

ACTH 和地塞米松对鸡血浆纤维连接蛋白 及血清生化指标的影响

梁礼成 刘健华 金久善 赵继勋 何诚

(中国农业大学动物医学院)

摘要 研究了肌肉注射促肾上腺皮质激素(ACTH, $6 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)和人工合成糖皮质激素地塞米松(DXM, $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)对 19 日龄和 39 日龄肉鸡血浆急性期蛋白——纤维连接蛋白(FN)——和血清生化指标的影响。结果如下: ACTH 和 DXM 处理 19 日龄鸡, 血浆中 FN 浓度在注射后 28 h 分别比对照组高 1.6 和 2.5 倍, 并持续到 52 h。39 日龄鸡 ACTH 处理组 FN 水平 4 h 后较对照组高 1.3 倍, DXM 组 FN 水平 28 h 时较对照组高 2 倍; ACTH 和 DXM 注射后 4 h 血糖和尿酸水平升高, DXM 处理使高血糖持续到 28 h; DXM 组胆固醇水平在 28 和 52 h 时明显比对照组高; 其他血清生化指标如总蛋白、白蛋白水平、谷草转氨酶活性均无明显变化。由此可见, ACTH 和 DXM 均可选择性地引起鸡血浆急性期蛋白纤维连接蛋白的浓度升高; 与其他血清生化指标的变化比较, ACTH 和 DXM 对血糖和尿酸浓度影响明显。

关键词 纤维连接蛋白; 促肾上腺皮质激素; 地塞米松; 肉鸡; 血清生化指标

分类号 S859.796

Effect of ACTH and Dexamethasone on Plasma Fibronectin Levels and Serum Biochemical Parameters in Broilers

Liang Licheng Liu Jianhua Jin Jiushan Zhao Jixun He Cheng

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract Using a single intramuscular administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH, at $6 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight) and the synthetic glucocorticoids, dexamethasone (DXM, at $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight), the effect of ACTH and DXM on broiler plasma fibronectin (FN) levels and other selected serum biochemical parameters were evaluated. The results showed as follows: Within 28 h of ACTH and DXM administration, plasma levels of FN were increased to 1.6 and 2.5 times over the control levels respectively and still kept at high level at 52 h. Serum levels of glucose and uric acid were increased significantly after 4h of ACTH and DXM administration and the glucose were still remained in high level at 28 h after administration of DXM. Cholesterol levels were increased by DXM after 28 h administration. Serum total protein, albumin and aspartate aminotransferase (AST) activity remained unchanged. The results indicated that the ACTH, DXM could selectively induce the increases of the acute phase proteins—fibronectin in chickens in circulating levels and influence the serum glucose and uric acid values dramatically.

Key words fibronectin; ACTH; dexamethasone; broiler; serum biochemical parameters

收稿日期: 1999-09-09

农业部“九五”重点课题资助

梁礼成, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

现代养禽业中不可避免地存在着各种应激因素如高温、寒冷、转群、免疫接种等,因此而导致家禽生长受阻、生产性能低下,对疾病的抵抗力下降和死亡率升高,造成巨大经济损失。应激因素通过神经-内分泌途径作用于机体,使ACTH(促肾上腺皮质激素)和糖皮质激素分泌明显增多,并由此而引起家禽营养、生理、代谢等方面发生变化。

