

日循环高温对肉鸡线粒体活性氧产生量、钙泵活性及胸肌品质的影响

冯京海¹, 张敏红^{1*}, 郑姗姗¹, 谢鹏¹, 李军乔²

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100094;

2. 河北省邢台农业学校, 邢台 054000)

摘要: 通过研究日循环高温对肉鸡线粒体活性氧产生量、钙泵活性的影响, 探讨高温影响肉鸡胸肌品质的机制。研究发现, 日循环高温显著升高肝脏线粒体 H_2O_2 的产生量 ($P < 0.05$), 对胸肌线粒体 H_2O_2 产生量有提高趋势 ($P = 0.0674$), 导致肝脏和胸肌脂质过氧化 ($P < 0.05$), 并抑制胸肌和肝脏线粒体钙泵活性 ($P < 0.05$), 影响肌纤维膜的完整性, 使血液中肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 表明日循环高温影响肌浆钙离子调控功能, 导致肌肉中乳酸含量升高 ($P = 0.0703$), 最终使肉鸡屠宰后胸肌 pH_i 显著降低 ($P < 0.05$), 胸肌 L*、滴水损失和剪切力显著升高 ($P < 0.01$)。配对组与适温组在线粒体 H_2O_2 产生量、钙泵活性、脂质过氧化、乳酸含量以及胸肌 pH、L*、滴水损失等指标上无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 日循环高温引起肉鸡氧化应激, 影响线粒体钙离子转移系统功能, 增加胸肌乳酸的积聚, 使屠宰后胸肌 pH 下降速度加快, 导致胸肌蛋白质变性, 影响胸肌肉色和持水力, 日循环高温对肉鸡线粒体功能及肉品质的影响与高温降低肉鸡采食量无关。

关键词: 日循环高温; 线粒体; 活性氧; 钙泵; 胸肌品质; 肉鸡

中图分类号: S831.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)12-1304-08

The Effect of Cyclic High Temperature on Mitochondrial ROS Production, Ca^{2+} -ATPase Activity and Breast Meat Quality of Broilers

FENG Jing-hai¹, ZHANG Min-hong^{1*}, ZHENG Shan-shan¹, XIE Peng¹, LI Jun-qiao²

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100094, China;

2. Xingtai Agricultural School, Xingtai 054000, China)

Abstract: The present study was conducted to determine the adverse effects of cyclic high temperature on mitochondrial function and breast meat quality of broilers. One hundred eighty 4-week-old broilers were allocated to three treatments according to following design: 25 °C, *ad lib.* feeding (Control); 25 °C, pair-feeding with the high cyclic group (PF); and 28 °C/34 °C daily cyclic high temperature, *ad lib.* feeding (Cyclic). Broilers were kept in three environment control chambers for three weeks. Heat exposure significantly elevated hepatic mitochondrial H_2O_2 production and muscular and hepatic lipid peroxidation, significantly inhibited muscular and hepatic mitochondrial Ca^{2+} -ATPase activity. Increased plasma CK and LDH were found under cyclic high ambient temperature, which indicated that the muscle intracellular free Ca^{2+} was increased and muscle cell membrane integrity was damaged. At 49 day, Consistent with cyclic high temperature induced alterations in mitochondrial function were changes in breast muscle glycolytic metabolism

收稿日期: 2006-04-20

作者简介: 冯京海(1969-), 男, 河南新乡人, 博士, 副研究员, 主要从事营养与畜产品品质的研究, E-mail: fjh6289@126.com

* 通讯作者: 张敏红, 博导, 研究员, Tel: 010-62815990; E-mail: zmh66@126.com

as indicated by lower muscle pH immediately postslaughter (pH_i), and higher drip loss, L^* and shear force. At 25 °C, restrict feeding had no significant effects on mitochondrial function, muscle pH, L^* , and drip loss, which indicated that effects of cyclic high temperature on mitochondrial function and breast meat quality of broilers were not associated with declined in feed intake.

Key words: cyclic high temperature; mitochondrial; ROS; Ca^{2+} -ATPase; breast meat quality; broilers

夏季高温影响现代肉用家禽的肌肉品质,表现为肉色变白、持水力下降的类 PSE 肉特征^[1~3]。研究高温影响家禽肌肉品质的机制对于我国发展肉用家禽生产具有重要意义。早期研究表明,高温导致家禽脂质过氧化,影响家禽的抗氧化酶活性^[4,5],Mujahid 等发现热应激显著升高肉鸡骨骼肌线粒体超氧自由基的产生量^[6],表明高温引起家禽氧化应激。体外研究发现,活性氧(ROS)可通过影响细胞膜上的钙转移系统如钙离子通道、钙泵等^[7,8],引起肝卵圆细胞、小肠平滑肌细胞等细胞钙离子浓度异常升高^[9,10]。而细胞内钙离子浓度异常升高将促进糖原酵解,增加乳酸的产生量^[11]。屠宰后动物的肌肉内产生大量乳酸,使肌肉 pH 下降速度加快,过低的 pH 与过高的胴体温度共同作用,使肌肉蛋白变性,导致肉色苍白,持水力下降的 PSE 肉特征^[12,13]。由此推测,高温可能通过氧化应激,影响家禽骨骼肌的钙离子转移系统,促进乳酸形成,进而影响鸡肉品质。为验证这一推测,本研究通过提高肉鸡饲养温度,研究日循环高温对肉鸡线粒体 ROS 产生量、钙泵活性及胸肌品质的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物与设计

