

赖氨酸铜对仔猪血清 IGF-I、肝细胞膜 GHR 水平及肝脏、肌肉基因表达的影响

余斌, 傅伟龙, 刘平祥

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:为研究赖氨酸铜对仔猪生长的影响及其机理,选用21日龄断奶仔猪220头,均分为5组。A、B、C、D、E组分别在基础日粮(含铜15 mg/kg)中添加0、50、100、200 mg/kg 赖氨酸铜来源的铜和200 mg/kg 硫酸铜来源的铜。42、63日龄时称仔猪个体质量,并于63日龄每组屠宰4头,测定血清IGF-I、肝细胞膜GHR水平及肝脏、肌肉GHR mRNA、IGF-I mRNA含量。结果显示B、C、D、E组全期日增质量分别比A组提高8%、13.8% ($P < 0.05$)、16.7% ($P < 0.05$)、14.1% ($P < 0.05$);日粮中添加铜可显著提高血清IGF-I浓度、肝脏GHR mRNA水平($P < 0.05$)及肝细胞膜GHR特异结合活性($P < 0.05$),肝脏IGF-I mRNA水平有上升趋势但差异不显著($P > 0.05$)。结果提示:较低剂量赖氨酸铜来源的铜(100 mg/kg)可起到较高剂量硫酸铜来源的铜(200 mg/kg)的促生长作用;赖氨酸铜促进仔猪生长可能与其上调肝脏GHR、IGF-I的基因表达,提高生长轴GHR及血液中IGF-I水平有关。

关键词:赖氨酸铜; 仔猪; 日增质量; GHR mRNA; IGF-I

中图分类号:S816.7

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)04-0077-05

Effect of Cu-Lys on the Levels of Liver GHR and Serum IGF-I and the Gene Expression of GHR and IGF-I in Liver and Semitendinosus of Post-Weaning Pigs

YU Bin, FU Wei-long, LIU Ping-xiang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The objectives of the present study were to investigate the effect and mechanisms of Cu-Lys on pig performance. 220 pigs weaned at 21 d of age were divided into 5 treatments. Pigs in treatments A, B, C, D, E were fed with basal diets (15 mg/kg of Cu) supplemented with 0, 50, 100, 200 mg/kg of Cu from Cu-Lys and 200 mg/kg of Cu from copper sulfate. Pigs were weighted individually on days 42 and 63, respectively. Four pigs per treatment were killed to collect the samples of liver, ST for quantification of GHR mRNA and IGF-I mRNA. Results showed that compared with treatment A, the ADG increased 8%, 13.8% ($P < 0.05$), 16.7% ($P < 0.05$) and 14.1% ($P < 0.05$), respectively in treatments B, C, D, E. Supplement with Cu increased the GHR ($P < 0.05$), the expression of GHR mRNA in liver ($P < 0.05$), and serum IGF-I ($P < 0.05$), but the expression of GHR mRNA was not significant ($P > 0.05$). The results indicate that lower doses of Cu from Cu-Lys caused the same effect as higher doses of Cu from CuSO₄; One of the possible mechanisms on copper improving pig performance is that Cu stimulates the gene expression of GHR, improves the GHR in liver and serum IGF-I.

Key words: copper-lysine chelate; piglet; average daily gain; GHR mRNA; IGF-I

收稿日期:2007-05-25

作者简介:余斌(1970—),男,博士,现在深圳市农牧实业有限公司工作;通讯作者:傅伟龙(1938—),男,教授,E-mail:wl-fu327@21cn.com

基金项目:国家自然科学基金重点课题(39830290)