近年来随着对应激反应研究的深入,人们发现应激还会引起急性期蛋白的变化。急性期蛋白(A PP)又叫应激敏感蛋白,是指一类在感染、创伤、炎症等应激原作用于动物机体时,其血浆浓度发生改变的蛋白质,主要由肝脏合成^[1]。纤维连接蛋白(FN)是一种A PP,在急性炎症或糖皮质激素作用下,鼠、兔、人、鸡血浆FN浓度升高^[2]。Gentry(1992)报道,ACTH和DXM均可使家兔血浆FN浓度升高,但给小牛注射ACTH,其血浆FN水平并不发生改变,说明FN等急性期蛋白在应激时的变化有种属差异性^[2]。虽然FN被认为是鸡的A PP,但都是在人工诱发炎症或离体培养肝细胞时得出的结论^[3],鸡血浆FN浓度能否在ACTH、糖皮质激素的作用下升高国内外还未见有报道。因此,本研究主要目的是通过应激反应模型,给肉鸡注射与应激反应有关的激素,即ACTH和糖皮质激素(地塞米松,DXM),检测鸡血浆FN浓度的变化,并与其他血清生化指标(如血糖、尿酸和胆固醇等)的变化进行比较,探讨激素对肉鸡内分泌、代谢方面的影响,为研究禽类应激的机制提供理论依据。为保证结果的准确性,也为比较不同发育阶段肉鸡对应激激素的反应,本研究观察了不同日龄肉鸡在注射激素后血浆FN的变化。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养条件

艾维茵商品代肉鸡,按常规育雏,采用自由饮水和采食。

1.2 分组和处理

19日龄时选56只体重相近的健康鸡,随机分成4组,每组14只,各分成2个重复,分别于鸡的腿部肌注DXM($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,按体重给药,下同)或ACTH($6\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$)或生理盐水($1\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$),对照组不做任何处理。其中ACTH购自Sigma公司(Lot 126H0037)、地塞米松磷酸钠注射液为浙江医药股份有限公司新昌制药厂生产(批号:980416)。39日龄时重复上述过程。

1.3 采血及血样处理

分别于处理后4、28、52 h自心脏采血,每次每组取7只鸡采血,每只采血3 mL,其中1 mL制血浆(3.8%柠檬酸钠抗凝,1份抗凝剂+9份血),2 mL制血清。血浆在采血后经 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min获得,立即保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中;血清在采血后静置2 h经 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min获得,当天检测血清生化指标。

1.4 检测项目和方法

1.4.1 血浆纤维连接蛋白 用双抗体ELISA法^[4]。 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 兔抗鸡FN IgG(pH 9.5碳酸盐缓冲液配制),包被96孔酶联板,每孔加 $100\ \mu\text{L}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置12 h或 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h以上;封闭溶液为1%明胶(溶于包被液中),置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;用含 $\text{NaCl}\ 0.13\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)配制标准鸡FN液或待测样品液,标准鸡FN按倍比稀释设7个不同浓度($15.6\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),鸡血浆 $1\cdot 5\ 000$ 稀释,以1% BSA作为阴性对照,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$,均设3个重复孔,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应100 min;抗FN IgG-HRP以上述PBS作 $1\cdot 1\ 000$ 稀释,每孔加

100 μL , 置 37 反应 80 min; 加底物溶液 37 显色 15 min, 用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液终止反应; 在酶标仪上设定测量程序后, 放入待测酶联板, 仪器计算并打印出标准曲线和样品的浓度。上述各层溶液加入以前均用含 0.5% Tween-20 的 PBS 溶液洗脱 3 次。兔抗鸡 FN IgG、标准鸡 FN、HRP 标记 IgG 均自制, 明胶购自 Sigma 公司。

1.4.2 血清生化指标 血糖 (GLU) 采用酶连续检测法; 总蛋白 (TP) 采用双缩脲法; 白蛋白 (ALB) 采用溴甲酚绿法; 尿酸 (UA) 采用尿酸酶-过氧化物酶法; 胆固醇 (CHO) 采用 CHOD-PAAP 法; 谷草转氨酶 (AST/GOT) 采用 IFCC 酶动力法。测定仪器为日立 7070 全自动生化分析仪, 药盒均购自北京中生生物工程高技术公司。