采用单因子完全随机设计,选择 25 日龄 Arbor Acres 肉用公鸡 180 羽,随机分为 3 个处理组,每个处理组 6 个重复,每个重复 10 羽,饲养于动物营养国家重点实验室人工气候舱内。3 个处理组为适温组、适温配对组和高温组,其中适温组昼夜维持恒温 22 °C,自由采食;适温配对组昼夜维持恒温 22 °C,按前一天高温组的采食量饲喂;高温组为 28 °C/34 °C 循环变化,自由采食,每日温度循环规律为,01:00—03:00 维持 28 °C,13:00—15:00 维持 34 °C,其余时间匀速升温或降温。适应 3 d 后正式开始试验,试验周期为 21 d。饲养管理按《AA 肉仔鸡饲养管理手册》进行。日粮按《AA 肉仔鸡饲养管理手册》中推荐的营养需要配比,日粮组成及营养水平

见表 1。

表 1 肉鸡基础日粮组成及营养水平

Table 1 Composition of the broilers basal diet

成分 Ingredients	0~21	22~42	43~49
	日龄 0-21 day	日龄 28-42 day	日龄 43-49 day
玉米 Corn	53.54	56.80	64.65
大豆粕 Soybean meal	30.66	27.78	20.61
鱼粉 Fish meal	5.00	5.00	5.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	3.20	3.00	3.00
玉米油 Corn Oil	4.00	4.70	4.10
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	1.20	0.62	0.60
石粉 Limestone	1.20	0.90	0.84
食盐 Salt	0.20	0.20	0.20
复合预混料 Premixes	1.00	1.00	1.00
营养水平 Nutrient levels			
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.84	13.31	13.31
粗蛋白质 CP	22.39	20.30	19.00
赖氨酸 Lys	1.21	1.05	0.97
蛋氨酸 Met	0.53	0.51	0.51
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.88	0.82	0.74
钙 Calcium	1.02	0.86	0.80
有效磷 Available phosphorus	0.47	0.42	0.41

每千克基础日粮中添加(Provided per kilogram of diet):VA 9 000 IU, VD₃ 3 300 IU, VE 30 IU, VK 2.2 mg, VB₁ 2.2 mg, VB₂ 8 mg, pantothenic acid 12 mg, niacin 66 mg, VB₆ 4.4 mg, folic acid 1 mg, VB₁₂ 0.02 mg, biotin 0.2 mg, Mn(MnSO₄ · 5H₂O) 100 mg, Zn(ZnSO₄ · 7H₂O) 80 mg, Fe(FeSO₄ · 7H₂O) 80 mg, Cu(CuSO₄ · 5H₂O) 8 mg, I(KI) 0.45 mg, Se(Na₂SeO₃) 0.3 mg, 胆碱 550 mg。

1.2 样品采集及制备

每周末 08:00 每重复随机选取 2 只鸡翅静脉采血,4 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,-20 °C 保存,用于测定 CK 和 LDH。试验结束当天,每重复选择 5 只接近平均体重的肉鸡屠宰,其中 2 只鸡翅

静脉采血后,颈部放血,剥皮,快速分离胸肌和肝脏,液氮冷冻, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定线粒体 H_2O_2 产量、钙泵活性、MDA 和乳酸含量。其他 3 只鸡颈部放血,褪毛, $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷水浸泡 10 min 后,分离胸肌,右侧胸肌分成 8 块,其中 2 块立即液氮冷冻, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定 pH_i ; 2 块 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 h 后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定 pH_v , 其他 4 块 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 h 后测定肉色和滴水损失,左侧胸肌 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 h 后测定剪切力。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 分离线粒体 肝线粒体分离参考 Cawthon 等的方法^[14],将肝脏组织在液氮中粉碎,取 1 g,加入 10 mL 预冷的分离液,使用高速组织分离机 10 000 r/min 冰浴匀浆 20 s,间隔 10 s 再次匀浆,匀浆液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 300 \times g 离心 15 min,取上清液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 300 \times g 再次离心 15 min,取上清液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 700 \times g 离心,弃上清液,加入 1 mL 预冷的保育液,用移液器将沉淀吹打分散,即为肝组织线粒体悬浮液,使用考马斯亮兰法测定悬浮液蛋白含量。肝线粒体分离液: 220 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖、2 mmol/L HEPES、1 mmol/L EDTA、0.5 g/L BSA, pH 7.4; 肝线粒体保育液: 300 mmol/L 甘露醇、10 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L KH_2PO_4 、10 mmol/L KCl, pH 7.4。其中 HEPES、BSA、Tris 分别为 SIGMA 公司产品,其他常规试剂购买自北京试剂公司。

