

运输应激对二花脸仔猪与皮特兰仔猪肌纤维特性的影响

陈晓娟, 黄帅, 赵茹茜, 杨倩*

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 选用性情温顺、肉质好的二花脸仔猪与性情暴躁、肉质欠佳的皮特兰仔猪, 应用组织学与组织化学的方法研究了运输应激对这两种猪背最长肌的类型、毛细血管密度、乳酸脱氢酶以及糖原的影响。试验结果: 1) 运输组的二花脸猪 II b 型纤维面积积极显著小于运输组皮特兰猪 ($P < 0.01$), 对照组的二花脸猪 II b 型纤维面积显著小于皮特兰猪 ($P < 0.05$); 两种猪均是 II b 型纤维所占比例最大, 同一品种内运输组与对照组各型肌纤维面积差异均不显著。2) 运输应激后二花脸猪乳酸脱氢酶活性比对照组极显著升高 ($P < 0.01$), 皮特兰猪比对照组也显著增加 ($P < 0.05$)。3) 运输应激对两种猪背最长肌中糖原含量影响不大。4) 二花脸猪对照组背最长肌单位面积内毛细血管密度 (CD) 显著高于皮特兰猪运输组与对照组 ($P < 0.05$), 但毛细血管数与肌纤维数的比值 (C/F) 差异不显著 ($P > 0.05$)。上述结果表明: 二花脸猪的肌肉有氧化代谢和无氧酵解潜能较强, 有利于肌肉在运输应激后保持细胞内稳态; 皮特兰猪肌纤维面积大、毛细血管密度低, 不利于肌肉进行有氧代谢, 易受应激影响。

关键词: 仔猪; 运输应激; 肌纤维类型; 毛细血管密度; 乳酸脱氢酶; 糖原

中图分类号: S852.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 01-0082-05

Effect of transport stress on the myofibre characteristics of Erhualian and Pietrain piglets

CHEN Xiao-juan, HUANG Shuai, ZHAO Ru-qian, YANG Qian*

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To compare the influence on myofibre characteristics between Erhualian and Pietrain piglets after transport, *longissimus dorsi* (LD) muscle classified into different muscle fibre types using ATPase histochemistry, capillary density (CD) and glycogen were studied by periodic acid-Schiff (PAS) staining, and lactate dehydrogenase (LDH) was studied by LDH histochemistry. The results indicated that: 1) II b fibres area of Erhualian transport groups in LD were significantly smaller than Pietrain transport groups ($P < 0.01$). 2) The lactate dehydrogenase activity was significantly higher after transport ($P < 0.05$). 3) Capillary density of Erhualian control groups was significantly higher than Pietrain ($P < 0.05$), but the capillary per fibre ratio was no difference ($P > 0.05$). 4) The content of glycogen was no difference after transport. The results suggest that the much higher latent of energy metabolism both in aerobic metabolism and anaerobic glycolysis of the muscle of Erhualian may be the reason for better meat quality, and that the large area and low capillary density of Pietrain's muscle fibre were no benefit to aerobic metabolism.

Key words: piglet; transport stress; myofibre types; capillary density; lactate dehydrogenase; glycogen

在养猪生产过程中, 运输是必不可少的重要环节, 而运输应激常导致猪肉品质下降。国内外就运输应激对猪的行为、生理指标、福利和肉质等方面已作了较多的研究^[1-3]。二花脸猪是我国优良的地方猪种, 以繁殖性能高而闻名世界, 其性情温顺、肉质好, 属顺从型抗应激型猪种。皮特兰猪是比利时的肉用猪种, 具有背膘薄、胴体瘦肉率高等优点, 肉质欠佳, 属攻击型应激敏感型猪种^[4]。运输对这两种不同类型的猪肉品质有何影响目前还没有报道。笔者旨在研究运输应激对二花脸仔猪和皮特兰仔猪肌纤维特性的影响, 为今后提高仔猪生产性能和研究仔猪运输应激提供理论基础。

收稿日期: 2006-11-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2004CB11750); 国家自然科学基金重点项目 (30430420)