许多研究结果表明饲料中添加高剂量的铜可促进仔猪生长,提高饲料报酬^[1-2].高剂量铜在促进养猪生产的同时也带来环境污染问题^[3-4].赖氨酸铜(Cu-Lys)是赖氨酸与铜离子以配位键结合而成的螯合物,有资料报道赖氨酸铜具有较高的生物效价,可在较低剂量下达到高剂量无机铜的促生长效果^[5-6].高铜促生长机理,一般认为与其在肠道中的抗菌作用及提高仔猪采食量有关^[7-9].Zhou等^[6]的试验显示,在控制采食量、采用非消化道途径(静注)给仔猪供铜仍可促进生长,并提高垂体生长激素 mRNA 水平.此后也有研究涉及铜对仔猪血液生长激素水平的影响^[10].本试验在仔猪日粮中添加不同水平的赖氨酸铜,研究其对猪生长轴相关激素、受体水平及其在靶器官基因表达的影响,为开发利用安全、高效的铜源提供理论依据,促进畜牧业的可持续发展.

1 材料与方法

1.1 饲养试验

1.1.1 试验动物 试验选用21日龄断奶的纯种大白仔猪220头,根据体质量、性别比例相近的原则,将同胞仔猪均分到A、B、C、D、E5组,每组3次重复,分别饲养15、14、15头(共44头).A组为对照组,饲喂基础日粮(含铜15 mg/kg);B、C、D为添加赖氨酸铜试验组,分别在日粮中添加50、100、200 mg/kg赖氨酸铜来源的铜;E组为硫酸铜(CuSO₄)组,在基础日粮中添加200 mg/kg硫酸铜来源的铜.

1.1.2 试验日粮 试验期42 d,分3个阶段,各阶段基础日粮:21~30日龄饲喂第I期饲料(含铜15 mg/kg,消化能14.11 MJ/kg, w (粗蛋白)=21.3%),31~41日龄饲喂第II期饲料(含铜15 mg/kg,消化能13.94 MJ/kg, w (粗蛋白)=21.4%),42~63日龄饲喂第III期饲料(含铜15 mg/kg,消化能13.84 MJ/kg, w (粗蛋白)=19.6%).

1.1.3 饲养管理 仔猪21日龄断奶,称个体质量.分组后转入保育舍,栏舍为高床漏缝地板,保温灯保暖,自由采食和饮水,按猪场日常操作和免疫规程进行饲养管理.42、63日龄称个体质量后,各重复栏选6头接近平均体质量的仔猪前腔静脉采血,制备血清,以备生长激素受体(GHR)、类胰岛素生长因子-I(IGF-I)的测定.63日龄各组随机选4头(公、母各2头)屠宰,取肝脏(左后叶)、半腱肌,立即放入液氮冷冻后,置-70℃保存,以备mRNA含量测定.

1.2 血液 IGF-I 放射测定

根据刘根桃等^[11]所报道的方法略作改动.血清预处理采用酸醇抽提法,取40 μL血清至1.5 mL Eppendorf管,加360 μL酸醇混合液 V (2 mol/L盐酸):

V (无水乙醇)=1:7,混匀,25℃放置30 min,12 000 r/min、4℃离心2 min,取上清液0.2 mL加0.1 mL Tris-Base (pH=11)混匀,直接取50 μL采用放射免疫方法(RIA)测定.试剂盒购自天津九鼎医学生物工程公司,操作按说明书进行.

1.3 肝脏、肌肉细胞膜 GHR 特异结合活性的测定

1.3.1 肝细胞膜受体制剂的制备 称取洗净的肝脏3 g,加5 mL Buffer 1(含Tris-HCl 25 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L,蔗糖250 mmol/L, pH=7.4)于冰水浴中匀浆,4℃、3 000 r/min离心10 min;取上清液于4℃、12 000 r/min离心60 min;再取上清液于4℃、37 000 r/min离心30 min.弃上清液,沉淀加1 mL Buffer 3(含Tris-HCl 25 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L, NaN₃ 0.2 g/L, pH=7.4)重悬,-20℃保存.

1.3.2 肌肉细胞膜受体制剂的制备 取肌肉(半腱肌)3 g,液氮速冻,而后于研钵中研磨成粉状,加5 mL的buffer 1配成匀浆液,之后的处理同1.3.1.

1.3.3 细胞膜受体蛋白质含量的测定 采用Folin-酚法.

