

腹水综合征对肉鸡肝脏、心肌和肠黏膜线粒体抗氧化能力的影响

臧莹安^{1,2}, 丁发源², 向瑞平³, 唐兆新³, 王小龙^{1*} (1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095;
2. 广东省农业科学院 畜牧研究所, 广东 广州 510640; 3. 华南农业大学, 广东 广州 510642)

摘要: 采取分组对比的方法(对照组、肉鸡腹水征发病组、治疗组)分别检测肝组织、肠黏膜、心肌线粒体中的MDA含量、SOD、GSH-PX的活性。结果显示, 发生腹水综合征的肉鸡, 其肝脏、心肌和肠黏膜线粒体MDA活力呈现先显著降低(1、2周时)、后显著提高(3、4、5周时)的变化趋势($P < 0.05$)而与发病组线粒体MDA活力先降后升的动态变化趋势相反, 治疗组线粒体MDA的活力则呈现先升后降的趋势, 最终显著阻止了自由基的产生。线粒体SOD和GSH-PX活力的变化趋势则与MDA相反。提示: 肉鸡腹水综合征显著诱导了肉鸡组织细胞和线粒体的脂质过氧化作用, 显著降低了肉鸡组织细胞和线粒体的抗氧化能力; 药物能有效地改善这一过程。

关键词: 肉鸡; 腹水综合征; 线粒体; 自由基; MDA; SOD; GSH-Px

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-4545(2007)04-0558-04

The influence on the antioxidative capacity of mitochondria in liver and heart in broiler chickens with pulmonary hypertension

ZANG Ying-an^{1,2}, DING Fa-yuan², XIANG Rui-ping³, TANG Zhao-xin³, WANG Xiao-long^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract A total of 120 broilers were divided randomly into three groups that were respectively treated as healthy group, the pulmonary hypertension syndrome (PHS) group and the vitamin treatment group. The liver, heart and mucous membrane of intestine, were taken from 6 killed birds per group, the mitochondria were determined for the evaluations of the concentrations of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX). The results indicated that the MDA level in PHS group decreased significantly in the first 2 weeks ($P < 0.05$), and increased significantly during the following 3 weeks ($P < 0.05$), and the activities of T-SOD and GSH-PX is opposite. After the treatment of Vitamin C, all these guideline is changed following opposite way. It might be concluded that the pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broiler chickens induced markedly the lipid peroxidation of mitochondria and cells, and increased clearly the free radicals, and reduced significantly the antioxidative capacity; the Vitamin C significantly stopped lipid peroxidation induced by PHS, and eliminated markedly productions of a lot of free radicals, and increased significantly the antioxidative capacity.

Key words: broilers; PHS; mitochondria; free radical; MDA; SOD; GSH-Px

* Corresponding author

肉鸡肺动脉高压综合征(pulmonary hypertension syndrome, PHS)是一个复杂的综合征, 发病率为4.2%, 每年全世界约有70亿肉鸡遭受此病的侵害, 经济损失可达10亿美元。从1986年起我国十几个省市也陆续报道了本病, 其死亡率为1%~30%

不等, 损失惨重^[1-2]。因此引起了国内外学者对该病的广泛关注。前人对自由基在肉鸡腹水综合征的发生、发展过程中的作用及其对自由基的清除已作了大量的研究工作^[2-3], 但腹水综合征肉鸡线粒体内自由基的产生机制如何? 线粒体功能有何改变? 还不十分清楚。阐明其深层次的发病机制, 寻找有效的防治方法具有重要的现实意义。

收稿日期: 2005-09-30

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2003033411)

作者简介: 臧莹安(1971-), 女, 副研究员, 博士。

* 通讯作者

1 材料与方法

1.1 试验动物 1 日龄黄羽肉鸡 120 只, 随机分为 A、B、C 3 组, 每组各 40 羽, 其中 A 组为对照组, B 组为发病组, C 组为治疗组。A、B、C 3 组参试鸡 14 日龄前常规饲养, 14 日龄后 A 组鸡仍常规饲养, 而 B、C 2 组鸡舍温按每日 1~2℃ 由 25℃ 逐步降至 12℃, 同时日粮中按 1.5 mg/kg 的剂量添加 T₃ (Sigma 公司提供) 以诱发肉鸡腹水。另外, 自 14 日龄起, C 组在日粮中按 500 mg/kg 的量添加维生素 C 进行防治, 至试验结束。并于 3、4、5、6、7 周龄时分别从每组肉鸡中随机抽取 6 羽进行心、肝、肠黏膜等组织样品的采集, 以测定各项指标。

