

## 缺氧对肉鸡心肌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响

董世山<sup>1</sup>, 王迎春<sup>1</sup>, 马利芹<sup>3</sup>, 利凯<sup>3</sup>, 张建军<sup>2</sup>, 欧德渊<sup>2</sup>, 赵立红<sup>2</sup>, 刘聚祥<sup>1</sup>, 乔健<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; <sup>2</sup>中国农业大学动物医学院, 北京 100094; <sup>3</sup>河北北方学院动物科技学院, 张家口 075001)

**摘要:**【目的】检测缺氧对肉鸡心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响, 阐明缺氧对心肌细胞影响的机制。【方法】利用体外细胞培养技术, 以 Fluo-3/AM 为  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂, 用 LSCM 检测缺氧对体外培养的肉鸡心肌细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响。【结果】与常氧组比较缺氧显著引起心肌细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  升高(常氧  $99.3 \pm 13.1$ , 缺氧  $129.4 \pm 24.3$ ,  $P < 0.01$ ), 钙通道拮抗剂 Verapamil (Ver) 和 Nifedipine (Nif) 可显著抑制缺氧引起的游离  $\text{Ca}^{2+}$  升高(缺氧 + Ver  $100.9 \pm 28.2$ , 缺氧 + Nif  $107.6 \pm 27.7$ )。【结论】缺氧能够增强心肌细胞的游离  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂能够减弱缺氧引起的心肌细胞膜上  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜转运。

**关键词:** 肉鸡; 心肌细胞; 游离  $\text{Ca}^{2+}$ ; 缺氧

## Effect of Hypoxia on the $\text{Ca}^{2+}$ Concentration in Broiler's Cardiac Muscle Cell

DONG Shi-shan<sup>1</sup>, WANG Ying-chun<sup>1</sup>, MA Li-qin<sup>3</sup>, LI Kai<sup>3</sup>, ZHANG Jian-jun<sup>2</sup>, OU De-yuan<sup>2</sup>, ZHAO Li-hong<sup>2</sup>, LIU Ju-xiang<sup>1</sup>, QIAO Jian<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001; <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094; <sup>3</sup>College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075001)

**Abstract:** 【Objective】The purpose of this experiment was to study the effect of hypoxia on the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in broiler's Cardiac Muscle Cell. 【Method】The concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the CMC was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM). 【Result】The results showed that hypoxia could significantly increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  of CMC (CMC: normal oxygen:  $99.3 \pm 13.1$ , hypoxia:  $129.4 \pm 24.3$ ,  $P < 0.01$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist (nifedipine, Nif; verapamil, Ver) can significantly restrain the  $\text{Ca}^{2+}$  influx across the cell membrane of CMC treated by hypoxia (CMC: hypoxia + Ver:  $100.9 \pm 28.2$ , hypoxia+Nif:  $107.6 \pm 27.7$ ,  $P < 0.01$ ). 【Conclusion】Hypoxia could increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  of CMC, The  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist can restrain the  $\text{Ca}^{2+}$  influx across the cell membrane of CMC treated by hypoxia.

**Key words:** Broiler chicken; Cardiac muscle cell;  $\text{Ca}^{2+}$ ; Hypoxia

## 0 引言

【研究意义】 $\text{Ca}^{2+}$  具有钙化、肌肉收缩、形成膜电位等基本生理功能, 但过量游离  $\text{Ca}^{2+}$  导致钙超载对细胞也具有损伤作用。胞外的刺激信号在引起细胞出现相应的病理生理变化时需要细胞信号转导系统的传递, 其中钙信号转导系统对细胞分化增殖肥大具有重要作用。因此细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的变化影响细胞的功能状态。研究细胞在不同条件下  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化在一定程度上能够揭示细胞的病理过程<sup>[1]</sup>。缺氧是诱发肉鸡腹

水综合征 (ascites syndrome, AS) 的主要因素, AS 患鸡出现严重的右心肥大扩张<sup>[2]</sup>, 因此, 研究缺氧对心肌细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响能够揭示 AS 的发病机制。【前人研究进展】研究细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度一直受测定方法的困扰。由于  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化快速, 就要求检测探针灵敏度高、特异性强、不受胞内结合钙和细胞器内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的干扰。同时检测仪器能够灵敏地反映出探针显示的细微变化。Fluo-3/AM 是目前检测细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化的较好探针, 与  $\text{Ca}^{2+}$  结合特异性强灵敏度高, 能够检测细胞内低浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  的变化。

收稿日期: 2006-03-22; 接受日期: 2007-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371063)、河北省自然科学基金项目 (302432)、博士点基金项目 (20030019032)