作者简介: 陈晓娟, 硕士研究生。* 通讯作者: 杨倩, 教授, 博士生导师, 主要从事动物黏膜免疫和组织胚胎学研究,

E-mail: zbyq@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 动物试验及取材

由无锡锡山种猪场提供纯种二花脸仔猪（已阉割）26头，运输组12头，对照组14头；纯种皮特兰仔猪（已阉割）12头，分为运输组和对照组，每组6头。试验期间，仔猪自由采食、饮水，常规饲养管理。分别养至20 kg左右，运输组给予2 h左右， $40 \text{ km} \cdot \text{h}^{-1}$ 的运输应激。整个运输过程猪只相互隔离，运输密度为 $65 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。每次运输起始时间和运输路线一致。运输结束后给予猪只15 min休息时间之后静脉注射巴比妥钠麻醉，断颈宰杀。宰后迅速取左侧胸腰结合处背最长肌组织样2份，1份置液氮速冻， $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，1份用波恩氏液固定。

1.2 肌纤维类型的显示（ATP酶法染色）

用LEICA CM-1850型冰冻切片机制备 $10 \mu\text{m}$ 厚的新鲜切片，参照Brooke等^[5]的方法，将冰冻切片置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ （pH 9.4）孵育液中孵育90 min，经1%天青染色30 s，水洗后经逐级梯度乙醇脱水，二甲苯透明后树胶封片。同时以去除底物ATP钠盐作对照。参照Brooke等^[5]的方法根据肌纤维对ATP酶反应的强弱，将肌纤维分为慢收缩氧化型（I型）、快收缩氧化型（II a型）和快收缩糖酵解型（II b型）3种类型。每张切片选取6个完整肌束，在Olympus显微镜下观察肌纤维并拍照，用Image-pro plus 4.5计算机图像分析系统对不同部位的肌纤维进行面积测定，统计不同类型肌纤维比例。

1.3 肌纤维中乳酸脱氢酶的测定

将 $10 \mu\text{m}$ 厚的新鲜冰冻切片置入按文献[6]中Preston方法配制的乳酸脱氢酶（LDH）孵育液中， $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光作用15 min，蒸馏水洗净后阴干，树胶封片。同时，以去除底物乳酸钠的孵育液作对照。经LDH法染色的切片在显微镜下观察并拍照，用Image-pro plus 4.5计算机图像分析系统校正后计算10个不同部位的乳酸脱氢酶平均光密度值，作定量分析。

1.4 肌纤维中糖原的测定

参照McManus的方法^[6]，将 $10 \mu\text{m}$ 厚的新鲜冰冻切片置0.8%的过碘酸水溶液2 min，蒸馏水洗过后入Schiff试剂作用15 min，亚硫酸钠溶液洗3次，每次2 min；自来水冲洗5 min后蒸馏水洗1 min，阴干后树胶封片。糖原光密度测定方法同乳酸脱氢酶。

1.5 肌束内毛细血管的观察

石蜡法常规切片，厚度 $4 \mu\text{m}$ ，PAS（periodic acid-Schiff）染色，方法同1.4节。在显示毛细血管的切片中，选取10个不同部位的肌束观察并拍照，并用交互式半自动方式统计不同肌束内毛细血管的数目，计算单位面积内毛细血管密度（capillary density, CD），毛细血管数与肌纤维数的比值（capillary/fibre, C/F）。

1.6 统计分析

试验数据用 $\bar{x} \pm SE$ 表示，统计分析采用SPSS10.0软件，运用LSD单因子方差分析法检验平均数之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 背最长肌各型肌纤维面积与比例

ATP酶染色法显示（图1），肌纤维呈白色的为I型，浅蓝色的为II a型，深蓝色的为II b型。横截面积以I型最小，II a型居中，II b型最大。在同一肌束内，I型多分布于肌束中央，呈簇状分布，一般由2~3个肌纤维组成，II b型多分布于肌束周边，II a型在肌束内的分布则介于I型与II b型之间，交错排列。

如表1所示，运输组二花脸猪II b型纤维面积显著小于运输组皮特兰猪（ $P < 0.01$ ），运输组二花脸猪I型与II a型纤维面积略小于运输组皮特兰猪；同一品种内运输组与对照组各型肌纤维面积差异均不显著；两种猪运输组与对照组之间背最长肌各型纤维所占的比例均无显著差异，均是II b型纤维所占比例最大。