1.3.4 GHR 特异结合活性测定步骤 参照Tsushima^[12]及Breier等^[13]的方法.

1.4 GHR mRNA、IGF-I mRNA 的定量检测

1.4.1 引物 根据已发表的猪GHR cDNA序列、IGF-I基因序列^[14-15],委托上海生物工程公司合成GHR基因上游引物GP₁和下游引物GP₂.序列分别为,GP₁:5'-GAGATGCCTGTCCCAGACTATAC-3';GP₂:5'-TACCAAAGAAAGGCTAAGGCAT-3'.引物间理论跨幅为166 bp.IGF-I基因上游引物IP₁和IP₂序列分别为,IP₁:5'-AGCCCACAGCCTACGGCTC-3';IP₂:5'-CTTCTGAGCCTTGGGCATGTC-3'.引物间理论跨幅为179 bp.

1.4.2 组织总 RNA 的 RT-PCR 及产物的序列分析

总RNA提取试剂盒购自Promega公司.AMV逆转录酶、RNasin及常规PCR所用试剂为TaKaRa公司产品.反转录反应、常规PCR反应及PCR产物的纯化按一般方法进行.纯化的PCR产物序列测定由上海基康生物技术有限公司完成.

1.4.3 实时荧光定量 PCR 定量PCR反应采用SYBR Green PCR Core Reagents定量PCR试剂盒,在5700型实时荧光定量PCR仪(美国应用生物系统公司)上进行.25 μL反应体系含10×SYBR Green PCR Buffer(含染料和负参照)2.5 μL, AmpErase UNG 0.010 U/μL, AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0.025 U/μL, dNTP dATP, dCTP, dGTP, each 0.2 mmol/L, dUTP 0.4 mmol/L; MgCl₂ 2 mmol/L;引物P₁、P₂ 50 nmol/L; cDNA模板2 μL.定量PCR反应条件:50℃,2 min;95℃,10 min;95℃30 s,59℃

1 min, 36 个循环. 设阴性对照(无模板对照)、阳性对照(β -actin, 由上述试剂盒提供). 同一样品做 3 个重复, 按上述条件进行实时定量 PCR, 以检测结果的重复性.

1.5 数据处理与统计

数据采用平均数 \pm 标准误差表示, 用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 Duncan's 多重比较.

2 结果

2.1 赖氨酸铜对仔猪生产性能的影响

由表 1 知, 试验开始时(21 日龄)各组仔猪体质

量差异不显著($P > 0.05$), 42 日龄时, C 组体质量显著高于 A 组($P < 0.05$), 63 日龄时 C、D、E 组体质量均显著高于 A 组($P < 0.05$). 比较各组的日增质量, C、D、E 组仔猪试验前期(21 ~ 42 d)、后期(43 ~ 63 d)及全期(21 ~ 63 d)日增质量均显著高于 A 组($P < 0.05$). 全期日增质量 C、D、E 组分别比 A 组提高了 13.8%、16.7% 和 14.1%.

表 2 数据显示, 全期采食量 C、D、E 组均显著高于 A 组($P < 0.05$), 全期平均肉料比 B、C、D、E 组分别比 A 组提高了 0.8%、1.3%、2.1%、2.8%, 但与 A 组差异均不显著($P > 0.05$).

