

## 肉鸡腹水症发病机理研究：低温处理对肉鸡 心肌肌浆网钙泵活性与 $\text{Ca}^{2+}$ 摄取的影响

石岩<sup>1</sup> 何诚<sup>2</sup> 梁礼成<sup>2</sup> 乔健<sup>2</sup> 夏国良<sup>2</sup>

(1. 解放军总医院 实验动物室,北京 100057; 2. 中国农业大学 动物医学院,北京 100094)

**摘要** 采用超速离心法分离提纯右心室肌原纤维和肌浆网,测定低温处理早期肉鸡心肌肌浆网钙泵( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶)活性和肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 离子浓度,以揭示低温处理早期肉鸡右心室功能增强和肉鸡肺动脉高压的机制。结果表明:1)19、27、33和40 d低温处理组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性较对照组显著性升高,33 d时活性达到最高。肺动脉高压组、肺动脉低压组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性较对照组显著性升高,其中肺动脉高压组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性是低压组的3倍,且差异极显著( $P < 0.01$ )。2)低温处理组19和21 d心肌肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 含量明显升高,与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。33和40 d低温处理组肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 摄取趋向减少,与对照组相比,差异不显著。肺动脉高压组与对照组相比,肌浆网摄取 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度显著性升高,差异显著( $P < 0.05$ );而且肺动脉高压组心肌肌浆网摄取 $\text{Ca}^{2+}$ 的量显著性高于肺动脉低压组( $P < 0.05$ )。这提示肉鸡右心室功能增强可能与肌浆网钙泵活性升高和钙离子摄取增加有关。

**关键词** 低温;肉鸡;钙泵活性;钙离子

中图分类号 S 858.31; S 852.33

文章编号 1007-4333(2003)03-0099-03

文献标识码 A

### Study on mechanism of broiler ascites: effect of low temperature on the activity of $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and $\text{Ca}^{2+}$ uptake in sarcoplasmic reticulum

Shi Yan<sup>1</sup>, He Cheng<sup>2</sup>, Liang Licheng<sup>2</sup>, Qiao Jian<sup>2</sup>, Xia Guoliang<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Department, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100057, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** In this experiment, the ventricular myofibrillar and sarcoplasmic reticulum were purified from right ventricular by supercentrifuge. In order to illustrate the mechanism of enlargement in right ventricular, the activity of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were determined after exposed to low temperature. The results are as following: the activity of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP increases significantly as compared with the control group on day 19, 27, 33 and 40, particularly the activity amounts to the maximum on day 33. If the birds were divided into the pulmonary hypertension group, pulmonary hypotension group and control group, the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP in pulmonary hypertension and hypotension group increased significantly compared with the control group. Furthermore, the activity of pulmonary hypertension group was three times of the pulmonary hypotension group ( $P < 0.01$ ). The concentration of SR  $\text{Ca}^{2+}$  rose significantly on day 19 and day 21 after exposed to low temperature ( $P < 0.05$ ), but on day 33 and day 40, the concentration decreased, and there no significantly difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The concentration of the pulmonary hypertension group was more than that of pulmonary hypotension group. The above results suggest that the enlargement of ventricular function may have the relation to the activity of SR- $\text{Ca}^{2+}$  and the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in sarcoplasmic reticulum.

**Key words** low temperature; broilers; activity of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP;  $\text{Ca}^{2+}$  ion

肉鸡腹水症主要发生于冬春季节,低温容易引起肉鸡肺动脉高压、右心肥大和心包积液<sup>[1,2]</sup>。本研究组的前期实验表明,低温处理后肉鸡右心室功能呈现增强趋势,而不是先增强后下降,左心室功能由代偿向失代偿转变,右心室功能增强早于肺动脉高压的发生<sup>[3,4]</sup>,到底是何种因素启动了右心室功

能增强,需要进一步的深入研究。

肌肉的收缩和舒张受细胞内钙浓度的调节,后者又受肌浆网、细胞膜钠钙交换机制、质膜钙泵和线粒体膜等钙池的调节。细胞膜上的钠钙交换机制钙移出速度一般只有肌浆网的1/4~1/3,细胞膜钙泵以及线粒体在心肌细胞钙移出中也起作用,其钙移

