氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量。

1.5 数据分析与处理

试验数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析,平均数比较采用方差分析检验,结果以“平均值 ± 标准差 (Mean ± SD)”表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 精子活率检测与分析

大骨鸡适应期饲养 30 d 后,每周进行精液品质检测,试验结束时取各周测定的平均值进行分析。精子活率测定结果见表 1,伊红-苯胺黑染色图见图 1。由表 1 可以看出:与对照组相比,添加 NCG 的 3 个试验组精子活率均提高,其中 N2、N3 组显著高于对照组($P < 0.05$),N1 组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 精子活率测定结果

组别	活率
对照组	52.05 ^a ± 4.63
N1 组	53.51 ^a ± 6.50
N2 组	61.69 ^b ± 5.45
N3 组	71.97 ^c ± 4.39

注:同列数据肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$),相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

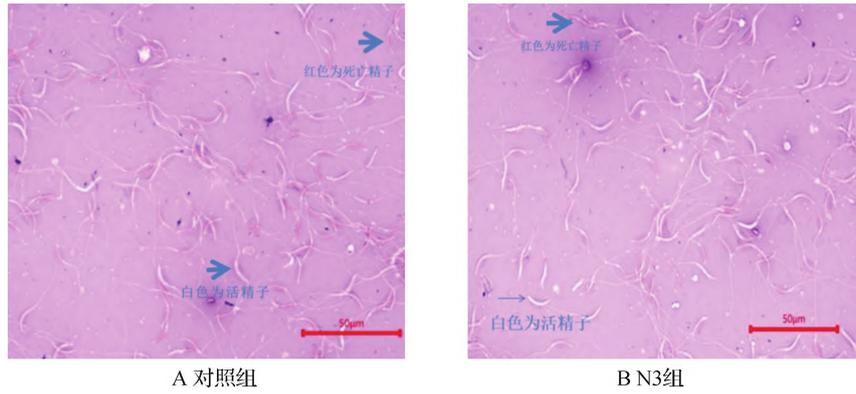
2.2 热应激对精子质膜完整性和畸形率的影响

精子质膜完整性和畸形率结果见表 2。由表 2 可以看出:与对照组相比,N1、N2、N3 组精子质膜完整性均有提高,其中 N3 组显著高于对照组($P < 0.05$),N1、N2 组与对照组差异不显著($P > 0.05$);N1、N2、N3 组精子畸形率均显著低于对照组($P < 0.05$)。

表 2 精子质膜完整性、畸形率测定结果

组别	质膜完整性	畸形率
对照组	56.90 ^a ± 4.78	8.17 ^a ± 1.05
N1 组	57.67 ^{ab} ± 5.84	6.63 ^b ± 0.53
N2 组	60.27 ^{ab} ± 4.21	6.67 ^c ± 0.64
N3 组	61.23 ^b ± 3.82	4.59 ^d ± 1.03

注:同列数据肩标字母完全不同表示差异显著($P < 0.05$),含相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。



注:箭头所示红色精子为死亡精子,白色精子为活精子。

图1 伊红-苯胺黑染色结果

Fig. 1 Eosin black staining

2.3 添加不同浓度 NCG 在热应激下对精子运动性能的影响

采用迈郎精子分析系统分析了热应激条件下大骨鸡精子的活力、活率和运动性能,结果见表3。精子运动轨迹见图2。由表3可以看出:与对照组相比,N1、N2、N3组精子活力均有提高,其中N2、N3组显著高于对照组($P < 0.05$);N1、N2、N3组鞭打频率、直线速率、路径速率均有提高,但与对照组相比均差异不显著($P > 0.05$);N1、N2、N3组精子曲线速率均有提高,其中N3组显著高于对照组($P < 0.05$);N1、N2、N3组侧摆幅值与对照组均差异不显著($P >$

0.05);N2、N3组移动角度显著高于对照组($P < 0.05$);N3组前向性显著高于N1组($P < 0.05$)。说明大骨鸡精液中添加NCG能够显著提高精子的运动性能,减缓高温下热应激对大骨鸡精液品质造成的危害。