作者简介: 董世山 (1966-) 男, 河北赤城人, 教授, 博士, 研究方向为禽类心血管系统病理生理研究。Tel: 0312-7528346; E-mail: dongshishan@163.com。  
通讯作者乔健 (1963-) 男, 河北张北人, 教授, 研究方向为禽类循环系统病理学。Tel: 010-62732378; E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

酯化的 Fluo-3/AM 能够穿膜进入细胞,被胞内酯酶水解出 Fluo-3,Fluo-3 与  $\text{Ca}^{2+}$  络合,受 488 nm 激光激发而产生荧光,其荧光值与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度呈正相关,即能够以荧光值变化表示  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的相对值。水解后的 Fluo-3 不具备穿膜能力,因此细胞器内的  $\text{Ca}^{2+}$  不影响测定结果。测定与  $\text{Ca}^{2+}$  络合后 Fluo-3 的荧光变化常用荧光分光光度计和激光共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM),其中 LSCM 能够动态测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化,成为研究胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的主要手段<sup>[3,4]</sup>。张鑫<sup>[5]</sup>等研究表明钙离子通道拮抗剂对缺氧复氧心肌细胞具有保护作用。Akhmat<sup>[6]</sup>证实缺氧促使肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度升高,导致缺氧性肺动脉收缩过程。Lih<sup>[7]</sup>研究发现急性缺氧促进肺动脉平滑肌细胞胞内钙库释放,导致肺动脉收缩。Wang Jian<sup>[8]</sup>急性缺氧导致胞外钙离子内流,引起肺动脉平滑肌细胞收缩,出现缺氧性肺动脉高压。Letitia<sup>[9]</sup>钙离子通道拮抗剂阻止钙离子的流动,抑制缺氧性肺动脉收缩,抑制肺动脉高压的出现。利凯,孙茂红等<sup>[10,11]</sup>等发现钙离子通道拮抗剂维拉帕米和硝苯地平能够显著抑制低温诱发肉鸡腹水综合征的发生率,减轻右心肥大和肺动脉高压。【本研究切入点】利用培养的细胞研究缺氧与心血管疾病发生发展的内在联系已经成为现代医学研究的重要手段<sup>[12]</sup>。有关缺氧对心血管系统疾病影响的研究多数探讨缺氧引起肺动脉收缩进而导致肺动脉高压的机制。在缺氧对心肌细胞的影响方面研究较少。本研究在钙离子通道拮抗剂能够降低腹水发生率和缓解右心肥大的基础上,进一步利用细胞培养方法,揭示缺氧与心肌细胞钙离子浓度的关系,阐明肉鸡腹水综合征的发病机制。【拟解决的关键问题】肉鸡腹水综合征 (ascites syndrome, AS) 是常发于肉仔鸡,以心肌肥大为特征的疾病,目前研究表明缺氧是引起 AS 的主要原因。研究缺氧与心肌肥大的关系对于阐明 AS 的发病机制具有重要意义。对体外培养的肉鸡心肌细胞 (cardiac muscle cell, CMC) 进行缺氧处理可以较好地模拟 AS 发病过程中肉鸡心功能的变化。研究缺氧对心肌细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的影响,有助于阐明  $\text{Ca}^{2+}$  在 AS 发生发展过程中的作用,为控制 AS 的发生提供理论基础。目前尚未见相关研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 材料 心肌细胞为本实验室自行培养鉴定的细胞<sup>[13]</sup>。

1.1.2 试剂 Fluo-3/AM, M199, Nifedipine (Nif), Verapamil (Ver) 均为 sigma 产品;胎牛血清 浙江三利生物制品厂;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试剂配制 Fluo-3/AM 配制 取 Fluo-3/AM 500  $\mu\text{g}$ , 用无水 DMSO 配成浓度为 10  $\text{mmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的浓缩液,分装冷冻保存,使用浓度为 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Nifedipine 和 Verapamil 使用三蒸水配制, Nifedipine 使用浓度为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Verapamil 使用浓度为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

M199 培养液:取 M199 15.1 g 溶于 1 000 ml 三蒸水中, 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌,使用前加入胎牛血清 200 ml 并加入 10 万 IU 青霉素和 100 mg 链霉素,调节 pH 7.0 ~ 7.2。