胸肌线粒体分离参考 Thakar 和 Ashmore 的方法^[15],取 2 g 骨骼肌,加入预冷的含 0.001 mol/L ATP、0.2% BSA 和 0.1 mg/mL Nagarse 酶的分离介质 10 mL,剪碎后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min,使用高速组织分离机 10 000 r/min 冰浴匀浆 10 s,匀浆液在冰上孵育 5 min,轻轻搅动,再加入 15 mL 预冷的含 0.001 mol/L ATP、0.2% BSA 的分离介质(不含 Nagarse 酶),再次匀浆,匀浆液经低温离心机 480 \times g 离心 10 min,转移上清液,8 700 \times g 再次离心 10 min,弃去上清液,在沉淀物中加入 1 mL 分离介质,使用移液器吹打均匀,而后再经 480 \times g 离心 10 min,取上清液 8 700 \times g 离心 10 min,得到沉淀物,加入 1 mL 保存液,使用移液器吹打均匀,即为线粒体悬浮液,使用考马斯亮兰法测定悬浮液蛋白含量。线粒体 H_2O_2 产生量和钙泵活性在 2 h 内测定。胸肌线粒体分离介质为 0.1 mol/L 蔗糖、0.05 mol/L Tris-HCl、0.005 mol/L MgCl_2 、0.01 mol/L ED-

TA、0.18 mol/L KCl, pH 7.4; 保存液组成: 0.3 mol/L 甘露醇、0.01 mol/L KCl、0.01 mol/L KH_2PO_4 、0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.4; 其中 ATP 由 Amresco 公司生产, Nagarse 酶和 BSA 为 SIGMA 公司产品,其他常规试剂购买自北京试剂公司。
1.3.2 线粒体 H_2O_2 产量 参考 Garait 等测定线粒体 H_2O_2 的方法并作适当修改^[16]。准确量取 2 500 μL 预冷的缓冲液至玻璃管中,加入 100 μL 待测线粒体悬浮液或不同浓度 H_2O_2 标准液, 100 μL 1 200 U/mL 的 SOD 酶溶液, 100 μL 180 U/mL 的 HRP 酶溶液, 100 μL 15 mmol/L HVA, 混匀后加入 100 μL 300 mmol/L 的琥珀酸启动反应,立即在激发波 315 nm, 吸收波 425 nm 处测定荧光强度,而后转移至离心管, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,再次测定荧光强度。每个样品测定两次,取平均值,根据反应前后荧光强度的差值,计算每毫克线粒体蛋白每分钟 H_2O_2 产生量。测定缓冲液组成为: 3 mmol/L MgCl_2 、145 mmol/L KCl、30 mmol/L Hepes、15 mmol/L KH_2PO_4 、0.1 mmol/L EGTA, pH 7.4。

1.3.3 线粒体钙泵 (Ca^{2+} -ATPase) 活性 参考 Anand 的方法^[17],分别测定线粒体 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase 的活性,两者之差为 Ca^{2+} -ATPase 的活性。取 0.8 mL 缓冲液,加入 50 μL 线粒体悬浮液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预温 3 min,加入 30 μL 15 mmol/L 的 ATP 启动反应,20 min 后加入 70 μL 100% 的三氯乙酸终止反应,冰浴冷却后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心,取上清液 300 μL ,使用钒钼酸胺法,在 420 nm 处测定上清液中无机磷的含量,以 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$ 为单位计算酶活性。

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 缓冲液组成: imidazole-HCl 100 mmol/L, pH 7.4; KCl 100 mmol/L; MgCl_2 0.1 mmol/L; CaCl_2 5 mmol/L; Mg^{2+} -ATPase 缓冲液组成: imidazole-HCl 100 mmol/L, pH 7.4; KCl 100 mmol/L; MgCl_2 0.1 mmol/L; EGTA 5 mmol/L。

1.3.4 组织中 MDA、乳酸含量 使用南京建成生物工程研究所的 MDA、乳酸检测试剂盒测定。

1.3.5 血浆中 CK、LDH 使用南京建成生物工程研究所的 CK 和 LDH 检测试剂盒测定。

1.3.6 胸肌理化特性的测定 参考 Sams 和 Janky 的碘乙酸钠法测定 pH_i 和 pH_v ^[18],取 2 g 左右待测胸肌,按 1 : 10 (W/V) 的比例准确加入预冷的 5 mmol/L 碘乙酸钠、150 mmol/L KCl 溶液 (pH 7.0)

