

# 肉鸡腹水综合征患鸡右心组织钙沉积和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性变化

利 凯<sup>1,2</sup>, 马利芹<sup>1</sup>, 董世山<sup>2</sup>, 徐 彤<sup>1,2</sup>, 田 勇<sup>2</sup>, 王建琳<sup>2</sup>, 王慧钰<sup>2</sup>, 欧德渊<sup>2</sup>, 乔 健<sup>2\*</sup>

(1. 河北北方学院动物科技学院, 张家口 075131; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘 要:** 右心肥大衰竭是腹水综合征患鸡发病的重要环节之一, 而心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在调节心脏收缩和舒张功能及其生长方面都起着重要作用。本试验应用右心导管法测定 AS 患鸡右心压力变化情况, 采用焦锆酸钾沉淀法、电镜酶细胞化学法研究 AS 患鸡右心组织  $\text{Ca}^{2+}$  和钙泵 ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) 活性变化及其精确定位。结果显示 AS 组肉鸡右心室舒张压极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 同时, 右心室内压最大变化速率也极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 对照组肉鸡右心组织偶见少量散在的  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀颗粒, 低温诱发 AS 患鸡右心组织发生了明显的钙沉积; 对照组肉鸡的右心组织  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 以高电子密度颗粒分布于肌浆网、线粒体膜等处, AS 患鸡心脏组织的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的电子密度颗粒显著减少或缺失。本研究揭示, 在低温条件下 AS 患鸡具有明显的右心舒张功能障碍,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 功能抑制可能在其中起着重要作用。

**关键词:** 肉鸡; 腹水综合征; 右心组织;  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; 焦锆酸钾沉淀法; 电镜酶细胞化学法

中图分类号: S858.316.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)06-0595-06

## The Change of $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of Right Ventricular Myocardium in Ascites Syndrome of Broiler Chickens

LI Kai<sup>1,2</sup>, MA Li-qin<sup>1</sup>, DONG Shi-shan<sup>2</sup>, XU Tong<sup>1,2</sup>, TIAN Yong<sup>2</sup>, WANG Jian-lin<sup>2</sup>,  
WANG Hui-yu<sup>2</sup>, OU De-yuan<sup>2</sup>, QIAO Jian<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei North University,

Zhangjiakou 075131, China; 2. College of Veterinary Medicine,

China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Right ventricular hypertrophy and failure is an important step in the development of ascites syndrome. Cytoplasmic calcium concentration is a major regulator of cardiac contractile function and various physiological processes in cardiac muscle cells. The purpose of this study was to measure the right ventricular pressure and investigate the precise ultrastructural location of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the right ventricular myocardium of chickens with ascites syndrome induced by low ambient temperature. The results showed that the right ventricular diastolic pressure (RVDP) of ascitic broilers was significantly higher than that of control broilers ( $P < 0.01$ ), and the maximum change ratio of right intraventricular pressure (RV dp/dt<sub>max</sub>) of ascitic broilers was significantly lower than that of the controls ( $P < 0.01$ ). Extensively increased calcium deposits were observed in the right ventricular myocardium of ascitic broilers, whereas in the age-matched control broilers, calcium deposits were much less. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase reactive grains were obviously found on the sarcoplasmic reticulum and mitochondrial membrane of the control right ventricular myocardium, but rarely observed in the ascitic broilers. The data suggested that in ascitic

收稿日期: 2006-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371063)

作者简介: 利 凯 (1969-), 河北赤城人, 博士, 主要从事禽类心血管系统病理生理研究, E-mail: likai@vet@163.com

\* 通讯作者: 乔 健, 教授, 博士生导师, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

broilers there was the right ventricular diastolic dysfunction, in which the overload of intracellular calcium and inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase might be the important factors.