表 1 赖氨酸铜对仔猪体质量、平均日增质量的影响¹⁾

Tab.1 Effect of Cu-Lys on body mass and average daily gain (ADG) of piglets

组别 group	体质量 body mass/kg			平均日增质量 average daily gain/(g · d ⁻¹)		
	21 d	42 d	63 d	21 ~ 42 d	43 ~ 63 d	21 ~ 63 d
A	5.45 ± 0.14	9.88 ± 0.27 a	17.88 ± 0.37 a	207.8 ± 8.4 a	381.3 ± 10.9 a	294.6 ± 6.9 ac
B	5.43 ± 0.16	10.23 ± 0.33 ab	18.82 ± 0.45 ab	226.5 ± 10.2 ab	408.9 ± 11.2 ab	317.7 ± 8.3 cd
C	5.46 ± 0.14	10.68 ± 0.24 b	19.58 ± 0.42 b	246.7 ± 8.0 b	424.0 ± 13.8 b	335.4 ± 8.1 bd
D	5.41 ± 0.14	10.61 ± 0.29 ab	19.91 ± 0.42 b	246.7 ± 10.1 b	440.0 ± 12.0 b	343.9 ± 8.0 b
E	5.48 ± 0.14	10.54 ± 0.26 ab	19.63 ± 0.45 b	239.5 ± 9.5 b	432.8 ± 13.7 b	336.2 ± 9.9 bd

1) $\bar{x} \pm SE, n = 44$; 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

表 2 赖氨酸铜对仔猪采食量、肉料比影响¹⁾

Tab.2 Effect of Cu-Lys on average daily feed intake and feed efficiency of piglets

组别 group	采食量 average daily feed intake/(g · d ⁻¹)			肉料比 feed efficiency		
	21 ~ 42 d	43 ~ 63 d	21 ~ 63 d	21 ~ 42 d	43 ~ 63 d	21 ~ 63 d
A	353.6 ± 12.8 a	613.4 ± 15.4 a	483.5 ± 3.5 a	0.587 ± 0.039	0.621 ± 0.003	0.610 ± 0.003
B	369.3 ± 15.8 ab	665.3 ± 26.3 ab	517.3 ± 16.4 ab	0.609 ± 0.037	0.617 ± 0.001	0.615 ± 0.012
C	402.3 ± 10.1 b	690.7 ± 25.9 b	545.5 ± 14.4 b	0.617 ± 0.027	0.616 ± 0.008	0.618 ± 0.010
D	393.8 ± 13.8 ab	700.6 ± 22.3 b	552.3 ± 4.8 b	0.626 ± 0.034	0.620 ± 0.007	0.623 ± 0.008
E	383.1 ± 15.3 ab	688.2 ± 15.1 b	535.6 ± 12.6 b	0.623 ± 0.031	0.629 ± 0.005	0.627 ± 0.009

1) $\bar{x} \pm SE, n = 44$; 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

2.2 赖氨酸铜对血清 IGF-I 水平的影响

表 3 数据显示 42 日龄时 B、C、D、E 组仔猪血清 IGF-I 水平均高于 A 组, 其中 C、E 组与 A 组差异显著($P < 0.05$). 63 日龄时, C、D、E 组仔猪血清 IGF-I 水平都高于 A 组, 其中 D 组与 A 组差异显著($P < 0.05$).

表 3 赖氨酸铜对仔猪血清 IGF-I 水平的影响¹⁾

Tab.3 Effect of Cu-Lys on serum IGF-I levels of piglets

组别 group	ρ (IGF-I)/(ng · mL ⁻¹)	
	42 d	63 d
A	188.5 ± 10.2 a	190.6 ± 8.5 a
B	197.9 ± 7.3 ac	189.4 ± 9.9 a
C	219.9 ± 11.7 bc	212.3 ± 11.7 ab
D	217.5 ± 13.5 ab	221.4 ± 11.3 b
E	237.8 ± 11.8 b	216.9 ± 10.7 ab

1) $\bar{x} \pm SE, n = 18$; 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

2.3 赖氨酸铜对 GHR 特异受体活性的影响

从表 4 数据看, 63 日龄时 B、C、D、E 组仔猪肝细胞膜受体容量均高于 A 组, 其中 D、E 组与 A 组差异显著($P < 0.05$). 受体结合率变化趋势与受体容量一致. B、C、D、E 组肌肉细胞膜 GHR 容量和受体结合率数值均高于 A 组, 但差异不显著($P > 0.05$).