匀浆。使用 pH 计测定匀浆液的 pH。

使用 MSC-S 型色差计(上海精密科学仪器有限公司)测定待测胸肌的 L* (亮值)、a* (红值)、b* (蓝值),每块胸肌测定 2 次,取平均值。

屠宰试鸡后每只鸡取 2 块 10 g 左右胸肌称重(w1),置于封口塑料袋中,塑料袋内充气以避免肌肉块贴壁,在 4 °C 冰箱内吊挂 24 h 后,用滤纸揩干肌肉表面水分并称重(w2),计算滴水损失:滴水损失=(w1-w2)÷w1×100%

将待测胸肌密封于塑料袋中,在 80 °C 恒温水浴锅中加热,待肌肉中心温度达到 74 °C 时,将肌肉取出,冷却至室温。每块肌肉沿肌纤维方向修成 3~5 块 1 cm×1 cm×3 cm 的长条,使用 Salter 剪切力仪(G-R Elec. Mfg. Co.)测定剪切力,取平均值。

1.4 统计分析

使用 SAS 软件中的一般线性模型(General linear model, GLM)程序对试验数据进行方差分析,*F* 检验差异显著者,使用 Duncan's multiple range test 比较各平均数间的差异显著性。显著性水平分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

2 结果

2.1 日循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 H₂O₂ 产生量及脂质过氧化的影响(见表 2)

高温组 H₂O₂ 产生量显著高于配对组和适温组 ($P<0.05$),配对组和适温组之间无显著差异 ($P>0.05$),处理对胸肌线粒体 H₂O₂ 产生量有影响趋势 ($P=0.0674$),其中高温组高于配对组和适温组 ($P<0.05$),而配对组和适温组之间无显著差异 ($P>0.05$)。

日循环高温显著升高肉鸡肝脏和胸肌 MDA 的含量 ($P<0.05$),适温组与配对组之间差异不显著 ($P>0.05$)。肉鸡肝脏中 MDA 的含量明显高于胸肌。

2.2 日循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 Ca²⁺-ATPase 活性及胸肌乳酸含量的影响(见表 3)

高温组肝脏线粒体钙泵活性显著低于适温组 ($P<0.05$),但高温组与配对组以及适温组与配对组之间差异不显著 ($P>0.05$)。高温组胸肌线粒体钙泵活性显著低于适温组和配对组 ($P<0.05$),适温组与配对组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

处理对胸肌乳酸含量有影响趋势 ($P=0.0703$),其中高温组胸肌乳酸含量高于适温组 ($P<0.05$),

高温组与配对组以及配对组和适温组之间差异不显著 ($P>0.05$)。

表 2 日循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 H₂O₂ 产生量及脂质过氧化的影响¹

Table 2 Effect of cyclic high temperature on mitochondrial H₂O₂ production and MDA content of broilers liver and breast muscle¹

	线粒体 H ₂ O ₂ 产生量		MDA 含量	
	Mitochondrial H ₂ O ₂ production / (nmol/min · mg protein)		MDA content / (nmol/g wet tissue)	
	肝脏	胸肌	肝脏	胸肌
适温组 Control	0.373 ^a	0.442 ^a	110.37 ^a	25.53 ^a
配对组 pair-fed	0.352 ^a	0.437 ^a	109.91 ^a	25.13 ^a
高温组 High temperature	0.423 ^b	0.549 ^a	126.04 ^b	33.29 ^b
Pooled SEM	0.018 6	0.035 0	4.067	2.258
<i>P</i> 值 <i>P</i> Value	0.026 7	0.067 4	0.020 4	0.036 8

¹ 平均数 Means(n=12)。下表同

^{ac} 同一列中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P<0.05$)

Means with different superscripts within the same column differ significantly ($P<0.05$). The same as below

表 3 循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 Ca²⁺-ATPase 活性及胸肌乳酸含量的影响

Table 3 Effect of cyclic high temperature on mitochondrial Ca²⁺-ATPase activity and lactate content of broilers liver and breast muscle

	线粒体钙泵活性		乳酸含量
	Mitochondrial Ca ²⁺ -ATPase activity / (μmol Pi/h/mg protein)		Lactate content / (μmol/g wet tissue)
	肝脏	胸肌	胸肌
适温组 Control	5.77 ^a	8.94 ^a	46.71 ^a
配对组 pair-fed	5.31 ^{ab}	9.06 ^a	47.18 ^{ab}
高温组 High temperature	4.58 ^b	7.77 ^b	49.98 ^b
Pooled SEM	0.276	0.319	0.989
<i>P</i> 值 <i>P</i> Value	0.025 5	0.022 1	0.070 3

2.3 日循环高温对肉鸡血浆中 CK 和 LDH 活性的影响(见表 4)