含钙液的配制: KCl 0.4g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06g; NaCl 8.0g; 葡萄糖 1 g;  $\text{NaHCO}_3$  0.35g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06g;  $\text{CaCl}_2$  10.14g; 1% 酚红 2 ml; 加三蒸水至 1 000 ml, 高压灭菌, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.1.4 主要试验仪器 激光共聚焦显微镜, 型号为 MRC1024 (Bio-Rad, USA) 采用氪氖 (krypton-argon) 激光光源, 荧光显微镜型号为 BH-2 (Olympus, Japan); 无菌操作台 VBM-42BI BAKEI.CO.USA; 二氧化碳培养箱 Forma Scientific; 倒置显微镜 (Nikon, Japan)。

缺氧装置: 低氧装置为自制有机玻璃小室, 以 25  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  连续通入 2%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  + 93%  $\text{N}_2$  混合气体, 测得小室内氧气浓度在 6 ~ 7 h 内逐渐降至 3% 左右 (Cr-2 测氧仪监测), 小室置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱内。常氧对照细胞置于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内。

### 1.2 培养细胞的分组

依据本实验室建立的细胞培养鉴定方法, 培养 CMC 飞片, 待细胞生长均匀分布后将细胞分成 4 组。(1) 缺氧 + N 组 (H+N) 在培养液中加入 Nifedipine 使终浓度为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (2) 缺氧 + V 组 (H+V): 加入 Verapamil 使终浓度为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (3) 缺氧组 (H): 加入等量 M199; (4) 常氧对照组 (NO): 加入等量 M199。将前 3 组细胞培养皿置缺氧装置中进行缺氧处理。第 4 组置  $\text{CO}_2$  培养箱中常氧培养。缺氧处理 1 h 后, 取各组细胞飞片测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的含量。

### 1.3 激光共聚焦显微镜测定细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度

1.3.1 钙荧光探针的孵育 将培养的 CMC 用 M199 漂洗两次, 在细胞飞片上加 150  $\mu\text{l}$  M199, 加入 Fluo-3/AM 使终浓度为 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  暗室孵育 40 min 后用 M199 冲洗 4 次, 洗去胞外的 Fluo-3/AM。

1.3.2 激光共聚焦显微镜使用参数 试验采用的激

发光波长为 488 nm，发射光波长为 515 nm，物镜为 20×镜头，参数 zoom 为 8.0，图象采集为 512×512 像素。实验采用四维扫描(XYZT)方式，相邻三维(XYZ)扫描的相邻时间间隔为 2 min。采集到的细胞三维立体图象存放于计算机硬盘上。启动 tme-course 程序测定细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光值随时间的即时变化<sup>[3,4]</sup>。

1.3.3 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的测定 将 Fluo-3/AM 孵育后的细胞飞片倒置于有盖玻片架桥的载玻片上，加 200  $\mu\text{l}$  含  $\text{Ca}^{2+}$  液。置 LSCM 下，在荧光镜下找到形态良好的单个细胞，选取细胞内数个测定点，然后用激光扫描使用 time-course 程序测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度时间变化曲线。以平均荧光强度代表  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度。每个处理组测定不少于 50 个细胞。

1.4 数据统计分析

试验测定后的图象处理采用 Cas 4.0 和 Photoshop

7.0 软件。数据分析利用 SPSS 10.0 软件进行单向方差分析。

2 结果与分析

2.1 缺氧引起肉鸡心肌细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著升高 细胞内 Fluo-3 与  $\text{Ca}^{2+}$  络合后，激发的荧光强度能够反映  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。本试验测定缺氧处理的肉鸡 CMC 荧光值为  $129.4\pm24.3$ ，极显著高于常氧组的  $99.3\pm13.1$  ( $P<0.01$ )。

2.2 钙通道拮抗剂能够显著降低缺氧引起心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化

利用钙通道拮抗剂 Verapamil 和 Nifedipine 抑制  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜流动，减少缺氧的影响。缺氧 + V 组荧光值为  $100.9\pm28.2$ ；缺氧 + N 组为  $107.6\pm27.7$ 。与常氧组相近但显著低于缺氧组 ( $P<0.01$ )。

表 不同处理 CMC 内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光值比较

Table Fluorescence intensity of  $\text{Ca}^{2+}$  in CMC in groups

	常氧组(NO)	缺氧组(H)	缺氧 + V 组(H+V)	缺氧 + N 组(H+N)
样本数 Number (n)	63	54	55	51
$\text{Ca}^{2+}$ 荧光值				
Fluorescence intensity of $\text{Ca}^{2+}$	$99.3\pm13.1$	$129.4\pm24.3abc$	$100.9\pm28.2$	$107.6\pm27.7$

a：与常氧组比较  $P<0.01$ ；b:与缺氧 + V 组比较  $P<0.01$ ；c:与缺氧 + N 组比较  $P<0.01$   
NO: Normal oxygen group; H: Hypoxia group; H+V: hypoxia and ver.; H+N:Hypoxia and nif. a: Significantly different from NOP<0.01; b: Significantly different from H+V; c: Significantly different from H+N