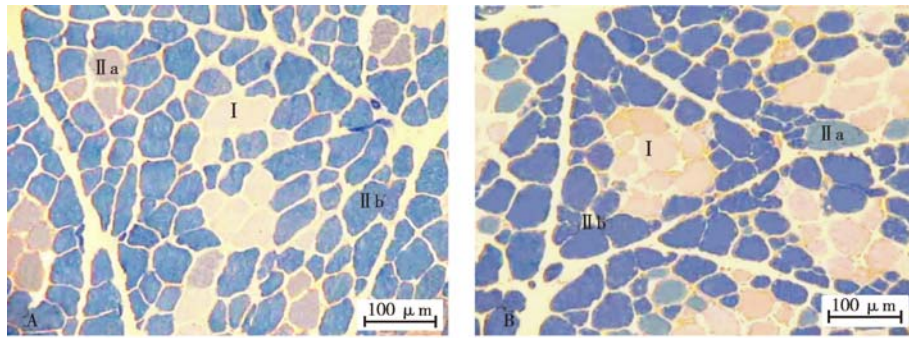


图 1 ATP 酶染色法显示运输后二花脸猪与皮特兰猪各型肌纤维 (× 100)

Fig. 1 Transport group histochemical staining of Erhualian and Pietrain muscle fibre types with ATPase

A. 二花脸猪 Erhualian; B. 皮特兰猪 Pietrain

表 1 两品种仔猪背最长肌不同类型肌纤维面积和比例

Table 1 Area and proportion of different muscle fibre types in *longissimus dorsi* muscle of two piglets breeds

肌纤维 Muscle fibre	二花脸猪 Erhualian		皮特兰猪 Pietrain	
	运输组 Transport group	对照组 Control group	运输组 Transport group	对照组 Control group
I 面积/ μm^2 Area	934.79 ± 103.12 ^b	1 091.30 ± 63.33 ^{ab}	1 155.66 ± 92.17 ^{ab}	1 329.66 ± 172.82 ^a
比例/% Proportion	16.22 ± 1.40 ^a	15.92 ± 1.77 ^a	16.00 ± 0.59 ^a	19.73 ± 1.21 ^a
II a 面积/ μm^2 Area	1 093.22 ± 72.04 ^b	1 383.67 ± 139.75 ^{ab}	1 647.51 ± 43.53 ^{ab}	1 707.62 ± 129.97 ^a
比例/% Proportion	29.61 ± 5.26 ^a	27.19 ± 2.78 ^a	28.34 ± 0.31 ^a	21.46 ± 5.49 ^a
II b 面积/ μm^2 Area	1 772.50 ± 85.34 ^{b^c}	2 046.36 ± 168.18 ^{ABbc}	2 800.22 ± 149.42 ^{Aa}	2 538.31 ± 152.17 ^{ABab}
比例/% Proportion	54.42 ± 5.29 ^a	56.9 ± 2.60 ^a	55.67 ± 0.90 ^a	58.81 ± 4.28 ^a

注：同行不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异极显著和显著。

Note: Different capital and small letters in the same row mean significant difference at 0.01 and 0.05 levels, separately. The same as follows.

2.2 背最长肌乳酸脱氢酶含量

如图 2 - A 和 B 所示，乳酸脱氢酶染色呈蓝紫色，着色深的肌纤维主要分布在肌束外周，肌束中央着色较浅，呈淡紫色或白色，这与 ATP 酶染色划分的纤维类型排列一致，提示了 II b 型纤维乳酸脱氢酶含量比 I 型纤维多。运输组猪肌纤维被染成深紫色，对照组猪肌纤维呈淡紫色，显示乳酸脱氢酶活性运输组比对照组高，且运输应激以后 II b 型纤维乳酸脱氢酶活性更高。从表 2 可见，背最长肌乳酸脱氢酶活性运输组与对照组相比明显增加，二花脸猪差异极显著 ($P < 0.01$)，皮特兰猪差异显著 ($P < 0.05$)，两个品种间差异不显著 ($P > 0.05$)。