收稿日期:2003-04-08

作者简介:石岩,硕士,现在解放军总医院工作;何诚,博士,副研究员,联系作者,主要从事家禽疾病病理研究工作,

E-mail:hecheng@cau.edu.cn

出速度仅仅相当于肌浆网的2%左右,甚至更低,因此肌浆网对心肌细胞内钙离子的调节尤其重要<sup>[5,6]</sup>。缺氧、容量超负荷、激素水平的改变等因素都可改变肌浆网(SR)功能,从而改变心肌的收缩性能<sup>[7,8]</sup>。但有关低温对肉鸡心肌肌浆网钙泵活性的影响,肌浆网钙转运的关系尚未见报道。

本研究着重探讨低温处理早期肉鸡心肌肌浆网钙泵( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶)活性和心肌 $\text{Ca}^{2+}$ 离子浓度,以揭示低温早期肉鸡右心室功能增强的内在机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 200只艾维因商品代肉鸡和肉鸡饲料均购自北京大发正大有限公司。EGTA、 $\text{Na}_2\text{ATP}$ 为Fluk Chemie Co.生产。

IRIS Advantage等离子发射光谱仪,分辨率为 $< 0.005\text{ nm}$ ,波长范围为 $165 \sim 1\,050\text{ nm}$ 。Thermo Jarrell ASH Corporation生产。L-55超速低温离心机,Beckman公司。752分光光度计,上海分析仪器总厂。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 肺动脉高压模型的建立** 艾维因商品代肉鸡,体重为 $43 \sim 45\text{ g}$ ,饲养至15d时,随机分成2组,低温处理组( $n=100$ 只)和对照组( $n=100$ 只)。低温处理组肉鸡饲养方式、肺动脉压测定法、右心功能测定见前文报道<sup>[3]</sup>。按照肺动脉压力的测定值,分为肺动脉高压组(平均肺动脉压 $> 3.0\text{ kPa}$ ,分布为 $3.0 \sim 5.6\text{ kPa}$ )和肺动脉低压组(平均肺动脉压 $< 3.0\text{ kPa}$ ,分布为 $1.9 \sim 2.88\text{ kPa}$ )。

**1.2.2 心肌SR膜制备**<sup>[9]</sup> 测定右心功能后,利用3%戊巴比妥钠对试验鸡群实施麻醉,取出心脏,称取分离后的右心室组织 $200\text{ mg}$ ,加入 $1\text{ mL } 10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaHCO}_3$ 溶液中( $\text{pH}7.0$ )剪碎、匀浆3次,再加 $1\text{ mL } 10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaHCO}_3$ ,低温离心( $12\,400\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) $20\text{ min}$ ,上清液再次离心( $25\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) $45\text{ min}$ ,留上清液做钙含量的测定,沉淀悬浮于 $2\text{ mL}$ 含 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ KCl}$ 和 $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ 缓冲液中( $\text{pH}7.0$ ),第3次离心( $25\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) $45\text{ min}$ ,沉淀即为心肌SR。用 $1\text{ mL } 20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ 溶液( $\text{pH}7.0$ )混悬SR后,在48h内测定 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性,用考马斯亮蓝法测定SR膜蛋白浓度。

**1.2.3  $\text{SR } \text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶活性测定**<sup>[8~10]</sup> 将 $0.1\text{ mL}$ SR蛋白加入反应体系中( $\text{Tris-HCl } 50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{KCl } 100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{CaCl}_2 0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaN}_3$ ),总体积为 $1\text{ mL}$ 。37℃温育 $10\text{ min}$ ,以 $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{ATP}$ 启动反应。37℃孵育 $10\text{ min}$ ,

用 $1\text{ mL } 15\%$ 三氯乙酸终止反应。冰浴 $15\text{ min}$ 后离心( $3\,600\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )取上清,采用无机磷酸根法测定酶活性。总酶活性减去无 $\text{Ca}^{2+}$ 时ATP酶的活性即为 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性。酶活性单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

**1.2.4  $\text{Ca}^{2+}$ 含量测定**<sup>[7]</sup> 采用等离子色谱柱后衍生光度法。右心室匀浆离心除去血细胞等碎片后取上清液测定 $\text{Ca}^{2+}$ 含量,单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (右室湿重)。