2.4 赖氨酸铜对肝脏、肌肉 GHR mRNA 水平的影响

图 1 中可见样品泳道有一扩增产物的条带, 位于 Marker 100 ~ 250 bp, 可初步判定常规 RT-PCR 结果获得特异扩增. 测序结果表明, GHR cDNA 的 PCR 产物的序列与 Cioffi 等^[14]已发表的 GHR cDNA 相应序列同源, 证明 PCR 得到了阳性扩增. 由表 5 知, 饲料中添加不同水平的铜提高了仔猪肝脏 GHR mRNA 拷贝数, 其中 D 组与 A 组差异显著($P < 0.05$). 各组肝脏 GHR mRNA 与肝细胞膜蛋白 GHR 容量呈强的

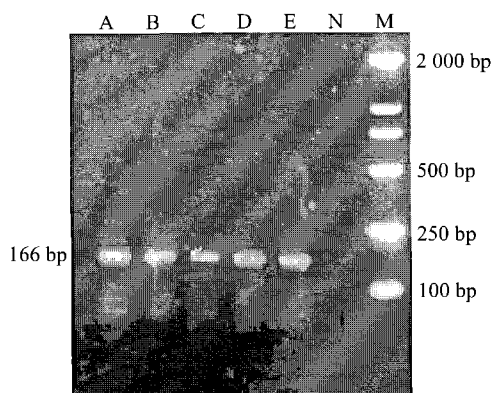
表4 赖氨酸铜对63日龄仔猪GHR受体容量($\times 10^{-9}$)和受体位点数($\times 10^6$)的影响¹⁾

Tab.4 Effect of Cu-Lys on GH binding capacity($\times 10^{-9}$) and binding site($\times 10^6$) of piglets on 63 d

组别 group	肝细胞膜 membrane of liver		肌肉细胞膜 membrane of muscle cell	
	受体容量 binding capacity	受体位点数 binding site	受体容量 binding capacity	受体位点数 binding site
A	1.57 ± 0.46 a	0.95 ± 0.28 a	1.60 ± 0.22	0.97 ± 0.13
B	1.65 ± 0.50 ab	0.99 ± 0.30	1.80 ± 0.84	1.09 ± 0.51
C	2.66 ± 0.59 ab	1.60 ± 0.36 ab	1.89 ± 0.88	1.14 ± 0.53
D	3.16 ± 1.05 b	1.90 ± 0.63 b	2.27 ± 0.40	1.37 ± 0.24
E	2.79 ± 1.07 b	1.68 ± 0.64 b	1.89 ± 0.30	1.14 ± 0.18

1) $\bar{x} \pm SE, n=4$; 同列数据后不同小字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

正相关($r = 0.862$)添加 200 mg/kg 赖氨酸铜来源的铜可显著提高肌肉 GHR mRNA 含量,但硫酸铜组却低于对照组.



M: DNA marker DL2000; N: 阴性对照; A、B、C: 肝脏样品; C、D: 肌肉样品

M: DNA marker DL2000; N: negative control; A, B, C: liver sample; C, D: semitendinosus sample

图1 GHR cDNA 的 PCR 产物凝胶电泳图

Fig.1 Electroghoretic figure of RT-PCR products of GRH mRNA

表5 赖氨酸铜对仔猪肝脏、肌肉中 RNA 所含 GHR mRNA 拷贝数的影响¹⁾

Tab.5 Effect of Cu-Lys on GHR mRNA copy numbers in liver and semitendinosus of piglets

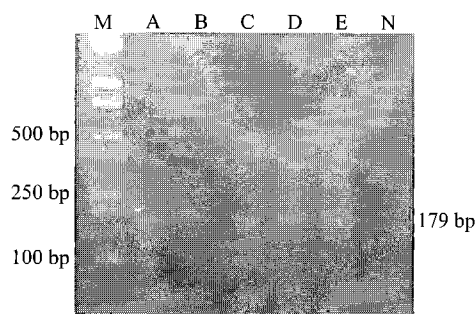
组别 group	肝脏 liver	半键肌 semitendinosus
	$\text{/(}10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{)}$	$\text{/(}10^5 \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{)}$
A	1.40 ± 0.34 a	4.39 ± 0.69 a
B	2.04 ± 0.45 a	3.52 ± 0.79 a
C	3.16 ± 1.18 ab	4.96 ± 0.30 ab
D	4.66 ± 0.64 b	8.12 ± 2.33 b
E	2.42 ± 1.19 ab	1.43 ± 0.34 a