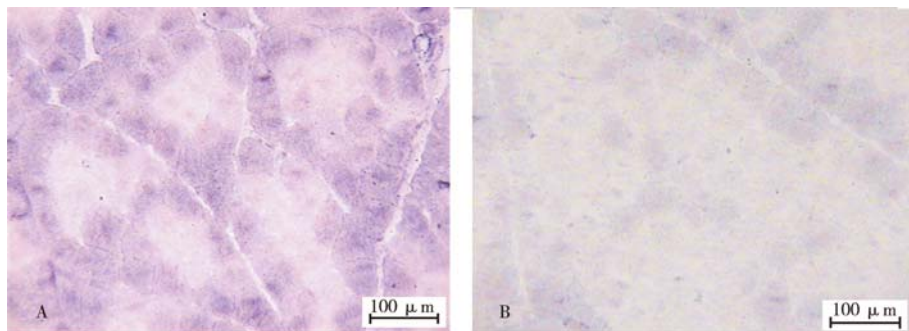


图 2 LDH 法染色显示皮特兰猪肌纤维内乳酸脱氢酶 (× 100)

Fig. 2 Lactate dehydrogenase (LDH) of Pietrain muscle fibre histochemical staining with LDH

A. 运输组 Transport group; B. 对照组 Control group

2.3 背最长肌糖原含量

经 PAS 染色，糖原呈紫红色，运输组比对照组染色浅 (图 3)。提示运输应激后，肌纤维内糖原被消耗。肌束外周被染为紫红色，表明 II b 型纤维糖原含量比 I 型纤维高。从表 2 可见，两种猪运输组与对照组相比糖原含量差异均不显著 ($P > 0.05$)，但运输组比对照组 D 值稍低，两品种间差异也不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 运输应激对不同品种仔猪肌纤维 LDH 活性和糖原含量的影响

Table 2 Effect of transport stress on lactate dehydrogenase (LDH) activity of muscle fibres and content of glycogen in different breeds of piglets

项目 Item	二花脸猪 Erhualian		皮特兰猪 Pietrain	
	运输组 Transport group	对照组 Control group	运输组 Transport group	对照组 Control group
LDH 活性 LDH activity	0.169 ± 0.003 ^{AA}	0.112 ± 0.026 ^{Cab}	0.166 ± 0.008 ^{ABa}	0.095 ± 0.009 ^{BCb}
糖原含量 Content of glycogen	0.120 ± 0.004 ^a	0.126 ± 0.002 ^a	0.119 ± 0.005 ^a	0.122 ± 0.002 ^a

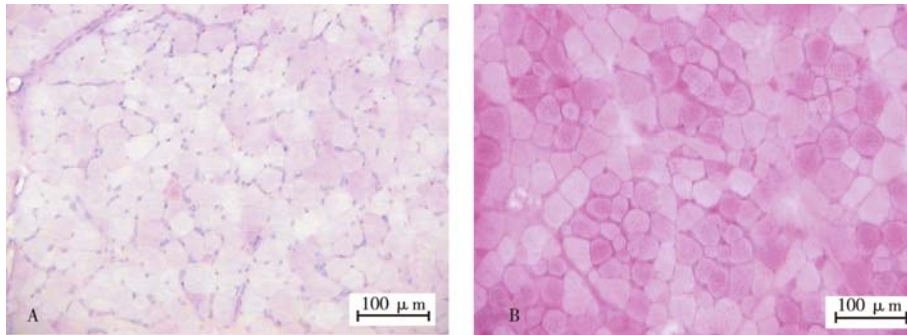


图 3 PAS 染色法显示皮特兰猪肌纤维内糖原

Fig. 3 Content of glycogen of Pietrain muscle fibre histochemical staining with PAS (periodic acid-Schiff) (×100)

A. 运输组 Transport group; B. 对照组 Control group

2.4 背最长肌毛细血管密度

统计背最长肌毛细血管密度的结果显示 (表 3), 二花脸猪对照组背最长肌单位面积毛细血管密度 (CD) 显著高于皮特兰猪运输组与对照组 ($P < 0.05$), 但毛细血管数与肌纤维数的比值 (C/F) 差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 背最长肌单位面积毛细血管密度 (CD) 和毛细血管数/肌纤维数 (C/F)