高温组肉鸡血浆中 CK 的活性显著高于配对组和适温组 ($P<0.01$);配对组 CK 活性普遍低于适温组,在 35 日龄和 49 日龄达到显著水平 ($P<0.05$);随日龄增加,肉鸡血浆 CK 活性有升高趋势,配对组和高温组 49 日龄肉鸡血浆 CK 活性显著高

于 35 日龄 ($P < 0.05$)。

在 35 和 49 日龄, 高温组血浆 LDH 活性显著高于配对组和适温组 ($P < 0.05$), 配对组和适温组之间无显著差异; 日龄对配对组和适温组肉鸡血浆

中 LDH 无显著影响 ($P = 0.1505, 0.2094$), 但高温组 35 日龄和 49 日龄肉鸡血浆 LDH 活性显著高于 42 日龄 ($P < 0.05$)。

表 4 日循环高温对肉鸡血浆中 CK 和 LDH 活性的影响¹

Table 4 Effect of cyclic high temperature on plasma CK and LDH activity of broilers¹

	适温组 Control	配对组 Pair-fed	高温组 High temperature	集合标准误 Pooled SEM	P 值 P Value
CK/(U/mL)					
35 日龄	59.85 ^x	46.20 ^{ya}	78.13 ^{za}	2.754	<0.0001
42 日龄	63.12 ^x	49.48 ^{xab}	85.91 ^{ya}	3.147	<0.0001
49 日龄	64.30 ^x	57.40 ^{yb}	98.96 ^{zb}	3.689	<0.0001
SEM	2.474	2.833	4.117		
P Value	0.4389	0.0373	0.0091		
LDH/(U/mL)		0.0487			
35 日龄	4.00 ^x	3.95 ^x	4.35 ^{ya}	0.114	
42 日龄	3.65	3.83	3.97 ^b	0.114	0.1746
49 日龄	3.91 ^x	4.12 ^{xv}	4.46 ^{ya}	0.123	0.0196
SEM	0.121	0.112	0.118		
P Value	0.1505	0.2094	0.0252		

¹平均数 Means(n=18)

^{ac}同一列中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P < 0.05$)。xz 同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著 ($P < 0.05$)。

^{ac}Means with different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)。xz Means with different superscripts within the same row differ significantly ($P < 0.05$)

2.4 日循环高温对肉鸡胸肌肌肉品质的影响(见表 5)

高温组胸肌 pH_i 显著低于适温组和配对组 ($P < 0.05$), 配对组和适温组之间差异不显著 ($P > 0.05$); 日循环高温对胸肌 pH_u 无显著影响 ($P = 0.1012$)。高温组胸肌 L* 值显著高于适温组和配对组 ($P < 0.01$), 适温组和配对组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。日循环高温对肉鸡胸肌肌肉色 a* 值和 b* 值无显著影响 ($P = 0.3771, 0.2563$); 高温组胸肌滴水损失和剪切力显著高于配对组和适温组 ($P < 0.01$), 适温组和配对组之间滴水损失无显著差异 ($P > 0.05$), 配对组剪切力显著高于适温组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 日循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 ROS 产生量及脂质过氧化的影响

线粒体是细胞产生活性氧的主要场所, 在正常情况下, 线粒体电子传递过程中大约有 2%~4% 的

电子漏出^[19], 形成超氧阴离子自由基和 H₂O₂。热应激影响线粒体呼吸链功能, 钱令嘉等研究发现^[20], 热应激大鼠心肌细胞线粒体的呼吸控制率 (RCR) 及氧化磷酸化效率 (P/O) 均随热应激强度的增强呈显著降低趋势, Heise 等升高南极双壳贝类 (Laternula elliptica) 腮组织线粒体的孵育温度, 发现高温导致线粒体 ROS 产生量显著升高^[21]。Mujahid 等应用电子自旋技术 (EPR) 和化学发光法分别测定了急性热应激对肉鸡骨骼肌线粒体超氧阴离子自由基产生量的影响, 结果表明热应激显著升高线粒体超氧阴离子自由基的产生量, 并推测热应激导致的肉鸡骨骼肌线粒体超氧阴离子自由基产生量升高与直肠温度升高有关^[6]。本研究测定线粒体 H₂O₂ 产生量的缓冲液体系中含有 SOD 酶, 可将骨骼肌线粒体产生的超氧阴离子自由基歧化为 H₂O₂, 因此, 本研究发现日循环高温显著升高肉鸡线粒体 H₂O₂ 的产生量, 反映了线粒体 ROS 的综合变化, 与上述研究结论一致。

表 5 日循环高温对肉鸡胸肌肉品质的影响¹Table 5 Effect of cyclic high temperature on breast meat quality of broilers¹