1) $\bar{x} \pm SE, n=4$; 同列数据后不同小字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

2.5 赖氨酸铜对肝脏、肌肉 IGF-I mRNA 水平的影响

图2是 IGF-I cDNA 的 PCR 产物的凝胶电泳

图,样品泳道有一扩增产物的条带,位于 Marker 100 ~ 250 bp,与 179 bp 的位置相近. 测序结果表明,产物的序列与 Muller^[15]发表的猪 IGF-I cDNA 序列完全同源,说明得到了阳性扩增. 由表6知,饲料中添加不同水平的铜提高了仔猪肝脏 IGF-I mRNA 含量(除 B 组外),其中 E 组显著高于 A 组($P < 0.05$). 63 日龄仔猪肝脏 IGF-I mRNA 水平与血液 IGF-I 水平正相关($r = 0.947$). 肌肉中 IGF-I mRNA 的含量各试验组与 A 组差异均不显著($P > 0.05$).



M: DAN marker DL2000; N: 阴性对照; A、B: 肌肉样品; C、D、E: 肝脏样品

M: DNA marker DL2000; N: negative control; A, B: semitendinosus sample; C, D, E: liver sample

图2 IGF-I cDNA 的 PCR 产物凝胶电泳图

Fig.2 Electroghoretic figure of RT-PCR products of IGF-I mRNA

表6 赖氨酸铜对仔猪肝脏、肌肉中 RNA 所含 IGF-I mRNA 拷贝数的影响¹⁾

Tab.6 Effect of Cu-Lys on IGF-I mRNA copy numbers in liver and semitendinosus of piglets

组别 group	肝脏 liver	半键肌 semitendinosus
	$\text{/(}10^8 \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{)}$	$\text{/(}10^7 \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{)}$
A	2.37 ± 0.28 a	1.09 ± 0.32 ab
B	2.17 ± 0.30 a	0.39 ± 0.13 a
C	4.08 ± 1.29 ab	1.59 ± 0.37 b
D	4.18 ± 1.23 ab	1.24 ± 0.39 ab
E	4.91 ± 0.47 b	0.87 ± 0.24 ab

1) $\bar{x} \pm SE, n=4$; 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

3 讨论

以往用于促生长的铜源多为无机铜(如硫酸铜), 畜牧场使用高铜会给周边环境带来很多负面影响, 如引起土壤 pH 下降、作物减产等^[3-4]. 本次试验中添加铜源的 4 组均不同程度提高仔猪的生产性能, 其中 100 mg/kg 赖氨酸铜来源的铜效果与 200 mg/kg 硫酸铜来源的铜效果相当, 表明赖氨酸铜有较高的生物效价, 可在较低剂量下达到高剂量无机铜的促生长效果, 从而减少了畜牧场粪尿中所排放的铜离子对环境的影响, 是一种高效、环保型添加剂, 有利于养猪业的可持续发展.

生长轴是指动物体内从下丘脑、垂体到靶腺由一系列与动物生长发育密切相关的激素及受体所组成的神经内分泌系统. 生长激素是生长轴中调控动物生长发育的核心. 腺垂体分泌的生长激素(GH)通过血液循环运输到体内各组织器官, 主要在肝脏与肝细胞膜上的生长激素受体结合, 促进肝细胞分泌 IGFs, IGFs 再介导 GH 的生物学作用, 从而达到促生长作用. 本次试验测定了肝脏、肌肉细胞膜 GHR 特异结合活性及血液 IGF-I 水平, 结果显示添加 200 mg/kg 赖氨酸铜或硫酸铜为来源铜的 2 组仔猪肝脏 GHR 容量显著高于对照组, IGF-I 水平也显著增加 ($P < 0.05$), 表明高铜的促生长机理确实与其对生长轴激素、受体的调控有关.