1.2 仪器 SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器, 液氮生物容器, 鼓风电热恒温干燥箱, DY89-Ⅰ型电动玻璃匀浆机, BL-206-Ⅱ型低温冷冻离心机, 微型旋涡混合器, 定时恒温磁力搅拌器, 精密 pH 计, 超低温冰箱等。

1.3 样品的采集和处理 肝组织的采取与保存: 采血后, 随即用苯巴比妥钠 (剂量为 2 mL/只) 翅静脉注射麻醉。2~3 min 后, 剖腹取肝脏, 剥离外层被膜, 挤压, 用吸水纸吸除挤出的血液, 随即将肝脏放入液氮中保存。与此同时, 再分别取一定量的心脏, 十二指肠黏膜, 放入样品袋中, 写明样品名称及鸡只编号后, 立刻投入液氮中迅速冷冻; 每日采样结束后将液氮中保存的肝脏样本取出, 置于 -80℃ 的超低温冰箱中保存备用。

取一部分肝脏 (约 15 g/只) 和十二指肠黏膜用于提取线粒体, 按规定的流程快速提取线粒体后, 分装并立刻投入液氮, 之后于当天将样品分批及时的

放入 -80℃ 的低温冰箱冷冻保存备用。

1.4 丙二醛MDA 含量的测定 过氧化脂质降解产物中的丙二醛, 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合, 形成红色产物。此红色物质在 532 nm 波长处有极大吸收峰, 可用分光光度法进行定量测定。

1.5 SOD 活力的测定 采用黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤底物产生 O₂^{·-}, 利用产生的 O₂^{·-} 将 NBT 还原为显色物质, 能通过进行比色测定得知 SOD 对 NBT 还原的抑制, 并根据抑制计算样品 SOD 的活力。

1.6 GSH-Px 活力的测定 谷胱甘肽催化以还原型谷胱甘肽 (GSH) 为还原剂的过氧化物还原反应, 而 GSH 可与 5, 5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸 (DTNB) 反应生成黄色的 5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子, 测得该离子的浓度即可计算出 GSH 减少量, 并求得 GPx 活力。

1.7 数据处理 应用 SAS 统计分析软件计算各组不同时间平均值和标准误, 通过 Duncan's 新复极差检验法 (DMRT 法) 比较各组间的差异。差异显著性以 P < 0.05 表示。

2 结果

2.1 肝脏、心肌和肠黏膜MDA 的含量 见表 1。从表 1 可以看出, 在整个试验期内, 对于发生腹水综合征的肉鸡, 其肝脏、心肌和肠黏膜线粒体 MDA 活力呈现先显著降低 (1、2 周时)、后显著提高 (3、4、5 周时) 的变化趋势 (P < 0.05), 而与发病组线粒体 MDA 活力先降后升的动态变化趋势相反, 治疗组线粒体 MDA 的活力则呈现先升后降的趋势, 最终显著阻止了自由基的产生。