**Key words:** broiler; ascites syndrome; right ventricular myocardium;  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; the potassium pyroantimonate cytochemical method; the electron microscopic enzyme histochemistry method

肉鸡腹水综合征(Ascites syndrome, AS)常发于肉仔鸡,以右心肥大、扩张、衰竭、肺脏瘀血水肿、肝脏肿大及明显腹水为特征。其中,右心肥大衰竭是AS形成和发展的中心环节之一。右心肥大衰竭是AS各种诱发因素作用于机体的结果。研究表明,细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化在心肌细胞信号传导和生长过程中起着重要作用,胞浆内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化受细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 循环和细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 循环两个相互依存系统的双重调控, $\text{Ca}^{2+}$ 通过不同的通道进入心肌细胞可以启动和调控细胞的生长、心脏正常收缩和舒张等多种生理功能<sup>[1]</sup>。

心肌细胞钙稳态的维持主要是通过钠钙交换和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase进行的, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase广泛存在于各种动物的细胞膜和肌浆网上,其活性与心功能密切相关<sup>[2]</sup>,目前关于AS患鸡心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性的超微观察还未见报道,本文应用焦锑酸钾沉淀法和电镜酶细胞化学法研究低温诱发AS患鸡心肌 $\text{Ca}^{2+}$ 以及 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性变化和精确定位,初步探讨 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase在AS患鸡右心肥大衰竭中的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物的分组和处理

北京华都肉鸡公司1日龄AA商品代肉公雏200只,常规育雏免疫,15日龄时随机平均分成两组,(1)对照组:在常温(22~23℃)条件下继续饲养;(2)AS组:由常温(22~23℃)条件转为恒定低温(9~11℃)条件下饲养;两组其它饲养条件相同,自由采食和饮水。定期检查AS患鸡,发现精神不振、皮肤黏膜发绀、腹部膨大、腹部穿刺能抽取10 mL以上黄色液体,腹水心脏指数(Ascites heart index, AHI)大于0.29者为AS阳性鸡。取AS患鸡和同日龄对照组肉鸡。

### 1.2 右心室压、右心内压最大变化速率及腹水心脏指数(AHI)的测定

将鸡仰卧保定,用50 mL/L盐酸普鲁卡因在右侧颈中部做皮下浸润麻醉。切开皮肤,分离出右侧

颈静脉1 cm左右,结扎远心端,在近心端剪口,将0.9 mm外径聚乙烯塑料软管(由中国医学科学院基础所生理室提供)沿向心方向缓缓插入,经前腔静脉、右心房到达右心室。将压力信号由压力传感器传输给多导生理信号记录分析系统(美国BIOPAC MP150型)显示压力波形,并记录压力值。测定中用38 g/L枸橼酸钠冲洗。将鸡剖杀,取出心脏,剪去心房、附着的脂肪组织,并清除心腔内血凝块,称取全心室质量,然后沿前后纵沟剪下右心室,称重,最后计算AHI<sup>[3]</sup>。

### 1.3 心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 定位

通过颈部脱臼使肉鸡安乐死后,快速取出心脏,用锋利手术刀自右心室尖部切取1 mm×1 mm×5 mm大小的组织立即放入焦锑酸钾-锇酸固定液中固定4 h以上。固定样品充分漂洗后经50%、70%、80%、90%、100%乙醇及100%丙酮系列脱水各15 min,816树脂浸透、包埋、聚合。LKB8800型超薄切片机切片,醋酸铀染色,在日立H7500透射电镜下观察,加速电压为80 kV。观察心肌组织内 $\text{Ca}^{2+}$ 沉淀颗粒的数量和沉淀部位,拍摄超微照片<sup>[4]</sup>。

### 1.4 心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase定位以及肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase半定量分析

自上述各组右心室取1 mm×1 mm×5 mm大小的组织块固定于0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液(pH7.4,含8%蔗糖配制的2%多聚甲醛和0.25%戊二醛组成的混合固定液,固定30 min,再用0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液漂洗3次,每次15 min,振动切片机切成40 μm的切片,同上缓冲液漂洗后,为除去切片组织中残存的螯合钙,在漂洗液中加入10 mmol EGTA,将切片于室温预孵育10 min后再用缓冲液漂洗净。将切片置于 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶孵育液中,恒温振荡水浴箱中37℃振荡孵育1 h,孵育液采用Ando的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶细胞化学方法<sup>[5]</sup>,其配方:250 mmol/L甘氨酸-KOH缓冲液(pH9.0),3 mmol  $\text{Na}_2\text{ATP}$ ,10 mmol氯化钙,4 mmol/L枸橼酸铅,2.5 mmol/L左旋咪唑,5%蔗糖。阴性对照采用对照组在去底物 $\text{Na}_2\text{ATP}$ 和 $\text{CaCl}_2$ 的孵育液中