**1.3 统计学处理** 数据用 $\bar{X} \pm \text{SX}$ 表示。2组间用t检验比较;多组间采用方差分析和直线相关分析。

## 2 结果

### 2.1 不同温度处理后肉鸡右心室心肌SR钙泵( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP)活性的变化(表1,2)

19、27、33和40d低温处理组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性较对照组显著性升高,与对照组相比增加了122%、110%、93%、103%;33d时达到较高活性。表2显示肺动脉高压组、肺动脉低压组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性较对照组显著性升高,肺动脉高压组SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性是低压组的3倍,差异极显著( $P < 0.01$ )。

表1 低温处理后肉鸡心室肌浆网钙泵( $\text{SR } \text{Ca}^{2+}$ -ATP)活性和 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度

Table 1 The activity of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in sarcoplasmic reticulum of broilers ventricular after exposed to low temperature

处理时间	心室肌浆网钙泵活性 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 20\text{ min}^{-1}$ )		肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	
	低温处理	对照	低温处理	对照
19 d	$2.0 \pm 0.9^{**}$ $n=10$	$0.9 \pm 0.4$ $n=11$	$22.3 \pm 7.8^*$ $n=13$	$11.3 \pm 6.1$ $n=11$
21 d	No data	No data	$15.7 \pm 7.9^*$ $n=14$	$10.1 \pm 1.8$ $n=15$
27 d	$5.9 \pm 3.6^{**}$ $n=20$	$2.8 \pm 2.5$ $n=14$	$11.1 \pm 3.5$ $n=10$	$7.5 \pm 5.8$ $n=11$
33 d	$7.2 \pm 4.7^*$ $n=11$	$3.7 \pm 1.3$ $n=10$	$5.2 \pm 1.8$ $n=10$	$4.2 \pm 2.1$ $n=11$
40 d	$5.5 \pm 2.1^{**}$ $n=12$	$2.7 \pm 1.4$ $n=10$	$4.2 \pm 0.9$ $n=10$	$4.0 \pm 0.9$ $n=12$

\*肺动脉高压组与对照组差异显著( $P < 0.05$ )

\*\*肺动脉高压组与对照组差异极显著( $P < 0.01$ )

### 2.2 不同温度处理后肉鸡心肌细胞摄取 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化(表1,2)

低温处理组19和21d肉鸡心肌 $\text{Ca}^{2+}$ 含量明显升高,并且差异显著( $P < 0.05$ );33和40d低温组 $\text{Ca}^{2+}$ 含量趋向减少,但与对照组相比,差异不显著。肺动脉高压组与对照组相比,肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 的含量显著性升高,差异显著( $P < 0.05$ ),并且肺动脉高压组 $\text{Ca}^{2+}$ 的含量显著性高于肺动脉低压组( $P < 0.05$ )。

表2 肺动脉高压组和低压组肌浆网钙泵活性和Ca<sup>2+</sup>浓度的变化Table 2 The variation of SR Ca<sup>2+</sup>-ATP activity and the Ca<sup>2+</sup> concentrations among the different groups

项目	对照组	低温处理 15	
		肺动脉低压组	肺动脉高压组
Ca <sup>2+</sup> 浓度/ (μg g <sup>-1</sup> )	4.2 ± 0.7 n = 33	5.9 ± 2.1 n = 18	12.3 ± 8.4 <sup>*#</sup> n = 15
SR Ca <sup>2+</sup> -ATP (μmol mg <sup>-1</sup> 20 min <sup>-1</sup> )	1.2 ± 0.6 n = 18	2.3 ± 0.8 n = 16	6.6 ± 3.6 <sup>**##</sup> n = 17

\*肺动脉高压组与肺动脉低压组差异显著(P &lt; 0.05)。

#肺动脉高压组与对照组差异显著(P &lt; 0.05)

### 3 讨论

#### 3.1 低温处理对肉鸡肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性、心肌摄取Ca<sup>2+</sup>的影响

正常状况下钙泵每分解1分子ATP可转运2分子的Ca<sup>2+</sup>,肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性反映了肌浆网调节细胞内钙的能力<sup>[8]</sup>。本实验显示低温处理后心肌细胞Ca<sup>2+</sup>浓度显著升高,肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶浓度呈增加的趋势,尤其是肺动脉低压组呈现较高的酶活性,这说明低温环境刺激心肌肌浆网钙泵活性首先升高,导致心肌细胞Ca<sup>2+</sup>转运活动加速,促进心肌收缩活动。心肌收缩活动增强也早于肺动脉高压,钙泵的活动可能影响肉鸡肺动脉压的变化,而不是相反。随着低温时间的延长肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活动增强是为了适应右心室功能代偿性增强的需要。而心肌细胞Ca<sup>2+</sup>浓度趋向正常,也正是肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶积极转运的结果,因为心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>负荷加重会引起的心肌损伤反应。