表 1 各组肉鸡线粒体MDA 的活力的变化

μmol/g

组织	组别	处 理 后				
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
肝 脏	对照组	3.02 ± 0.45 ^a	3.67 ± 0.15 ^a	4.54 ± 0.28 ^b	5.64 ± 0.21 ^b	6.21 ± 0.32 ^b
	发病组	1.96 ± 0.25 ^b	2.25 ± 0.20 ^b	5.86 ± 0.36 ^a	7.34 ± 0.15 ^a	7.96 ± 0.46 ^a
	治疗组	2.24 ± 0.30 ^b	3.27 ± 0.18 ^a	4.87 ± 0.12 ^b	6.06 ± 0.33 ^c	6.05 ± 0.29 ^b
心 肌	对照组	3.38 ± 0.11 ^a	3.72 ± 0.23 ^a	4.31 ± 0.32 ^c	5.03 ± 0.30 ^b	6.79 ± 0.27 ^b
	发病组	2.24 ± 0.17 ^b	2.98 ± 0.20 ^b	5.67 ± 0.36 ^a	6.92 ± 0.28 ^a	8.76 ± 0.34 ^a
	治疗组	2.62 ± 0.14 ^b	3.27 ± 0.22 ^b	4.95 ± 0.29 ^b	5.45 ± 0.24 ^c	6.45 ± 0.30 ^b
肠 黏 膜	对照组	0.38 ± 0.02 ^a	0.49 ± 0.01 ^a	0.56 ± 0.03 ^c	0.79 ± 0.01 ^b	0.90 ± 0.023 ^b
	发病组	0.27 ± 0.02 ^b	0.36 ± 0.02 ^b	0.78 ± 0.02 ^a	1.04 ± 0.05 ^a	1.27 ± 0.05 ^a
	治疗组	0.30 ± 0.04 ^b	0.52 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.01 ^b	0.72 ± 0.01 ^b	0.96 ± 0.02 ^b

注: 表中同一列数据带有不同右上标字母者表示数据间差异显著 (P < 0.05)。下同

2.2 肝脏、心肌和肠黏膜T-SOD 的活力 见表 2。

从表 2 可以看出, 整个试验期内, 对于发生腹水综合

征的肉鸡, 其肝脏、心肌和肠黏膜线粒体 T-SOD 活力先显著提高(1、2 周时)、后显著降低(3、4、5 周时)的变化趋势 ($P < 0.05$), 而经治疗后, 则呈相反

的变化, 肝脏、心肌和肠黏膜线粒体 T-SOD 活力均先降低或显著降低(1、2 周时)、后升高或显著升高(3、4、5 周时), 且最终恢复至对照组水平。

表 2 各组肉鸡线粒体 T-SOD 的活力的变化 U/mg

组织	组别	处 理 后				
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
肝 脏	对照组	135.72 ± 8.97 ^b	114.61 ± 5.58 ^c	103.66 ± 7.42 ^c	90.29 ± 6.04 ^b	81.56 ± 4.99 ^a
	发病组	152.21 ± 9.27 ^a	141.78 ± 7.98 ^a	92.38 ± 6.54 ^b	79.46 ± 5.22 ^b	67.45 ± 3.29 ^b
	治疗组	148.34 ± 8.79 ^a	131.35 ± 4.38 ^b	115.67 ± 4.59 ^a	93.21 ± 2.75 ^a	84.43 ± 1.94 ^a
心 肌	对照组	147.22 ± 9.03 ^c	130.87 ± 10.31 ^c	112.94 ± 7.19 ^a	103.66 ± 6.56 ^a	93.27 ± 7.54 ^a
	发病组	158.34 ± 12.35 ^a	146.47 ± 6.78 ^a	90.83 ± 2.35 ^c	77.46 ± 3.16 ^b	66.97 ± 1.16 ^b
	治疗组	153.65 ± 4.74 ^a	138.93 ± 4.22 ^b	100.39 ± 3.21 ^b	100.56 ± 3.26 ^a	91.58 ± 3.92 ^a
肠 黏 膜	对照组	114.32 ± 2.23 ^c	102.58 ± 4.13 ^b	92.82 ± 6.29 ^b	87.65 ± 1.22 ^a	80.37 ± 2.99 ^a
	发病组	129.28 ± 5.74 ^a	118.67 ± 9.43 ^a	84.59 ± 4.48 ^c	70.57 ± 3.85 ^b	62.16 ± 4.50 ^b
	治疗组	120.73 ± 5.64 ^b	112.28 ± 6.11 ^a	101.94 ± 7.29 ^a	93.75 ± 2.86 ^a	84.63 ± 2.79 ^a