进行孵育。反应后,再经同上缓冲液漂洗后,1%四氧化锇后固定 30 min,双蒸水漂洗,梯度乙醇脱水,丙酮置换,Epon812 树脂浸透包埋,聚合器中递增温度聚合。超薄切片机切片,醋酸双氧铀轻染,日立 H7500 透射电镜 80 kV 下观察并照相。该方法主要是由于  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 可水解 ATP 产生磷酸盐,形成磷酸铅电子沉淀物,沉淀物的形成与酶接近,因此,可用于禽类心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的定位研究<sup>[5,6]</sup>。

在两组放大倍数相同的不同视野的显微照片上进行心肌细胞肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的半定量分析。用 Image-Pro Plus 图像分析软件随机测定肌浆网膜的长度(A)以及该长度上  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 细胞化学反应产物的总面积(B)。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性以 B/A 表示<sup>[7]</sup>。

### 1.5 数据处理和重复试验

表 1 对照组和 AS 组肉鸡右心室压、右心室内压最大变化速率和 AHI 的变化

Table 1 Right ventricular pressure, right ventricular pressure(  $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  ) and AHI in the control and AS group

指标 Parameters	对照组 Control group	AS 组 Ascites group
右心室收缩压 RVSP/ (kPa)	4.64 $\pm$ 0.26	6.10 $\pm$ 0.55 *
右心室舒张压 RVD/ (kPa)	0.53 $\pm$ 0.14	1.42 $\pm$ 0.27 **
+ dp/ dt <sub>max</sub> / (Pa/ s)	103.74 $\pm$ 12.19	28.30 $\pm$ 12.31 **
- dp/ dt <sub>max</sub> / (Pa/ s)	130.34 $\pm$ 21.20	29.96 $\pm$ 5.70 **
腹水心脏指数 AHI/ %	21.20 $\pm$ 1.09	39.97 $\pm$ 6.25 **

与同日龄对照组比较,\*.  $P < 0.05$ , \*.  $P < 0.01$ ;  $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ . 右心内压最大变化速率

Compared with that of the control group at the same time, \*.  $P < 0.05$ , \*.  $P < 0.01$ ; RVSP. Right ventricular systolic pressure; RVD. Right ventricular diastolic pressure;  $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ . Maximum rate of the pressure increase [ + dp/ dt<sub>max</sub> ] and decrease [ - dp/ dt<sub>max</sub> ]

### 2.2 心肌细胞游离 $\text{Ca}^{2+}$ 的定位结果

在电子显微镜下观察,可见心肌组织细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀呈细小颗粒状,颗粒边缘比较整齐,散在或成簇分布。 $\text{Ca}^{2+}$  颗粒主要沉积在肌浆网、胞浆、线粒体、间质和肌节处,血管周围也有分布。对照组肉鸡右心组织胞浆内偶见少量散在的  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀小颗粒,AS 患鸡心肌组织的  $\text{Ca}^{2+}$  颗粒沉积量比正常肉鸡的  $\text{Ca}^{2+}$  颗粒含量显著增加,颗粒成簇分布(见图 1)。

### 2.3 心肌细胞钙泵电镜细胞化学定位及肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 半定量分析结果

钙泵电镜酶细胞化学显示,对照组肉鸡心肌细胞酶反应产物主要以高电子密度的黑色磷酸铅沉淀

试验结果以均数  $\pm$  标准误 (MEAN  $\pm$  SD) 表示,用 SPASS 软件的 ONEWAY-ANVONA 方法分析组间差异显著性。为保证电镜试验结果的可靠性,本试验各组分别取 3 个样品,并且试验期间进行了大量的电镜观察最终得出结果。