2.4 热应激对精液抗氧化指标的影响

热应激对精液抗氧化指标的影响见表4。由表4可以看出:N1、N2、N3组MDA含量均低于对照组($P > 0.05$),其中N3组最低;N3组SOD活性最高,显著高于N1组,但与对照组差异不显著($P > 0.05$);N1、N2、N3组CAT活性均高于对照组,但均与对照组无显著差异($P > 0.05$)。

表3 精子运动性能测定结果

Tab.3 Results of sperm motility

组别	活力 /%	鞭打频率 /(次·s ⁻¹)	直线速率/ (µm·s ⁻¹)	路径速率/ (µm·s ⁻¹)	曲线速率/ (µm·s ⁻¹)	侧摆幅值 /(U·m ⁻¹)	移动角度 /(°)	前向性
对照组	42.02 ^a ± 5.16	0.82 ± 0.17	20.07 ± 4.13	30.43 ± 3.82	43.00 ^a ± 3.40	12.59 ± 1.48	201.29 ^a ± 98.93	0.66 ^{ab} ± 0.07
N1组	43.33 ^a ± 4.30	0.83 ± 0.12	20.58 ± 3.65	32.21 ± 2.99	45.20 ^{ab} ± 4.47	12.84 ± 1.80	217.54 ^a ± 145.46	0.61 ^a ± 0.07
N2组	60.06 ^b ± 5.16	0.84 ± 0.14	20.73 ± 1.88	33.09 ± 6.73	46.72 ^{ab} ± 6.99	13.69 ± 1.40	324.12 ^b ± 102.44	0.65 ^{ab} ± 0.09
N3组	69.17 ^c ± 7.86	0.90 ± 0.15	21.47 ± 2.36	33.25 ± 3.08	47.02 ^b ± 3.65	13.77 ± 1.30	327.20 ^b ± 141.17	0.71 ^a ± 0.10

注:同列数据肩标字母完全不同表示差异显著($P < 0.05$),含相同字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

表4 精液抗氧化指标测定结果

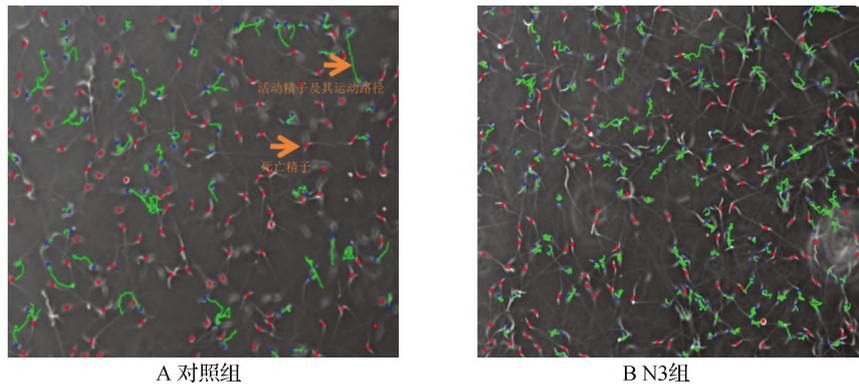
Tab.4 Results of semen antioxidant index determination

组别	MDA	SOD	CAT
对照组	483.56 ± 91.56	364.49 ^{ab} ± 103.21	24.21 ± 9.03
N1组	459.35 ± 25.82	315.63 ^b ± 85.60	28.05 ± 4.49
N2组	452.26 ± 21.14	359.05 ^{ab} ± 3.74	34.05 ± 9.09
N3组	435.14 ± 18.50	458.44 ^a ± 60.38	40.95 ± 25.42

注:同列数据肩标字母完全不同表示差异显著($P < 0.05$),含相同字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

在高温热应激条件下大骨鸡的精液品质受到极大损害,严重影响其繁殖性能的发挥。本试验结果表明,饲料中添加不同浓度NCG,使高温应激状态下大骨鸡的精子活率、运动性能、质膜完整性、畸形率均有所改善。有研究显示,在饲料中添加NCG能够促进内源精氨酸合成,生成NO和多胺,NO催化鸟苷酸(GMP)的产生^[8],导致血管内皮肌肉放松、血流量