3 讨论

有关哺乳动物的钙信号研究表明，在不良刺激或损伤状态下，细胞信号转导系统产生相应的变化将刺激信号通过胞浆向细胞核传递，引起核内 DNA 的转录和表达，做出针对刺激的生理或病理应答<sup>[14]</sup>。在已知的多个信号转导系统中，钙信号是各个信号转导系统的枢纽，构成生物机体信号系统网络。钙超载是细胞损伤和死亡的共同归路。张鑫等在培养的 CMC 中加入 Nif 测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜运转，表明 Nif 对  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜转运具有显著影响<sup>[5]</sup>。本试验结果显示缺氧刺激后 CMC 内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光值从常氧组的  $99.3\pm13.1$  升高到  $129.4\pm24.3$ 。由于  $\text{Ca}^{2+}$  荧光值与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成正比，表明缺氧后细胞  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜转运显著增强，导致胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度发生显著变化。 $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运是钙信号产生的前提， $\text{Ca}^{2+}$  浓度改变是钙信号产生与终止的物质基础，因此本试验结果表明钙信号系统可能参与缺氧对肉鸡 CMC 刺激的过程。

硝苯地平 (nifedipine) 是第一代的双氢吡啶类钙通道拮抗剂。对冠状动脉和外周肺动脉平滑肌的舒张作用非常突出，对处于较正膜电位的肺动脉平滑肌(如高血压、冠心病时)的舒张作用尤为明显。它对血管的作用强于对心脏的作用。硝苯地平增加冠状动脉血流量的作用明显，降压作用强，起效迅速，外周血管阻力降低而心排量增加，心率无明显变化<sup>[15,16]</sup>。维拉帕米 (verapamil) 是苯烷胺类人工合成的罂粟碱衍生物，是最早应用的钙通道拮抗剂，商品名异搏定。维拉帕米可扩张冠状动脉和外周血管，增加冠状动脉流量、降低外周阻力。通过抑制  $\text{Ca}^{2+}$  的内流降低血压，同时阻止甚至逆转心肌肥大和肺动脉平滑肌改建<sup>[17,18]</sup>。本试验结果显示，在 CMC 中缺氧 + N 组和缺氧 + V 组的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光值显著低于缺氧组，而与常氧组差异不显著。表明  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂能够有效阻止在缺氧条件下 CMC 内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高。为利用钙通道拮抗剂控制生产中 AS 的发生发展提供了理论基础。

体外培养细胞虽然与体内环境差异较大，但是原

代和低代次培养的细胞仍然保持其特有的性质,是模拟在体实验的良好材料。利用培养细胞进行的试验结果在一定程度上能够反映机体内的变化。本实验室在前期研究肉鸡低温诱发 AS 过程中,使用硝苯地平 and 维拉帕米干预。结果显示使用硝苯地平 and 维拉帕米组 AS 发生率和肺动脉压均显著低于低温处理组,而且维拉帕米效果比硝苯地平更加显著<sup>[10,11]</sup>。本试验结果表明  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂能够干预缺氧引起 CMC 的  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运,与在体试验结果相似。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化是钙信号产生的物质基础。本试验结果显示缺氧显著影响肉鸡 CMC 内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化,提示钙信号转导可能介导了缺氧诱发 AS 的过程,至于这个过程在肉鸡 AS 发病中所起作用的大小尚待进一步研究。

## 4 结 论

通过本试验,发现缺氧刺激能够增强心肌细胞的游离  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的显著升高,  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂 nifedipine 和 verapamil 能够减弱缺氧引起的心肌细胞膜上  $\text{Ca}^{2+}$  的跨膜转运。为进一步研究缺氧刺激在诱发心肌细胞肥大过程中钙信号转导系统的作用提供了试验基础。