1.5 数据处理

用 SAS 软件处理数据进行显著性检验, 数据以平均值 \pm 标准差表示, 各处理组均与同一时间对照组比较。

2 试验结果

2.1 ACTH, DXM 和生理盐水对鸡血浆 FN 浓度的影响

从表 1 可以看出, 19 日龄鸡 ACTH 组和 DXM 组血浆 FN 浓度在注射后 28 h 分别比对照组高 1.6 和 2.5 倍, 52 h 后二组 FN 浓度仍显著比对照组高 ($P < 0.05$); 39 日龄鸡 ACTH 组 4 h 后 FN 水平较对照组高 1.3 倍, DXM 组 FN 水平 28 h 后较对照组高 2 倍; 生理盐水组 FN 浓度与对照组比各时间均无显著差异。

2.2 ACTH, DXM 和生理盐水对血清生化指标的影响

从表 2 可以看出, DXM 组 GLU 水平在注射后 4 h 和 28 h 显著比对照组高 ($P < 0.01$), ACTH 组 4 h 后 GLU 水平也较对照组高, 但统计无差异; ACTH 组和 DXM 组 UA 水平较对照组高 2~3 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$); DXM 组 CHO 水平在 28 h 和 52 h 后较对照组高 ($P < 0.05$); 二组 TP 水平 28 h 后比对照组稍低, 但差异不显著; AST 和 ALB 水平各组均无显著差异。生理盐水组各种生化指标均无明显变化。

表 1 注射 ACTH, DXM 和生理盐水对鸡血浆 FN 浓度的影响 ($\bar{X} \pm SE$) $\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

鸡 龄	处理后时间 t/h	对照组	生理盐水组	ACTH 组	DXM 组
19 日龄	4	0.35 \pm 0.11	0.31 \pm 0.06	0.34 \pm 0.07	0.31 \pm 0.05
	28	0.32 \pm 0.08	0.33 \pm 0.05	0.51 \pm 0.16*	0.79 \pm 0.27**
	52	0.34 \pm 0.10	0.31 \pm 0.08	0.46 \pm 0.11*	0.58 \pm 0.13*
39 日龄	4	0.45 \pm 0.07	0.43 \pm 0.06	0.60 \pm 0.10*	0.44 \pm 0.05
	28	0.42 \pm 0.08	0.41 \pm 0.04	0.47 \pm 0.06	0.84 \pm 0.12**
	52	0.41 \pm 0.07	0.45 \pm 0.09	0.42 \pm 0.05	0.52 \pm 0.09

注: * 表示该值与同一时间对照组比差异显著 ($P < 0.05$);

** 表示该值与同一时间对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 下同。

表 2 注射 ACTH,DXM 和生理盐水对血清生化指标的影响

指标	处理后时间 t/h	对照组	生理盐水组	ACTH 组	DXM 组
血糖 $\rho/mg \cdot dL^{-1}$	4	242.4 ± 12.2	241.4 ± 12.2	278.4 ± 20.7	377.4 ± 62.9*
	28	216.9 ± 19.0	206.1 ± 21.2	247.7 ± 104.6	386.4 ± 125.2*
	52	163.3 ± 7.5	177.1 ± 8.6	178.1 ± 13.6	182.7 ± 47.7
尿酸 $\rho/mg \cdot dL^{-1}$	4	4.80 ± 0.99	5.13 ± 1.16	9.20 ± 2.42*	12.47 ± 2.96**
	28	7.18 ± 1.92	6.02 ± 1.59	5.72 ± 1.27	8.85 ± 2.47
	52	3.05 ± 0.97	5.23 ± 0.95	4.92 ± 1.05	6.07 ± 0.95
胆固醇 $\rho/mg \cdot dL^{-1}$	4	122.8 ± 19.3	111.1 ± 9.9	127.1 ± 10.5	116.2 ± 11.8
	28	126.5 ± 18.9	114.4 ± 13.6	113.1 ± 19.8	183.4 ± 25.5*
	52	90.0 ± 15.4	102.0 ± 7.6	103.1 ± 12.4	162.0 ± 21.6*
总蛋白 $\rho/mg \cdot dL^{-1}$	4	238.0 ± 20.4	232.6 ± 11.9	228.7 ± 12.6	234.9 ± 13.8
	28	236.9 ± 12.7	253.5 ± 9.0	219.2 ± 19.4	207.8 ± 24.0
	52	234.2 ± 4.5	234.4 ± 1.2	233.3 ± 2.4	229.2 ± 3.4
白蛋白 $\rho/g \cdot L^{-1}$	4	15.3 ± 1.4	16.1 ± 1.1	16.8 ± 1.1	16.7 ± 1.3
	28	18.4 ± 0.8	16.9 ± 0.9	18.9 ± 1.4	20.1 ± 2.0
	52	14.6 ± 1.4	14.4 ± 0.5	15.0 ± 1.2	17.0 ± 1.7
谷草转氨酶 $U \cdot L^{-1}$	4	175.3 ± 51.1	164.4 ± 13.3	179.9 ± 28.4	223.3 ± 52.4
	28	150.3 ± 12.8	151.7 ± 13.9	168.3 ± 21.9	194.7 ± 40.9
	52	160.4 ± 11.2	160.6 ± 17.2	161.9 ± 23.7	191.1 ± 4.0