注:A 图上面箭头处为活精子运动路径,为绿色;下面箭头处为死亡精子,为红色。

图2 精子运动轨迹

Fig. 2 Sperm movement trajectory

增大。多胺是一种促进细胞生长和分裂的物质,有助于促进动物的生长和发育^[9],还可以增加蛋白质的合成,提高动物的营养吸收能力,这些物质在动物体内发挥着重要的作用^[5]。因此,日粮中添加 NCG 可以改善动物的生长性能和繁殖性能,提高生产效率和经济效益;NCG 参与性行为的调控、睾丸微循环的调节、睾酮的分泌,这些对大骨鸡精子的产生及活力都具有重要的调控作用。

本试验通过检测大骨鸡精子活率、运动性能、质膜完整性、畸形率,判断精液品质的优劣程度。精子向前运动的能力一般分 a、b、c、d 四级,a 级为精子快速前向运动,b 级是指慢或呆滞地前向运动,c 级为非前向运动,d 级是不动的精子,本试验主要参考 a 级、b 级精子的运动轨迹。热应激下添加不同浓度 NCG 使大骨鸡精液品质均有提升,其中添加 0.16% NCG 的 N3 组的 a 级精子运动性能提高最为显著;对照组 b 级精子较多。添加 NCG 的 3 个试验组精子活率较对照组精子显著升高,畸形率下降,质膜完整性升高。精子质膜是精子最易损伤的部位,精子质膜损伤、精子膜渗透性增加会使细胞内离子(如钙离子)泄漏和抗氧化酶等酶活性降低^[10],发生严重代谢紊乱,影响精子的运动和活力。精子的质膜完整性直接反映精子损伤的程度。在本试验中,添加 NCG 的 3 个试验组精子头膜与尾膜的完整性都有所提高。头膜与尾膜结构都完整的精子活力和受精能力最强。综上所述,添加 NCG 的 3 个试验组精子活率、运动性能、质膜完整性都有提高。

精液及精子的抗氧化相关酶类参与鸡的热应激反应^[11]。饲料中添加 NCG 能有效提高精子过氧化氢酶活性,也可减缓脂质过氧化的程度。研究发现,当细胞内的脂质被氧化时会产生大量的 MDA,这进

一步加剧了细胞内的氧化应激程度。脂质过氧化过程中产生大量的 MDA,引发精子的过氧化反应,饲料添加 NCG 可以降低精液中 MDA 含量,减少过氧化应激对精子造成的损害^[12]。SOD 在精子中起着重要的抗氧化作用。它可以清除超氧阴离子并将超氧化物转化为氧和过氧化氢^[13],从而调控多种活性氧(ROS)水平。这有助于保护精子免受氧化应激的伤害^[14],维持其正常的形态和功能。在精浆中,SOD 可以防止精子样本中的磷脂和与磷脂结合的脂肪酸过氧化^[15],这是精子发育和成熟过程中的重要保护机制^[16]。此外,SOD 还可以减少氧化核酸损伤,这对于维持基因组的稳定性非常重要,缺乏 SOD 等抗氧化酶可能会导致 DNA 损伤的修复机制受损^[17]。CAT 在精子中催化过氧化氢分解成水和氧气的反应、维持较高过氧化氢酶活性,可以使精子免受氧化应激损害。过氧化氢是一种强氧化剂,可以对精子造成氧化损伤,影响精子的运动能力、形态和遗传物质的完整性。CAT 通过分解过氧化氢维持细胞的稳态,不仅可以反映细胞的抗氧化水平,还可以与其他抗氧化酶协同作用,共同抵御氧化应激对精子的损伤,维持精子的正常功能。本试验结果表明,在饲料中添加不同浓度 NCG 对热应激下精子抗氧化指标均有不同程度的缓解作用。

在高温天气应采取适当措施缓解热应激对动物繁殖功能的影响^[16],饲料中添加不同浓度的 NCG 可有效缓解精子氧化反应,提高精子活率、质膜完整性、运动性能,从而缓解热应激对大骨鸡精液品质造成的危害。

4 结论

大骨鸡饲料中添加不同水平 NCG 后,均可缓解

由于热应激导致的精液品质及繁殖性能下降,其中 0.16% NCG 对缓解动物热应激效果最佳。

参考文献:

- [1] OLADIMEJI A M, JOHNSON T G, METWALLY K, et al. Environmental heat stress in rabbits: implications and ameliorations[J]. Int J Biometeorol, 2022, 66(1):1-11.
- [2] WEST J W. Effects of heat - stress on production in dairy cattle [J]. J Dairy Sci, 2003, 86(6):2131-2144.
- [3] 田允波. 热应激对种公畜繁殖的影响[J]. 家畜生态, 1994, 15(1):40-42.
- [4] MCCOARD S A, PACHECO D. The significance of N - carbamoylglutamate in ruminant production [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2023, 14(1):48.
- [5] ZHU J L, ZENG X F, PENG Q, et al. Maternal N - carbamylglutamate supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival and development through modulation of the endometrial proteome in gilts[J]. J Nutr, 2015, 145(10):2212-2220.
- [6] PERINI F, CENDRON F, ROVELLI G, et al. Emerging genetic tools to investigate molecular pathways related to heat stress in chickens: a review[J]. Animals, 2020, 11(1):46.
- [7] FENG T, DEVORE A A, PEREGO M C, et al. Effects of N - carbamylglutamate and arginine on steroidogenesis and proliferation of pig granulosa cells *in vitro* [J]. Anim Reprod Sci, 2019, 209:106138.
- [8] 吴晓敏. NCG 促进性发育的动物模型建立及机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [9] PRABAKAR G, GOPI M, KOLLURI G, et al. Seasonal variations on semen quality attributes in Turkey and egg type chicken male breeders[J]. Int J Biometeorol, 2022, 66(8):1547-1560.
- [10] EL SABRY M I, ABDELFAHATTAH M H, ABDELLATIF H A, et al. The impact of magnetized drinking water on semen quality, fertility and hatchability rates of Fayoumi chicken [J]. Anim Biotechnol, 2023, 34(7):2353-2359.
- [11] BELHAD J, SLIMEN I, NAJAR T, et al. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review[J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2016, 100(3):401-412.
- [12] 蒋竹英. 褪黑素对动物机体受损伤的保护作用研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2023(3):89-91.
- [13] 黄坚. β -羟丁酸对热应激诱导的小鼠海马损伤的保护作用及其机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [14] BANG S, QAMAR A Y, TANGA B M, et al. Quercetin improves the apoptotic index and oxidative stress in post - thaw dog sperm [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(15):21925-21934.
- [15] 何纪垠, 邹新华, 卢秋咏, 等. 高温热应激对猪的影响及防治措施[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2023, 43(5):109-113.
- [16] 郭洪香. 热应激对小鼠睾丸的损伤及菟丝子提取物对其保护作用的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [17] 任莹, 吴涛涛, 周世龙, 等. 活性干酵母对高温应激条件下母猪猪体况、繁殖性能、乳成分和血清生化指标的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(10):304-308, 314.

The impact of NCG supplementation on semen quality of large-bone chickens under heat stress

LI Jiahui, ZHANG Huanqi, SHI Zuo, MA Wei, WANG Chunqiang*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of dietary supplementation of different concentrations of N-carbamylglutamic acid (NCG) on semen quality of large-bone chickens under heat stress. Forty-eight 25-week-old large-bone chickens were randomly divided into four groups, in each of which was 12 chickens. The control group was fed the basal diet, and the experimental groups (N1, N2 and N3) were fed the basal diets supplemented with 0.08%, 0.12% and 0.16% NCG, respectively. The motility, viability, malformation rate and antioxidant indexes of semen of big-bone chickens were tested weekly for a total of 90 d. The results showed as follows: compared with the control group, the semen vitality, progression and plasma membrane integrity were significantly increased ($P < 0.05$), the rates of sperm malformation were significantly decreased ($P < 0.05$), while the oscillating and whipping frequency showed no significant difference ($P > 0.05$) in 3 experimental groups. The superoxide dismutase (SOD) levels in group N3 were significantly higher than those in group N1 ($P < 0.05$), and there was no significant difference ($P > 0.05$) for CAT activity and the content of MDA among the groups. The study indicated that dietary supplementation of NCG could reduce the detrimental impact of heat stress to the semen quality of large-bone chickens and the supplementation of 0.16% NCG could produce the best mitigation effect.

Keywords: NCG; heat stress; large-bone chicken; semen quality; antioxidant index