## 2 结 果

### 2.1 右心室压、右心内压最大变化速率和 AHI 的变化

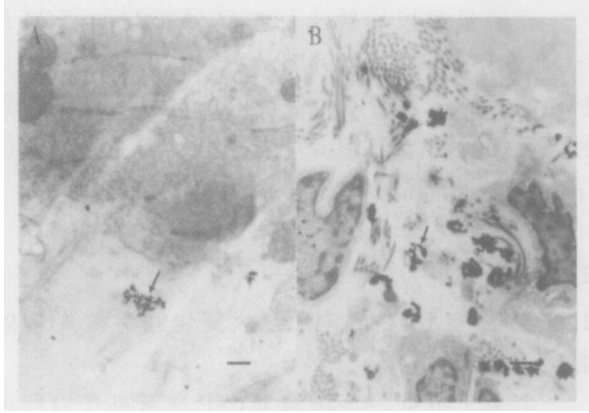
由表 1 可见,AS 患鸡 RVSP 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), RVD 极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); AS 患鸡的  $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ );同时,AS 患鸡的 AHI 也极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

颗粒分布于肌浆网上,其次也分布于线粒体膜上,阳性反应强;低温 AS 患鸡心脏组织的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反应产物显著减少或缺失,阳性反应弱(见图 2)。肌浆网膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶半定量分析可见腹水鸡  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶活性 (26.26  $\pm$  4.20) 极显著低于对照组鸡相应的酶活性 (88.57  $\pm$  3.76) ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨 论

### 3.1 低温诱发肉鸡腹水综合征患鸡右心功能的变化

右心肥大和衰竭是肉鸡 AS 发生和发展的重要环节。Olkowski 等研究证明在肉鸡 AS 的发生和发展过程中右心的功能和结构出现代偿、失代偿直



A. 对照组肉鸡心肌胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  沉积呈少量分布; B. AS 患鸡心肌胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  沉积颗粒明显增加

A. A few calcium deposits (black arrows) were seen in the cytoplasm of control broilers; B. Numerous calcium deposits (black arrows) could be observed in the cytoplasm of the ascitic broilers

图 1 透射电镜显示肉鸡右心室心肌细胞钙沉积的分布. 醋酸铀染色 (Bar = 800 nm)

Fig. 1 Transmission electron micrographs showed the distribution of calcium deposits in the right ventricular myocardium of broilers. Uranyl acetate stained (Bar = 800 nm)

至右心衰竭,从而使心脏输出功能减弱<sup>[8]</sup>。临床上可见患鸡出现明显的右心功能衰竭症状,患鸡被毛蓬松,呼吸困难,严重皮肤发绀,腹腔出现腹水。病理解剖可见右心室严重扩张,心室壁肌肉变薄松软,并且心瓣膜出现病理性变化。

心功能衰竭是由多种因素造成的,其中可表现为舒张性和收缩性的心脏衰竭,而舒张不全是引起心功能衰竭和死亡的主要因素,约 40 % 以上的心功能衰竭病人患有舒张不全<sup>[9]</sup>。目前,对舒张不全的诊断标准还存有争议,但是,心脏导管法可直接测定心脏的舒张压,是判定心肌舒张和充盈程度的最好方法<sup>[10]</sup>。本试验 AS 患鸡右心室舒张压显著高于对照组,表明右心机能出现障碍(如右心舒张硬度增加),另外,AS 组患鸡  $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  极显著低于同期对照组,表明右心室舒张速率也出现下降,上述结果表明 AS 患鸡患有严重的右心舒张功能不全。

右心肥大是导致右心舒张功能不全的重要因素,可使右心室的顺应性降低,僵硬性升高,最终导致右心灌注减少,舒张压升高<sup>[11]</sup>。AHI 是准确反映右心肥大程度的常用参数。大量研究表明,AS 患鸡的 AHI 显著升高。Julian 等认为 AHI 在 0.25 ~ 0.29 为中度右心肥大,当其超过 0.29 后则为严重