2.3 肝脏、心肌和肠黏膜 GSH-Px 的活性 见表 3。从表 3 可以看出, 整个试验期内, 对于发生腹水综合征的肉鸡, 其肝脏、心肌和肠黏膜线粒体 GSH-Px 活力呈现先显著提高(1、2 周时)、后显著降低(3、4、5

周时)的变化趋势 ($P < 0.05$), 而经治疗后, 则呈相反的变化, 肝脏、心肌和肠黏膜线粒体 GSH-Px 活力均先降低或显著降低(1、2 周时)、后升高或显著升高(3、4、5 周时), 且最终恢复至对照组水平。

表 3 各组肉鸡线粒体 GSH-Px 的活力的变化 U/g

组织	组别	处 理 后				
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
肝 脏	对照组	44.62 ± 2.13 ^b	41.01 ± 3.77 ^b	39.43 ± 3.01 ^b	36.84 ± 1.93 ^a	33.96 ± 2.50 ^a
	发病组	50.74 ± 4.93 ^a	46.89 ± 2.46 ^a	30.67 ± 1.58 ^c	28.29 ± 2.70 ^b	23.36 ± 2.06 ^b
	治疗组	48.49 ± 3.47 ^a	45.42 ± 5.32 ^a	43.04 ± 1.15 ^a	35.21 ± 2.28 ^a	32.76 ± 4.09 ^a
心 肌	对照组	47.22 ± 3.40 ^b	45.83 ± 5.26 ^b	42.79 ± 2.37 ^a	40.83 ± 3.92 ^a	36.24 ± 3.48 ^a
	发病组	54.90 ± 4.97 ^a	50.57 ± 2.36 ^a	37.11 ± 3.85 ^b	33.56 ± 2.78 ^c	29.22 ± 2.87 ^b
	治疗组	52.29 ± 4.75 ^a	48.01 ± 3.25 ^a	44.03 ± 3.42 ^a	36.19 ± 4.12 ^b	35.32 ± 3.23 ^a
肠 黏 膜	对照组	16.54 ± 1.24 ^b	14.66 ± 3.11 ^b	12.43 ± 2.25 ^b	11.94 ± 2.32 ^a	9.50 ± 1.20 ^a
	发病组	20.97 ± 1.23 ^a	18.86 ± 2.29 ^a	10.93 ± 1.20 ^c	8.45 ± 2.31 ^b	7.89 ± 2.33 ^b
	治疗组	19.12 ± 2.28 ^a	17.79 ± 1.65 ^a	14.94 ± 2.37 ^a	12.01 ± 3.21 ^a	10.04 ± 1.02 ^a

3 讨论

线粒体是细胞内最重要的细胞器之一, 是细胞产生 ATP 的重要场所, 其最基本功能是氧化磷酸化。正常状态下, 机体通过酶系统和非酶系统不断产生自由基, 也不断地被自由基清除系统清除, 维持着动态平衡。MDA 是衡量组织和生物膜脂质过氧化的一个重要的自由基, 间接地反映细胞损伤程度^[1, 4-5]。

机体抗氧化防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切联系, 该防御体系有酶促与非酶促 2 个体系。其中, SOD 是歧化超氧阴离子自由基的专一、特效的抗氧化酶 SOD 活性的高低间接反应了

机体清除氧自由基的能力。若自由基和自由基清除系统之间失去平衡, 便会损伤机体, 发生疾病或使原有疾病更加恶化。增多的氧自由基通过直接破坏 SOD 的结构, 损伤 DNA 结构而造成 SOD 活性丧失和合成蛋白质时基因表达错误, 后者可致合成无功能的蛋白质, 影响 SOD 活性^[6-7]。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶, 主要存在于细胞质中, 少量存在于线粒体中, 它特异性地催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。