	适温组 Control	配对组 Pair-fed	高温组 High temperature	集合标准误 Pooled SEM	P 值 P Value
pH value					
pH _i	6.11 ^a	6.12 ^a	5.92 ^b	0.056	0.037 8
pH _u	5.78	5.82	5.61	0.066	0.101 2
肉色 meat Color					
L*	48.41 ^A	47.92 ^A	54.81 ^B	0.811	<0.000 1
a*	6.278	6.720	6.781	0.268 8	0.377 1
b*	6.588	6.164	6.276	0.256 3	0.256 3
滴水损失 Drip loss/%	2.64 ^A	2.32 ^A	4.05 ^B	0.165	<0.000 1
剪切力 Shear force/kg	2.913 ^{Aa}	3.528 ^{Ab}	4.457 ^{Bc}	0.158 8	<0.000 1

¹平均数 Means(n=18)

^{a,c} 同一行中数值具有不同小写字母上标者差异显著($P < 0.05$), ^{A,B}不同大写字母上标为差异极显著($P < 0.01$)

^{a,c} Means with different superscripts within the same row differ significantly ($P < 0.05$), ^{A,B} Means with different capital superscripts within the same row differ significantly ($P < 0.01$)

当有过渡金属离子存在时,线粒体产生的 H₂O₂ 发生芬顿反应,产生羟基自由基,羟基自由基具有很强氧化活性,可以与 DNA、脂质、蛋白质等生物大分子快速反应。本研究发现,日循环高温导致肉鸡肝脏和胸肌 MDA 含量显著升高,与日循环高温升高线粒体 H₂O₂ 产生量的结论一致。

适温组与配对组在线粒体 ROS 产生量、MDA 含量等指标上差异不显著,表明高温影响肉鸡采食量,降低外源抗氧化物质的摄取,并不是导致肉鸡氧化损伤的关键因素。本研究同时发现,高温环境下,肉鸡肝脏 MDA 含量明显高于胸肌组织,可能与肝脏组织含有大量不饱和脂肪酸有关。

3.2 日循环高温对肉鸡肝脏、胸肌线粒体 Ca²⁺-ATPase 活性及胸肌乳酸含量的影响

钙泵的主要作用是通过分解 ATP,逆离子梯度将胞浆内的钙离子泵回肌浆网、线粒体或胞外,抑制钙泵活性可导致胞浆内钙离子浓度升高。体外研究证实 ROS 可抑制生物膜上钙泵的活性^[8],导致细胞内钙离子浓度升高^[9,10]。本研究发现日循环高温抑制肝脏、胸肌线粒体钙泵活性,与日循环高温提高线粒体 ROS 产生量的研究结果一致。Küchenmeister 等发现夏季氟烷基基因正常猪肌肉匀浆钙离子摄取能力低于冬季,推测高温影响肌浆网钙离子的摄取能力,导致猪肉出现肉色苍白,持水力下降的 PSE 肉特征^[22],本研究仅证实日循环高温抑制线粒体钙泵的活性,但体外研究证明 ROS 同样抑制肌浆网钙泵的活性^[23],因此可以推测,日循环高温通过提高肉鸡 ROS 的产生量,影响肌纤维钙离子转移系统功

能,这可能是高温影响肉鸡胸肌品质的关键因素。

肌纤维内钙离子浓度升高可导致肌肉乳酸含量升高。钙离子浓度升高将激活 ATP 酶,大量消耗 ATP,使 AMP/ATP 比值升高,从而激活 AMP 依赖性蛋白激酶(AMPK),启动骨骼肌糖原酵解^[24],导致糖酵解产物乳酸在肌肉中积累。Imaeda 研究发现^[11],升高肉鸡红细胞内钙离子浓度,乳酸产生量显著增加。本研究发现日循环高温升高肌肉乳酸($P=0.070 3$),与日循环高温抑制胸肌线粒体钙泵活性,提高肌浆钙离子浓度有关。动物屠宰后肌肉乳酸含量升高,使 pH 的下降速度加快,与过高的胴体温度共同导致肌肉蛋白变性,影响肌肉的肉色和持水力^[12,13]。本研究发现日循环高温升高肌肉乳酸含量($P=0.070 3$),与日循环高温影响肉鸡胸肌品质直接相关。

配对组线粒体钙泵活性、乳酸含量与适温组无显著差异,表明日循环高温对钙泵和乳酸产生量的影响不是由高温降低肉鸡采食量引起的。

3.3 日循环高温对肉鸡血浆中 CK 和 LDH 活性的影响

CK 和 LDH 主要存在于骨骼肌中,Mitchell 和 Sandercock 证明肉鸡血液中总 CK 的 99% 为肌肉来源的同工酶^[25]。血液中 CK 酶活升高表明肌纤维膜完整性受损^[26,27]。本研究发现日循环高温显著升高肉鸡血浆中 CK 和 LDH 的活性,与早期文献报道一致^[26,27],表明日循环高温影响肉鸡骨骼肌纤维膜的完整性,使肌纤维内的 CK 和 LDH 流失量增大。