Table 3 Capillary density (CD) and capillary/muscle fibre (C/F) in *longissimus dorsi* muscle

项目 Item	二花脸猪 Erhualian		皮特兰猪 Pietrain	
	运输组 Transport group	对照组 Control group	运输组 Transport group	对照组 Control group
CD/根·mm ⁻²	1 058.81 ± 140.94 ^{ab}	1 156.45 ± 62.80 ^a	860.62 ± 66.20 ^b	803.14 ± 129.14 ^b
C/F	1.50 ± 0.26 ^a	1.94 ± 0.21 ^a	1.94 ± 0.06 ^a	1.87 ± 0.44 ^a

3 讨论

氟烷基因 (halothane, *Hal*) 是猪的兰尼啶受体 (ryanodine receptor type 1, RyR1) 上的一个突变位点, 该基因的突变使该受体的功能发生改变, 尤其是面对各种应激原时钙通道开放后不能及时关闭, 钙离子大量内流, 导致肌肉强直收缩, 不能舒张, 容易发生猪的恶性高热综合征 (malignant hyperthermia, MH)^[7]。*Hal^{mm}* 为阴性纯合子, *Hal^{NN}* 为完全正常的野生型。*Hal^{mm}* 型基因猪在胴体性状上具有胴体瘦肉率高、背膘薄、眼肌面积大、饲料转化率高的特点。在肉质性状上, *Hal^{mm}* 型基因猪在应激原的作用下, 极易发生应激综合征, 并且宰后携带 *Hal^{mm}* 基因的猪尸僵开始得早, 使得 pH 值迅速下降^[8-9], 容易产生 PSE (pale, soft, and exudative) 肉, 降低肉色和系水力。二花脸猪为我国的优质猪种, 肉质鲜美、肉香浓郁, 其基因型为 *Hal^{NN}*; 皮特兰猪为国外瘦肉型猪种, *Hal^{mm}* 所占比例高。

根据 Brooke 等^[5]对肌纤维划分, I 型肌纤维氧化能力强、糖酵解能力低, II b 型肌纤维氧化能力低、糖酵解能力高, II a 型肌纤维介于两者之间。许多研究表明肌纤维的面积是影响肌肉嫩度和系水力的重要指标。Fiedler 等^[10]也报道 *Hal^{mm}* 型基因猪肌纤维面积比 *Hal^{NN}* 和 *Hal^{Nn}* 基因猪的肌纤维面积大。本试验结果与上述报道相符。皮特兰猪肌纤维面积大, 使肌纤维表面上的毛细血管与纤维轴心之间有较长的血流扩散径路, 以致造成纤维轴心缺氧, 容易产生大量的乳酸^[11-12], 因而导致宰后容易产生 PSE 肉。有研究报道, 发生 PSE 肉各型肌纤维面积均显著大于正常肉^[13]。本试验中, 两种猪均是 II b 型即快收缩糖酵解型纤维所占比例最大, 这也进一步解释了背最长肌更容易通过糖酵解途径利用能量, 更易发生 PSE 肉的原因。两种猪之间背最长肌各型纤维所占的比例均无显著差异, 可能与动物日龄较小有关。杨晓静等^[14]研究了二花脸猪与长白猪肌纤维类型比例的发育性变化, 发现两品种猪在 90 日龄后

才出现肌纤维类型比例的显著差异。

两种猪背最长肌单位面积内每根肌纤维相邻的毛细血管 C/F 值差异不显著,但由于二花脸猪 II b 型肌纤维面积积极显著小于皮特兰猪,使得二花脸猪单位面积内毛细血管密度显著高于皮特兰猪。从 C/F 值来看,二花脸猪每根肌纤维相邻的毛细血管还略少于皮特兰猪,但由于肌纤维较细,使得氧的弥散距离缩短,从而有利于二花脸猪骨骼肌氧气及营养物质的供应,并且能够快速将代谢产生的乳酸及其他代谢产物清除。