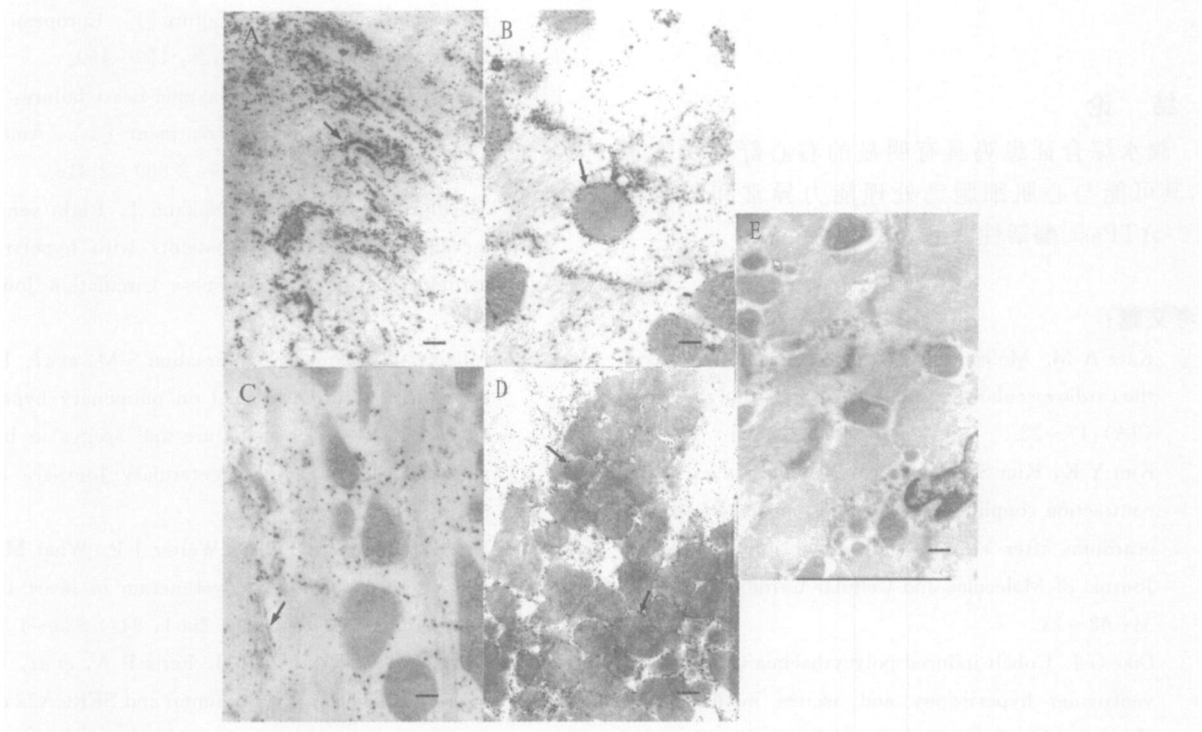
右心肥大<sup>[12]</sup>。本试验显示,AS 组肉鸡 AHI 极显著高于对照组,右心室发生严重肥大。

### 3.2 低温诱发肉鸡腹水综合征患鸡心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化情况

舒张功能不全的特征是舒张期明显延长。其根本机制可能与心肌细胞胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  进入肌浆网的速率下降,舒张期胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高有关<sup>[13]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  是心肌细胞内最重要的信号分子之一,生理状态下是介导心肌细胞兴奋收缩偶联、能量代谢和生长的关键因素。所以,胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  的准确调控对维持心肌功能有着重要意义。本试验采用焦锑酸钾沉淀法定位心肌细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$ ,其原理是用  $\text{Ca}^{2+}$  取代  $\text{K}^{+}$ ,形成在透射电镜下可见的焦锑酸钙电子密度沉淀物,是超微检测  $\text{Ca}^{2+}$  在组织中分布广泛采用的组织化学方法。焦锑酸钾对游离  $\text{Ca}^{2+}$  有非常高的亲和力,几乎 100 % 与  $\text{Ca}^{2+}$  反应发生原位沉淀,发生沉淀的最小  $\text{Ca}^{2+}$  浓度是  $10^{-6}$  mol/L。由于锇酸对组织的浸透快,可以使得焦锑酸钾的穿透率能与锇酸保持一致,在细胞内与钙发生沉淀反应,实现原位定位,在电镜下呈现可见的高密度颗粒,因此该方法可显示组织中  $\text{Ca}^{2+}$  的分布、转移特点。在本试验中可见 AS 患鸡心肌细胞胞浆内有明显的高密度颗粒状的钙沉积,颗粒成簇分布,内质网未见明显的钙沉积,而对照组肉鸡心肌细胞胞浆内可见少量散在的  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀小颗粒。Jennifer 等和 Schmidt 等对患有舒张功能不全的人类和其它动物的研究表明其心肌细胞的钙瞬时延长,舒张期  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加<sup>[14,15]</sup>。所以,本研究可能在一定程度上反映了 AS 患鸡心肌细胞出现  $\text{Ca}^{2+}$  超载,其可能是导致右心舒张功能不全的重要原因之一。