此外肺动脉高压组和低压组,心肌肌浆网Ca<sup>2+</sup>的差别,可能与2组血管紧张素、内皮素释放,自由基清除等出现的差异有关。作者的研究报告证实,低温环境处理后肺动脉高压组心室组织中血管紧张素含量、血浆中内皮素浓度增高,而心室组织中氧自由基清除酶(SOD和GSH)活性降低<sup>[11]</sup>。血管紧张素升高后,通过激活磷脂酶C,分解膜磷脂生成甘油二酯和IP<sub>3</sub>,后与肌浆网上IP<sub>3</sub>受体结合促进肌浆网内钙释放<sup>[5]</sup>。低浓度的外源性内皮素可以通过激活PLC,分解磷酸肌醇,形成IP<sub>3</sub>,引起细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高。氧自由基可以破坏SR膜脂质双层结构,使SR钙释放增加<sup>[12]</sup>。

#### 3.2 低温处理后肉鸡右心室收缩功能增强的可能机制

本实验显示心肌肌浆网摄取钙的活动增强,导

致右心室心肌收缩和舒张活动也加强,这可能是低温处理早期肉鸡右心室功能增强的内在因素。肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性升高,提示心肌肌原纤维Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP的活性升高,为心肌纤维收缩活动提供充足的能量,以保证右心室收缩功能增强的持久性,从而发挥右心室的代偿功能<sup>[13]</sup>。这可能是右心室持续性代偿性功能增强,不出现衰竭的生理学基础。此外右心室功能的增强可能还与内皮素、血管紧张素的释放有关,但这些缩血管因子所起的作用都是辅助性的。

### 4 结论

低温处理后肉鸡右心室功能增强,原因在于低温刺激心肌肌浆网Ca<sup>2+</sup>-ATP酶(钙泵)活性升高,摄取钙离子含量增加。

### 参 考 文 献

- [1] Julian R J. Ascite in poultry [J]. Avian Pathology, 1993, 22(1): 419 ~ 454
- [2] Maxwell M H, Robertson G W. World Broiler Ascites Survey 1996 [R]. Poultry International, 1997, April 16
- [3] 何诚,梁礼成,夏国良,等. 肉鸡腹水症发病机理研究:低温处理对左右心室功能的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 1 ~ 6
- [4] 董世山,乔健,乔惠理,等. 肺动脉高压与肉鸡腹水综合征发生发展的关系 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(4): 325 ~ 326
- [5] 吴立铃. 心血管病理生理学 [M]. 北京:北京医科大学出版社, 2000. 78 ~ 100
- [6] Cuneo M E, Grassi D E, Gende A O. Cardiac SR characteristic in hypertrophic hearts from SHRS [J]. Res Cardiol, 1988, 83: 268
- [7] 陈化,李云霞. 肥厚及肥厚逆转心肌钙负荷与肌浆网功能的研究 [J]. 湖南医科大学学报, 1995, 20(4): 311 ~ 313
- [8] 孙希武,叶益新,邓希贤. 不同程度减压低氧对心肌肌浆网钙摄取和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 1996, 18(1): 38 ~ 40
- [9] Jone J R, Edward D P, John R. Method in Pharmacology [M]. New York: Academic Press, 1984. 1 ~ 11
- [10] 沈铃. 医学药理学实验方法 [M]. 北京:卫生出版社, 1998. 514 ~ 516
- [11] 何诚,梁礼成,赵德明,等. 血栓素和前列环素在肉鸡肺动脉压中的作用 [J]. 动物医学进展, 2001, 22(4): 110 ~ 112
- [12] 姜振宇,郝克清,尚贵民,等. 氧自由基与心肌损伤 [J]. 心血管康复医学杂志, 2001, 10(1): 82 ~ 83
- [13] 邓希贤,蔡英年. 缺氧性肺动脉高压的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 1990, 70(2): 63 ~ 64