肌纤维膜完整性受损与肌纤维内钙离子浓度异常升高有关, Sandercock 和 Mitchell 体外孵育肉鸡骨骼肌, 孵育液中添加特异性钙离子载体 A23187, 升高肌浆中钙离子浓度, 使肌肉中 CK 的流失速度提高 7.6 倍^[28]。其他研究也证明了肌纤维膜完整性受损与肌纤维内钙离子浓度异常升高有关^[27,29]。本研究发现日循环高温显著升高血浆 CK、LDH 酶的活性, 可能与日循环高温影响肉鸡骨骼肌纤维内钙离子转移系统功能有关。

本研究发现在适温条件下, 配对组肉鸡血浆 CK 酶活性显著低于适温组, 这可能与限饲降低肉鸡骨骼肌纤维细胞代谢和周转速度有关。Hocking 等报道限饲显著降低火鸡血浆中 CK 活性^[30], 与本研究结论一致。本研究结果表明, 肉鸡血浆 CK 活性随日龄增大呈现显著升高趋势, 与 Sandercock 等研究结果相似^[26], 推测血浆 CK 随日龄增加而升高, 可能与肌纤维细胞代谢和周转速度增加有关, 或者与大日龄(大体重)肉鸡肌纤维钙离子调控能力下降, 影响肌纤维膜的完整性有关^[26]。

3.4 日循环高温对肉鸡胸肌肉品质的影响

本研究发现日循环高温显著降低肉鸡胸肌 pH_i ($P < 0.05$), pH_i 降低表明屠宰后肉鸡胸肌 pH 的下降速度增快, pH 的下降速度过快和胴体温度过高将导致肌肉蛋白质变性, 影响肌肉的肉色和持水力^[12,13], Sandercock 等报道, 急性高温应激导致 35 日龄和 63 日龄肉鸡胸肌 pH_i 显著降低, 对 pH_u 的影响不显著^[26], 但 Debut 等发现, 宰前 35 °C 应激 2 h 仅影响肉鸡腿肌 pH_u , 对胸肌 pH 的影响不显著^[31]。热应激对家禽肌肉 pH 的影响可能与应激强度、持续时间以及家禽品种有关。Makee 和 Sam 将火鸡处于 38/32 °C 环境下 4 周, 与 26/24 °C 相比, 火鸡胸肌 pH_i 和 pH_u 均显著降低^[3], 而 Owens 等发现两个品系火鸡在 30/36 °C 应激 4 周, 其中大体重品系火鸡 pH_i 显著下降, 而大胸肌品系仅显著影响 pH_u ^[32]。

L^* (亮度值) 表示肌肉的苍白程度, 本研究发现高温显著增加胸肌 L^* 值以及滴水损失和剪切力, 与前人研究报道一致^[2,3]。肌肉 L^* 值、持水力与肌肉蛋白变性有关, 本研究 and Sandercock 等^[26] 均发现, 热应激导致肉鸡胸肌 pH_i 显著降低, 推测高温引起肉鸡胸肌 pH 快速下降, 导致肌肉蛋白质变性, 从而影响肉鸡胸肌品质, 这与高温增加 ROS 产生量, 影响线粒体钙离子调控功能, 提高肌肉乳酸含量

的结果一致。

配对组的 pH、 L^* 和滴水损失与适温组无显著差异, 表明日循环高温对肉鸡胸肌品质的影响与降低采食量无关。配对组胸肌剪切力高于适温组, 可能与限饲降低肌肉内脂肪沉积有关。

4 结 论

日循环高温升高肉鸡线粒体 ROS 的产生量, 导致肝脏和胸肌脂质过氧化, 抑制线粒体钙泵活性, 增加胸肌乳酸的积聚, 致使屠宰后胸肌 pH 下降速度加快, 导致胸肌蛋白质变性, 影响胸肌肉色和持水力。日循环高温对上述指标的影响与高温降低肉鸡采食量无关。

参考文献:

- [1] 李绍珏, 张子仪. 热应激对肉仔鸡生长性能和肉品质的影响及核黄素抗应激的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 1999.
- [2] Northcutt J K, Foegeding E A, Edens F W. Water-holding properties of thermally preconditioned chicken breast and leg meat [J]. Poultry Sci, 1994, 73:308~316.
- [3] Mckee S R, Sams A R. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat [J]. Poultry Sci, 1997, 76: 1 616~1 620.
- [4] 林海, 杜 荣. 热应激对肉鸡组织过氧化状态的影响[J]. 动物营养学报, 2001, 13(2):30~32.
- [5] Bollenger-Lee S, Mitchell M A, Utomo D B, et al. Influence of high dietary vitamin E supplementation on egg production and plasma characteristics in hens subjected to heat stress [J]. Br Poult Sci, 1998, 39:106~112.
- [6] Mujahid A, Yoshiki Y, Akiba Y, et al. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress [J]. Poultry Sci, 2005, 84:307~314.
- [7] Kourie J I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms [J]. Am J Physiol, 1998, 275:c1~c24.
- [8] Karen M, Lounsbury H Q, Ziegelstein R C, et al. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 28(9): 1 362~1 369.
- [9] 廖钢陵, 李 芸, 俞志宏, 等. 超氧阴离子自由基对大鼠