添加赖氨酸铜或硫酸铜组仔猪 GHR、IGF-I 出现上行调节有 2 种可能原因: 一是 GHR、IGF-I 在血液中的降解率、清除率降低; 另一种可能是肝脏或 GHR、IGF-I 增多. 定量 PCR 结果显示, 仔猪肝脏 GHR mRNA、IGF-I mRNA 均随日粮铜水平的上升而上升. 分析各组肝脏 GHR mRNA 与肝细胞膜蛋白 GHR 容量的关系, 二者间呈强的正相关, 血液 IGF-I 水平与肝脏 IGF-I mRNA 的关系也呈正相关, 表明肝细胞 GHR、IGF-I 水平的升高是由于 GHR、IGF-I 基因表达增加, 从而合成增多引起的.

参考文献:

- [1] HILL G M, CROMWELL G L, CRENSHAW T D, et al. Growth promotion effect and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study) [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78(4): 1010-1016.
- [2] YEN F T, POND W G. Effects of carbadox, copper, or yucca shidigera extract on growth performance and visceral weight of young pigs [J]. *J Anim Sci*, 1993, 71(8): 2140-2146.
- [3] LINDON F C, HENRIQUES F S. Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1998, 39(3): 197-202.
- [4] LOPEZ ALONSO M, BENEDITO J L, MIRANDA M, et al. The effect of pig farm on copper and zinc accumulation in cattle in Galicia (north-western Spain) [J]. *Vet J*, 2000, 160(3): 259-266.
- [5] COFFEY R D, CROMWELL G L, MONEGUE H J. Efficacy of a copper-lysine complex as a growth promotant for weaning pigs [J]. *J Anim Sci*, 1994, 72(11): 2880-2886.
- [6] ZHOU W, KORNEGAY E T, VAN LAAR H, et al. The role of feed consumption and feed efficiency in copper-stimulated growth [J]. *J Anim Sci*, 1994, 72(9): 2385-2394.
- [7] SHURSON C P, KU K, MILLER E R. Physiological relationship between microbiological status and dietary copper levels in the pig [J]. *J Anim Sci*, 1990, 68(4): 1061-1071.
- [8] KORNEGAY E T, VAN HEUGTEN P H, LINDEMANN M D, et al. Effects of biotin and high copper levels on performance and immune response of weanling pigs [J]. *J Anim Sci*, 1989, 67(6): 1471-1477.
- [9] WINDISCH W M, GOTTERBARM G G, ROTH F X. Effect of potassium diformate in combination with different amounts and sources of excessive dietary copper on production performance in weaning piglets [J]. *Arch Tierernahr*, 2001, 54(2): 87-100.
- [10] 罗绪刚, 李素芬, 刘彬, 等. 饲料铜源和水平对断奶仔猪垂体生长激素 mRNA 水平的影响 [C] // 吴常信. 面向 21 世纪动物科学与动物医学国际研讨论文集. 北京: 中国农业出版社, 2000: 71.
- [11] 刘根桃, 陈伟华, 郑元林, 等. 胰岛素样生长因子-1 的放射免疫测定方法的建立 [J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(2): 63-66.
- [12] TSUSHIMA T, MURAKAMI H, WAKAI K, et al. Analysis of hepatic growth hormone binding sites of pregnant rabbit crosslinked to I¹²⁵-labelled human growth hormone [J]. *FEBSL*, 1982, 147(1): 49-53.
- [13] BREIER B H, GLUCKMAN P D, BLAIR H T, et al. Somatotrophic receptors in hepatic tissue of the developing male pig [J]. *J Endocrinol*, 1989, 123: 25-31.
- [14] CIOFFI J A, WANG X, KOPCHICK J J. Porcine growth receptor cDNA sequence [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(21): 6451.
- [15] MULLER M, BREM G. Nucleotide sequence of porcine insulin-like growth factor: 5' untranslated region, exons 1 and 2 and mRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(2): 364.