3 讨论

3.1 ACTH 和 DXM 对鸡血浆 FN 浓度的影响

FN 是一种高分子糖蛋白,主要以 2 种形式存在于动物体内:可溶性 FN 存在于血液和体液中;不溶性 FN 存在于细胞表面、结缔组织和基底膜中^[5]。FN 有促进细胞粘附、分化、迁移、增殖等功能,在血液凝集、伤口愈合、肿瘤的发生和转移及生殖发育过程中发挥着重要的作用,血浆中的 FN 还是单核-巨噬细胞系统的主要调理事物^[6]。

FN 作为急性期蛋白是由 Owens 在 1982 年首先提出的,他在给成年大鼠皮下注射松节油人工诱发急性炎症的同时,发现循环血中 FN 较正常水平增加了 2~4 倍^[7]。后来,许多学者研究发现在急性炎症或糖皮质激素作用下,大鼠、家兔、鸡、人的血浆 FN 水平升高^[2]。糖皮质激素被认为是调控肝脏合成急性期蛋白的一种因子,大量实验证明糖皮质激素可促进 FN 的合成^[3]。ACTH 作为糖皮质激素的刺激剂,也可使兔血浆 FN 浓度增加^[2]。本研究结果表明,注射 ACTH 或 DXM 后无论是 19 日龄还是 39 日龄鸡血浆 FN 浓度都升高了,进一步证实 FN 是鸡的一种急性期蛋白,也验证了糖皮质激素可促进 FN 合成的结论。DXM 处理组 19 日龄和 39 日龄肉鸡两次结果比较一致,但 ACTH 处理组,19 日龄鸡 FN 28 h 后升高并持续到 52 h,而 39 日龄鸡 4 h 后即升高,28 h 后又下降。ACTH 处理后,39 日龄肉鸡比 19 日龄肉鸡 FN 升高快可能与垂体-肾上腺轴发育较完善有关。Davis 发现,ACTH 不使 1 日龄鸡血浆皮质酮浓度升高,却使 3~7 日龄和 14 日龄鸡血浆皮质酮水平分别在注射后 6 h 和 4 h 达高峰。因此推测 19 日龄鸡的垂体-肾上腺轴发育还不够完善,肾上腺皮质对 ACTH 的反应较 39 日龄鸡迟钝,皮质酮释放慢,导致在 28 h 后才使血浆 FN 浓度升高,而 39 日龄鸡垂体-肾上腺轴发育完善,肾上腺皮质能迅速对 ACTH 作出反应,皮质酮很快增多并刺激肝细胞合成 FN。因此,4 h 后

即表现出血浆 FN 增多。从结果也可以看出,血浆 FN 浓度在 52 h 后仍较对照组高,说明 FN 等急性期蛋白的变化有可能用来反映动物的应激反应,但还需在进一步研究确定。血浆 FN 浓度升高是由于糖皮质激素作用于肝细胞,引发肝细胞合成 FN 增加并释放入血而使血浆浓度增加的^[3]。但增加的 FN 在应激反应过程中究竟有何作用尚需进一步研究。