## References

- [1] 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 崔素娟. 细胞信号转导. 北京: 科学出版社(第3版)2001: 91-124.  
Sun D Y, Guo Y L, Ma L G, Cui S J. *Signal Transduction* (3 edition). Beijing: Science Press, 2001: 91-124. (in Chinese)
- [2] Julian R J. Ascites in Poultry. *Avian Pathology*, 1993, 22 : 419-454.
- [3] Gregorz G, Martin P, Roger Y T. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 6: 3440-3450.
- [4] 尚忠林, 王永飞, 钱 洪, 马力耕, 孙大业. 百合花粉细胞中钙离子的荧光测定法. 植物生理学通讯, 2001, 37: 319-322.  
Shang Z L, Wang Y F, Qian H, Ma L G, Sun D Y. The Measurement of calcium fluorescence in lily pollen cells. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37: 319-322. (in Chinese)
- [5] 张 鑫, 杨永健, 周兴文, 朱 峻, 姚建军. 钙通道阻滞剂对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用. 中国病理生理杂志, 2001, 17: 879-881.  
Zhang X, Yang Y J, Zhou X W, Zhu J, Yao J J. Protection of calcium antagonists against cardiomyocyte injury caused by anoxia and reoxygenation. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2001, 17: 879-881. (in Chinese)
- [6] Akhmat B, Evans A M, Kozlowski R Z. Differential effects of hypoxia on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of myocytes Isolated from different regions of the rat pulmonary arterial tree. *Experimental Physiology*, 1998, 83: 337-347.
- [7] Lih C N, Sean M W, Joseph R H. Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of Physiology*, 2005, 563 : 409-419.
- [8] Jian W, Larissa A S, Letitia W, Wenqian W, Dejun S, Sylvester J T. Acute hypoxia increases intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *American Journal of Physiology Lung Cell Mollecnlar Physiology*, 2005, 288: 1059-1069.
- [9] Letitia W, Joshua F, Jian W, Larissa A S, Sylvester J T. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  and nonselective cation channels. *American Journal of Physiology Lung Cell Mollecnlar Physiology*, 2005, 289: 5-13.
- [10] 利 凯, 乔 健, 董世山, 孙茂红, 王建林, 王慧钰, 徐 彤, 张建军, 欧德渊. 维拉帕米对低温诱发腹水综合征病鸡右心功能的影响. 中国兽医科学, 2006, 36: 411-414.  
Li K, Qiao J, Dong S S, Sun M H, Wang H Y, Xu T, Zhang J J, Ou D Y. Effect of verapamil on the right ventricular function of ascetic broilers. *Veterinary Science in China*, 2006, 36: 411-414. (in Chinese)
- [11] 孙茂红, 乔 健, 张建军, 董世山, 杨 鹰, 欧德渊. 硝苯地平对肉鸡肺动脉压和腹水综合征的影响. 中国兽医杂志, 2006, 42(1):53-54.  
Sun M H, Qiao J, Zhang J J, Dong S S, Yang Y, Ou D Y. Effect of Nifedipine on the pulmonary artery pressure of ascetic broilers. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2006, 42(1):53-54. (in Chinese)
- [12] 王 玮, 李 源, 崔致贤, 黄 晨, 张珊红, 张勇翔. 维拉帕米抑制肥厚心肌细胞提取物促心肌细胞生长作用的研究. 第四军医大学学报, 1996, 17(3): 194-196.  
Wang W, Li Y, Cui Z X, Huang C, Zhang S H, Zhang Y X. erapamil's inhibition to the promotive effect of hypertrophic myocardial extracts on the growth of myocardial cells. *Journal of Fourth Milit Medicine University*, 1996, 17(3): 194-196. (in Chinese)
- [13] 董世山, 乔 健, 赵立红, 杨玉成, 孙茂红, 张建军. 鸡心肌细胞培养及免疫组化鉴定. 中国兽医杂志, 2003, 39(3): 14-15.  
Dong S S, Qiao J, Zhao L H, Yang Y C, Sun M H, Zhang J J. Culture and Immunohistochemistry Detection of Chicken's Cardiac Muscle Cells. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(3): 14-15. (in Chinese)
- [14] Michael Berridge. Elementary and global aspects of calcium

- signaling. *Journal of Physiology*, 1997, 449(2): 2912-2918.
- [15] Shen J B, Jiang B, Pappano A J. Comparison of L-type Calcium channel blockade by nifedipine and/or Cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 294:562-570.
- [16] Christophe P, Potreau D. Characterization of nifedipine-resistant calcium current in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *American Journal Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279: H2259-H2268, 2000.
- [17] Merritt J E, Armstrong W P, Benham C D, Hallam T J, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh B K, McCarthy S A, Moores K E, Rink T J. A novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochemical Journal*, 1990, 271: 515-522.
- [18] Abernethy D R, Schwartz J B, Tool E L, Luchi R, Snow E. Verapamil pharmacodynamics and disposition in young and elderly hypertensive patients. *Annals of Internal Medicine*, 1986, 105: 329-336.
- (责任编辑 林鉴非)