- 肝卵圆细胞胞内自由钙浓度的影响[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(4):367~369.
- [10] Bielefeldt K, Whiteis C A, Sharma R V, *et al.* Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells [J]. American J Physiology, 1997, 272:G1439~G1450.
- [11] Imaeda N. Characterization of lactic acid formation and adenosine triphosphate consumption in calcium-loaded erythrocytes of broiler chickens [J]. Poultry Sci, 2000, 79:1 543~1 547.
- [12] Warriss P D, Brown S N. The relationship between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle [J]. Meat Sci, 1987, 20:65~74.
- [13] McKee S R, Sams A R. Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale exudative turkey meat characteristics [J]. Poultry Sci, 1998, 77:169~174.
- [14] Cawthon D. Evidence of Mitochondria dysfunction in broilers with pulmonary hypertension syndrome (Ascites): Effect of t-butyl hydroperoxide on hepatic mitochondrial function, glutathione, and related thiols [J]. Poultry Sci, 1999, 78:114~124.
- [15] Thakar J H, Ashmore C R. An improved method for isolation of mitochondria from chick breast muscle using nagarse [J]. Anal Biochemistry, 1975, 69:545~551.
- [16] Garait B, Couturiera K, Servaisb S, *et al.* Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2005, 1~13.
- [17] Anand M B. Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activities of heart sarcolemma microsomes and mitochondria [J]. J Biochem, 1977, 82: 1 731~1 739.
- [18] Sams A R, Janky D M. The influence of brine chilling on tenderness of hot boned chill-boned and age boned broiler fillets [J]. Poultry Sci, 1986, 65:1 316 ~ 1 321.
- [19] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide [J]. Biochem J, 1973, 134:707~711.
- [20] 钱令嘉, 弓景波, 程素琦. 热应激心肌细胞损伤的线粒体机制探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16 (2): 133~136.
- [21] Heise K, Puntarulo S, Portner H O, *et al.* Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the antarctic bivalve laternula elliptica (King and Broderip) under heat stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2003, 134: 79~90.
- [22] Küchenmeister U, Kuhn G, Ender K. Seasonal effects on Ca²⁺ transport of sarcoplasmic reticulum and on meat quality of pigs with different malignant hyperthermia status [J]. Meat Sci, 2000, 55:239~245.
- [23] Moreau V H, Castilho R F, Ferreira S T, *et al.* Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase at submicromolar ion concentrations: evidence for metal-catalyzed oxidation [J]. Free Radic Biol Med, 1998, 25:554~560.
- [24] Hardie D G. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status [J]. Endocrinology, 2003, 144:5 179~5 183.
- [25] Mitchell M A, Sandercock D A. Creatine kinase isoenzyme profiles in the plasma of the domestic fowl (Gallus domesticus): Effects of acute heat stress [J]. Res Vet Sci, 1995, 59:30~34.
- [26] Sandercock D A, Hunter R R, Nute G R, *et al.* Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: implications for meat quality [J]. Poultry Sci, 2001, 80:418~425.
- [27] Sandercock D A, Mitchell M A. Heat stress-induced skeletal muscle damage in broiler chickens: the effect of dantrolene sodium [J]. Poultry Sci, 1998, 77(Suppl. 1):105. (Abstr.)
- [28] Sandercock D A, Mitchell M A. The role of sodium ions in the pathogenesis of skeletal muscle damage in broiler chickens [J]. Poultry Sci, 2004, 83:701~706.
- [29] Mitchell M A, Sandercock D A, Hunter R R, *et al.* Skeletal muscle damage following halothane anaesthesia in the domestic fowl: plasma biochemical responses [J]. Res Vet Sci, 1999, 67:59~64.
- [30] Hocking P M, Mitchell M A, Bernard R, *et al.* Interaction of age, strain, sex and food restriction on plasma creatine kinase activity in turkeys [J]. British Poultry Sci, 1998, 39(4): 360~364.
- [31] Debut M, Berri C, Baéza E, *et al.* Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions [J]. Poultry Sci, 2003, 82:1 829~1 838.
- [32] Owens C M, Matthews N S, Sams A R. The use of halothane gas to identify turkeys prone to developing pale, exudative meat when transported before slaughter [J]. Poultry Sci, 2000, 79:789~795.