糖原是肌肉能量的储备形式,占肌肉质量的 1% 左右,肌肉中糖原含量的多少,对肉的 pH 值、系水力、肉色等均有影响。动物宰杀后,肌肉内的能量代谢由有氧氧化转变为无氧酵解,糖原在乳酸脱氢酶的作用下转化为乳酸,此时动物循环系统已被破坏,乳酸只能留在肌肉中并随着代谢的进行,浓度不断升高,使得 pH 值不断下降,直到肌肉中贮存的糖原全部被耗尽或组织中 pH 值降低到使分解糖原的酶失去活性为止。本试验中,运输组比对照组肌肉内糖原含量减少,二花脸猪的糖原含量还比皮特兰猪略高一些,但差异并不显著,原因可能有两方面:一方面,宰前运输应激并未引起糖原的大量消耗,这可能与运输密度较小有关,本研究运输密度仅为 $65 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$,标准运输一般大于 $235 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ^[15];另一方面,仔猪的肌纤维面积较肥猪小,单位面积内毛细血管的分布密度高,物质代谢能力强,因此日龄较小的仔猪不易发生恶性高热综合征^[16]。但是在本试验中,两个品种仔猪运输组乳酸脱氢酶活性都比对照组显著增加,与 Fàbrega 等^[17]的报道一致,提示了宰后在糖原含量相同的基础上,运输组利用糖原合成乳酸的能力更强,pH 值下降更快。在胴体的自然体热和代谢产生的热量未发散之前,肌肉中酸性条件的发展会导致肌肉蛋白的变性。由试验结果可见,糖原与乳酸脱氢酶在 II b 型纤维中含量较多,提示了 II b 型纤维比例高的肥猪发生 PSE 肉的几率更大。

参考文献:

- [1] Warriss P D. The welfare of slaughter pigs during transport [J]. Anim Welf, 1998, 7(4): 365-381
- [2] Pérez M P, Palacio J, Santolaria M P, et al. Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs [J]. Meat Science, 2002, 61: 425-433
- [3] 李玉保,孙培明,王志亮,等. 运输应激猪组织病理学损伤、HSP₂₇的组织分布及其相关性研究 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 83-87
- [4] Zhang W, Kuhlers D L, Rempel W E. Halothane gene and swine performance [J]. J Anim Sci, 1992, 70: 1307-1313
- [5] Brooke M H, Kaiser K K. Muscle fiber types: how many and what kind? [J]. Arch Neural, 1970, 23: 369-379
- [6] 陈啸梅,周文郁,彭俊云,等. 组织化学手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1982: 72-233
- [7] Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia [J]. Science, 1991, 253: 448-451
- [8] 陈代文,张克英,胡组禹. 猪肉品质特征形成的原理 [J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(1): 60-66
- [9] Bowker B C, Grant A L, Forrest J C, et al. Muscle metabolism and PSE pork [EB/OL] //Proceeding of the American Society of Animal Science, 2000 [2005-05-21]. <http://www.asas.org/symposia/0601.pdf>
- [10] Fiedler I, Ender K, Wicke M, et al. Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality [J]. Meat Science, 1999, 53: 9-15
- [11] Henckel P, Oksbjerg N, Erlandsen E, et al. Histo- and biochemical characteristics of *longissimus dorsi* muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality [J]. Meat Science, 1997, 47: 311-321
- [12] Karlsson A H, Klont R E, Fernandez X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality [J]. Livestock Production Science, 1999, 60: 255-269
- [13] von Lengerken G, Maak S, Wicke M. Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry [J]. Veterinaria ir Zootechnika T, 2002, 20(42): 82-86
- [14] 杨晓静,赵茹茜,陈杰,等. 猪背最长肌肌纤维类型的发育性变化及其品种和性别特点 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(1): 89-94
- [15] Gade P B, Christensen L. Effect of different stocking densities during transport on welfare and meat quality in Danish slaughter pigs [J]. Meat Science, 1998, 48: 237-247
- [16] Rundgren M, Lundström K, Edfors-Lilja I, et al. A within litter comparison of the three halothane genotypes. 1. Piglet performance and effects of transportation and amperozide treatment at 12 weeks of age [J]. Livestock Production Science, 1990, 26: 137-153
- [17] Fàbrega E, Manteca X, Font J, et al. Effects of halothane gene and pre-slaughter treatment on meat quality and welfare from two pig crosses [J]. Meat Science, 2002, 62: 463-472