### 3.3 低温诱发肉鸡腹水综合征患鸡心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的变化情况

心肌细胞胞浆内钙稳态的维持主要是通过质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 逆浓度梯度和肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的重吸收将  $\text{Ca}^{2+}$  清除出胞浆的,这两种清除途径均是耗能的主动转运过程。这些  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 保证了胞浆内的  $\text{Ca}^{2+}$  维持在低浓度和钙信号正常传递。在心肌细胞中,肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 在调控胞浆钙离子浓度中起着重要作用,肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 是跨膜蛋白,是肌浆网的主要成分,占其蛋白总量的 90 % 左右,属于高度保守蛋白。分子克隆分析已经识别出肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 有 3 个高度同源的编



对照组肉鸡心肌肌浆网和线粒体膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反应产物呈现电子密度增强,反应颗粒分布广泛(A,B);AS 组肉鸡心肌肌浆网和线粒体膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反应产物呈现电子密度减弱,反应颗粒分布减少(C,D);对照组:组织孵育在含 10 mmol/L EGTA 无钙离子的孵育液中显示无  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶磷酸铅反应产物生成(E)

Electron cytochemical reaction products of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity were heavily deposited on the SR (black arrow) and mitochondrial membrane (black arrow) in the right ventricular myocardium of the age-match normal broilers (A, B); The electron density and reactive products of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity decreased on the SR (black arrow) and mitochondrial membrane (black arrow) in the right ventricular myocardium of the ascitic birds (C, D); Control group: there was no lead phosphate precipitation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase when tissues were incubated in a calcium-free medium with 10 mmol/L EGTA (E)

图 2 肉鸡右室肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的超微显示醋酸铀染色(Bar = 500 nm)

Fig. 2 Ultrastructural expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in the right ventricle of broilers(Bar = 500 nm)

码基因(*SERCA1*、*SERCA2* 和 *SERCA3*),*SERCA2a* 则是心肌肌浆网主要的表达钙泵,是调节心肌收缩和舒张的主要酶<sup>[16]</sup>。研究表明鸡与哺乳动物的 *SERCA2a* 有 94 % 的同源性<sup>[17]</sup>。

*SERCA2a* 活性的高低在决定心脏舒张和收缩速度中起重要作用。大量研究表明心肌肥大和心衰后期都伴有 *SERCA2a* 含量下降以及钙处理能力的异常。Muthu 等利用动物模型研究发现在压力负荷过重导致的心脏肥大和心衰过程中肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 表达显著下降,这在人类原发性肺动脉高压也多次得到证实。在用水母发光蛋白和 Fura-2 测定细胞内钙离子的方法检测心脏衰竭样品时发现,钙离子释放和摄取的瞬变值明显延长。在心脏衰竭末期肌浆网钙泵的 mRNA 和蛋白表达均下降<sup>[16]</sup>。Shorofsky 等也发现肌浆网酶活性的降低与

心脏肥大导致的舒张功能障碍密切相关<sup>[18]</sup>。上述研究表明肌浆网钙泵在维持心脏功能方面起着重要作用。为了准确观察心肌细胞钙超载和肌浆网钙转运之间的关系,本研究应用酶细胞化学方法原位表达  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,并对其进行了半定量分析。发现酶主要分布在肌浆网膜、线粒体膜等处。对照组肉鸡心肌细胞酶反应产物呈高电子密度的黑色磷酸铅沉淀颗粒,阳性反应强;腹水综合征肉鸡心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反应颗粒分布明显减少或缺失。肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 半定量分析结果表明 AS 组肉鸡心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性极显著低于对照组肉鸡( $P < 0.01$ ),表明 AS 患鸡  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶活性显著减弱,其可能是导致心肌细胞出现钙超载,从而使心肌细胞产生舒张障碍的主要原因。上述结果对今后 AS 的预防和人类比较医学提供了一定的思