3.2 ACTH 和 DXM 对血清生化指标的影响

ACTH 和 DXM 在引起鸡血浆急性期蛋白——纤维连接蛋白——浓度变化的同时,也使其他血清生化指标浓度发生改变。血糖变化历来是研究应激反应的重点对象,许多应激因素可使血糖升高^[8,9]。本研究结果中显示:ACTH 和 DXM 均使鸡血糖浓度升高,血糖水平在 DXM 组升高更显著,并持续到 28 h 后。这与 FN 的变化一致,说明注射的 DXM 剂量大,在体内作用时间长,而 ACTH 剂量相对较小,作用时间短,故呈现前述 FN 和血糖水平的变化。尿酸是禽类蛋白质、非蛋白氮和嘌呤等物质的主要分解代谢产物,ACTH 和 DXM 使尿酸浓度升高,这与 Saadom 的结果一致,说明糖皮质激素有促进蛋白质分解代谢的作用^[10]。从总蛋白的变化来看,ACTH 和 DXM 组 TP 水平均有所下降,也表明蛋白质的分解代谢加强了。地塞米松使胆固醇浓度显著升高,与 John 的报道一致^[11]。John 认为,升高的胆固醇与类固醇激素的合成减少有关,即外源性糖皮质激素通过反馈控制,引起内源性糖皮质激素合成下降,胆固醇利用减少,从而导致血浆 CHO 浓度升高。

4 结论

ACTH 和 DXM 均可使鸡血浆 FN 浓度升高,说明 FN 是鸡的一种急性期蛋白。

ACTH 处理使血糖和尿酸水平显著升高,使总蛋白水平下降,但差异不显著;DXM 处理使血糖、尿酸、胆固醇水平显著升高,并使高血糖持续到 28 h 后,使总蛋白水平下降及使 AST 活性上升,但差异不显著。

参 考 文 献

- 1 陈万芳. 家畜病理生理学 第 2 版, 北京: 中国农业出版社, 1997. 52, 53
- 2 Gentry P A, Lipton R M, Tremblay R R M, et al Adrenocorticotrophic hormone fails to alter plasma fibrinogen and fibronectin values in calves but does so in rabbits *Vet Res Commu*, 1992, 16: 253~ 262
- 3 Nimmer D, Bergtrom G, Hirano H, et al Regulation of plasma fibronectin biosynthesis by glucocorticoids in chick hepatocyte cultures *J Biochem*, 1987, 262(21): 369~ 375
- 4 查锡良, 任常春, 陈惠黎. 明胶亲和层析纯化人血浆纤维连接蛋白及其糖链结构的初探 *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19(4): 297~ 300
- 5 Hayes R D, Yamada K M. FN: Multifunctional modular glycoproteins *J Cell Bio*, 1982, 95: 369~ 377
- 6 Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors *Ann Rev Biochem*, 1988, 57: 375~ 413
- 7 Owens M R, Clinino C D. Synthesis of fibronectin by the isolated perfused rat liver. *Blood*, 1982, 59: 1305~ 1309
- 8 Donaldson W E, Christensen V, Kpueger K K, et al Effects of stressors on blood glucose and hepatic glycogen concentrations in turkey poults *Comp Biochem Phy A Comp Phy*, 1991, 100(4): 945~ 947
- 9 梁礼成, 金久善. 氯霉素对肉鸡血糖影响的研究 *北京农业大学学报*, 1992, 18(2): 229~ 232
- 10 Saadom A, Simon J, Leclercq B, et al Effect of exogenous corticosterone in genetically fat and lean chickens *Bri Poul Sci*, 1987, 28(3): 519~ 528
- 11 John T M, Viswanathan M, Etches R J, et al Influence of corticosterone infusion on plasma levels of catecholamines, thyroid hormones and certain metabolites in laying hens *Poul Sci*, 1987, 66(6): 1059~ 1063