向瑞平等^[8]的研究结果表明, 在低温和 T₃ 条件下快速生长的肉鸡随着日龄的增长而血液和组织中的 MDA 极显著升高和 SOD 极显著下降, 显示出随

着日龄的增长其体内脂质过氧化作用显著增强, 自由基的产生明显增加, 其病理过程正在朝着肉鸡腹水综合征方向发展。吴建光等^[9]研究表明, 与健康肉鸡比较, 轻度腹水综合征组肉鸡血清和主要组织MDA 含量降低 ($P < 0.05$) 或显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性升高 ($P < 0.05$) 或显著升高 ($P < 0.01$); 而重度腹水综合征组肉鸡血清和主要组织MDA 含量升高 ($P < 0.05$) 或显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)。间接证明了氧自由基和氧化损伤参与了肉鸡腹水综合征的病理过程, 氧自由基产生水平与肉鸡腹水综合征病情的轻重有关。杨四军等^[6]研究表明, 低温处理后1周和2周, 在肝脏和心脏线粒体中, SOD 含量升高或显著升高 ($P < 0.05$), 低温处理3周后, SOD 的含量降低或显著降低, MDA 的含量升高或显著升高 ($P < 0.05$)。李建喜等的试验结果表明, 腹水综合征阳性鸡体内Se-GSH-Px 的活力低, MDA 含量高, 这与组织缺氧、缺血及再给氧时2项指标的变化相同。这可能与鸡组织内GSH 水平先天性低下、以及肉鸡生长较快而对半胱氨酸的消耗量大有关。

本试验结果显示, 对于发生腹水综合征的肉鸡, 其肝脏、心肌和肠黏膜线粒体MDA 活力呈现先显著降低(1、2周时)后显著提高(3、4、5周时)的变化趋势 ($P < 0.05$), 而与发病组线粒体MDA 活力先降后升的动态变化趋势相反, 治疗组线粒体MDA 的活力则呈现先升后降的趋势, 最终显著阻止了自由基的产生。线粒体SOD 和GSH-PX 活力的变化趋势则与MDA 相反。

本结果提示, 腹水综合征肉鸡发病初期, 机体表现缺氧, 氧自由基增多, 如 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 及单线态氧等生成, 机体即进入氧应激态, 进一步引发组织的应激反应, SOD、GSH-PX 等氧自由基清除剂合成迅速增加, 机体清除氧自由基的能力提高, 以消除过多的氧自由基及其作用产物。所以MDA 含量降低, 相应组

织得到保护, 尤其是靶器官的膜系统不受氧化损伤。而随着缺氧时间延长, 腹水综合征肉鸡病情加重, 机体的应激反应程度和氧自由基代谢酶系统的高代谢状态得以减缓, 机体的保护性代偿机能已经耗竭, 主要组织中SOD 和GSH-Px 的含量明显降低, 氧自由基产生增多, MDA 含量增高。

参考文献

- [1] 邱小忠, 陈 媛, 周 玫. 线粒体氧化应激损伤的防御体系[J]. 生命的化学, 2001, 21(2): 141-143
- [2] 周东海, 郭定宗, 杨世锦, 等. 心纳素在肉鸡腹水综合征发生发展中的作用[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(5): 554-557.
- [3] Tang Z, Iqbal D, Cawthon W. Defects in hearts and breast muscle mitochondrial electron transport of broilers with pulmonary hypertension syndrome [J]. Free Rad Biol Med, 2000, 29: 25
- [4] Tang Z, Iqbal M, Cawthon D and Bottje W G. Heart and breast mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome in broilers. Comparative Biochemistry and Physiology part A, 2002, 132: 527-540
- [5] 王琳琳, 凌文化. 线粒体DNA 氧化损伤机制的探讨[J]. 疾病控制杂志, 2000, 4(1): 80-82
- [6] 赵云罡, 徐建兴. 线粒体、活性氧和细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 169-171.
- [7] 杨四军, 郭定宗, 李家奎. 肉鸡肺动脉高压肝脏和心脏线粒体氧自由基变化研究[J]. 黄冈职业技术学院学报, 2002, 4(1): 63-66
- [8] 蒋秉坤. 线粒体DNA 和疾病[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 18-19
- [9] 向瑞平, 孙卫东, 王金勇, 等. 低温和添加三碘甲状腺原氨酸致肉鸡肺动脉高压综合征的自由基变化[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(2): 79-83
- [10] 吴建光, 郭定宗, 熊道焕. 腹水综合征肉鸡氧自由基变化规律[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(6): 594-596