路。

#### 4 结 论

腹水综合征患鸡具有明显的右心舒张功能不全,其可能与心肌细胞钙处理能力异常和肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 酶活性降低有关。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Katz A M. Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system [J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80 (9A): 17 ~ 22.
- [ 2 ] Kim Y K, Kim S J, Kramer C M. Altered excitation contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2002, 34: 63 ~ 73.
- [ 3 ] Diaz G J. Cobalt induced polycythaemia causing right ventricular hypertrophy and ascites in meat type chickens [J]. *Avian Pathology*, 1994, 23: 91 ~ 104.
- [ 4 ] Probst W. Ultrastructural localization of calcium in the CNS of vertebrates [J]. *Histochemistry*, 1986, 85: 231 ~ 239.
- [ 5 ] Ando T, Fujimoto K, Mayahura H, *et al.* A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 1981, 14: 705 ~ 715.
- [ 6 ] James L Y C, Andrew N S. Localisation of intracellular calcium stores in the striated muscles of the jellyfish *Polyorchis penicillatus*: possible involvement in excitation contraction coupling [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204: 3 727 ~ 3 736.
- [ 7 ] Hiroaki Y, Masaya O, Kazunori Mariko O, *et al.* Endothelin-1 suppresses plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, concomitant with contraction of hepatic sinusoidal endothelial fenestrae [J]. *Medical Electron Microscopy*, 2001, 34: 115 ~ 122.
- [ 8 ] Olkowski A A, Classen H L. Echocardiographic evaluation of heart function in normal chickens and chickens with heart failure and ascites [J]. *Poultry Science*, 1999, 78: 250.
- [ 9 ] Van Kraaij D J, Van Pol P E, Ruiters A W, *et al.* Diagnosing diastolic heart failure [J]. *European Journal of Heart Failure*, 2002, 4: 419 ~ 430.
- [ 10 ] Cecilia G, Daniel G B. Diastolic heart failure: challenges of diagnosis and treatment [J]. *American Family Physician*, 2004, 69: 2 609 ~ 2 616.
- [ 11 ] Maeda M, Yamakado T, Nakano T. Right ventricular diastolic function in patients with hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Japanese Circulation Journal*, 1999, 63: 681 ~ 687.
- [ 12 ] Julian R J, Caston L J, Mirsalimi S M, *et al.* Effect of poultry by-product meal on pulmonary hypertension, right ventricular failure and ascites in broiler chickens [J]. *Canadian Veterinary Journal*, 1992, 33: 382 ~ 385.
- [ 13 ] David A K, Jean G F B, Walter J P. What Mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure [J]? *Circulation Research*, 2004, 94: 1 533 ~ 1 542.
- [ 14 ] Jennifer C H, Andrea R B, Faris P A, *et al.* Comparative analysis of parvalbumin and SERCA2a cardiac myocyte gene transfer in a large animal model of diastolic dysfunction [J]. *American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology*, 2004, 286: 2 314 ~ 2 321.
- [ 15 ] Schmidt U, del Monte F, Miyamoto M I, *et al.* Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [J]. *Circulation*, 2000, 101: 790 ~ 796.
- [ 16 ] Muthu P, Sabine H. SERCA pump level is a critical determinant of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cardiac contractility [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2001, 33: 1 053 ~ 1 063.
- [ 17 ] Campbell A M, Kessler P D, Sagara Y, *et al.* Nucleotide sequences of avian cardiac and brain SR/ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and functional comparisons with fast twitch  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: Calcium affinities and inhibitor effects [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 16 050 ~ 16 055.
- [ 18 ] Shorofsky S R, Aggarwal R, Corretti M, *et al.* Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks [J]. *Circulation Research*, 1999, 84: 424 ~ 434.