

高温及氧化应激对体外培养肉鸡骨骼肌线粒体功能的影响

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 100193; ²河北省邢台农业学校, 河北邢台 054000)

摘要:【目的】研究高温和氧化应激对体外培养肉鸡骨骼肌线粒体功能的影响, 初步探讨高温影响肉鸡肌肉品质的机制。【方法】从16只2周龄AA肉鸡的左右小腿后侧分离腓骨长肌, 使用不锈钢支架维持肌肉束的正常长度, 在95%O₂、5%CO₂混合气体饱和条件下, 体外孵育2 h。分别测定升高孵育温度或在培养介质中添加邻苯三酚后, 肉鸡腓骨长肌线粒体活性氧(ROS)产量、钙泵(Ca²⁺-ATPase)活性和乳酸含量的变化。【结果】升高培养温度显著提高肉鸡骨骼肌线粒体H₂O₂的产生量($P < 0.0001$), 导致肌肉脂质过氧化($P = 0.0368$), 抑制线粒体钙泵活性($P = 0.0001$), 增加乳酸积聚($P < 0.0001$), 并影响肌纤维膜的完整性, 使肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的流失量增加($P = 0.0009$, $P = 0.0114$), 而培养介质中添加邻苯三酚对肉鸡腓骨长肌产生相似的影响。【结论】高温影响线粒体功能, 增加肌肉乳酸浓度, 损伤肌纤维膜完整性, 这些影响与高温诱导的氧化应激有关。

关键词: 高温; 邻苯三酚; 肌肉培养; 线粒体; 活性氧; 肉鸡

Effect of High Temperature and Oxidative Stress on Mitochondrial Function of Incubated Broiler Muscle

FENG Jing-hai¹, ZHANG Min-hong¹, ZHENG Shan-shan¹, XIE Peng¹, LI Jun-qiao²

(¹Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100193; ²Xingtai Agricultural School, Xingtai 054000, Hebei)

Abstract:【Objective】The present study was conducted to determine the effects of high temperature and oxidative stress on mitochondrial function of incubated broilers muscle. 【Method】The bilateral *M. fibularis longus* muscle of sixteen broilers were incubated *in vitro* to evaluate the effect of high incubated temperature and pyrogallol on mitochondrial H₂O₂ production and Ca²⁺-ATPase activity. 【Result】The higher incubation temperature (44.5°C) significantly elevated muscle mitochondrial H₂O₂ production (24.6%) and significantly inhibited Ca²⁺-ATPase activity (19.6%), and also resulted in the elevation of the lipid peroxidation and lactate content in incubated muscle. The loss of CK (phosphokinase) and LDH from incubated muscle was significantly elevated by higher temperature, which indicated that the integrity of muscle cell membrane was damaged. Pyrogallol, which can produce superoxide anion radicals by autoxidation, at 0.3 mmol·L⁻¹ has similar effects on incubated muscle as higher temperature. 【Conclusion】High temperature effected the function of muscle mitochondria, increased lactate concentration, damaged the integrity of muscle cell membrane. The effects of high temperature were associated with oxidative stress.

Key words: High temperature; Pyrogallol; Incubated muscle; Mitochondrial; ROS; Broilers

0 引言

【研究意义】夏季高温影响家禽的肌肉品质, 表现为肉色变白, 持水力下降的类PSE肉特征^[1,2], 成为

影响现代肉用家禽生产的一个主要问题, 研究高温影响肌肉品质的机制对于中国肉用家禽生产具有重要指导意义。【前人研究进展】高温显著升高肉鸡骨骼肌线粒体活性氧(ROS)产生量^[3,4], 导致肉鸡氧化应激^[5]。

收稿日期: 2008-04-03; 接受日期: 2008-06-02

基金项目: 国家“973”项目(2004CB117500)

作者简介: 冯京海(1969-), 男, 河南新乡人, 副研究员, 博士, 研究方向为动物营养与畜产品品质。Tel: 010-62895517; E-mail: fjh6289@126.com。通讯作者张敏红(1966-), 浙江东阳人, 研究员, 博士, 研究方向为环境营养与畜产品品质。Tel: 010-62815990; E-mail: zmh66@126.com

体外研究表明, ROS 影响上皮细胞、平滑肌细胞等膜上的钙转移系统如钙离子通道、钙泵等^[6,7], 引起心肌细胞、肝卵圆细胞、小肠平滑肌细胞、上皮细胞等细胞内钙离子浓度异常升高^[8-10]。细胞内钙离子浓度异常升高可引起乳酸大量产生^[11,12]。而屠宰后肌肉内乳酸积聚导致肌肉 pH 下降速度加快, 与胴体温度过高共同导致肌肉蛋白变性, 造成肉色苍白, 持水力下降的 PSE 肉特征^[13,14]。由上述研究结果推测, 高温可能通过氧化应激, 影响肌纤维钙转移系统功能, 导致肌肉中乳酸积聚, 进而影响鸡肉品质。【本研究切入点】为验证这一推测, 本试验研究提高孵育温度对肉鸡骨骼肌 ROS、钙泵活性及乳酸产生量的影响, 同时利用邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基的特性, 模拟氧化应激, 研究氧化应激对钙泵活性及乳酸产生量的影响。【拟解决的关键问题】探讨高温影响肉鸡肌肉品质是否与氧化应激有关。

1 材料与方法

1.1 肌肉分离与孵育

选择 16 只体重接近、健康的 2 周龄 Arbor Acres 肉用公鸡, 腹腔注射戊巴比妥钠盐(100 mg·kg⁻¹ 体重), 待肉鸡麻醉后, 全身消毒, 在洁净环境下剥开腿部皮肤, 用眼科剪钝性剥离左右小腿后侧的胫骨长肌, 注意保持肌肉束筋腱的完整性, 肌肉束剥离后迅速称重, 使用手术线将完整肌肉束两端的筋腱固定在不锈钢支架上, 使肌肉束维持正常长度。

将固定有肌肉束的不锈钢支架置于带盖离心管内, 加入 15 ml 预热的孵育介质, 41.5℃ 预孵育, 孵育介质为含有 5.5 mmol·L⁻¹ 蔗糖的 Krebs-Henseleit 缓冲液 (pH 7.4), 孵育前将孵育介质用 95% O₂、5% CO₂ 混合气体饱和, 孵育过程中每 30 min 充气 1 次, 预孵育 20 min 后, 将骨骼肌转移至新的离心管中, 重新准确加入 15 ml 预热的孵育介质, 左右两侧骨骼肌组成配对组, 其中 8 只鸡用于高温试验, 左右两侧骨骼肌分别在 41.5℃ 和 44.5℃ 条件下孵育 2 h, 另外 8 只鸡用于氧化应激的研究, 左侧为对照组, 右侧孵育介质中加入 0.3 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚, 41.5℃ 孵育 2 h, 结束后将孵育肌肉液氮冷冻保存, 用于测定线粒体 H₂O₂ 产生量、钙泵活性、肌肉乳酸和丙二醛 (MDA) 含量, 取 10 ml 培养介质 -20℃ 保存, 用于测定肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 酶活性。

1.2 骨骼肌线粒体的分离

参考 Thakar 等^[15]的方法, 取 0.1 g 骨骼肌, 加入

含 0.001 mol·L⁻¹ ATP、1% BSA 和 0.1 mg·ml⁻¹ Nagarse 酶的预冷的分离介质 1 ml, 剪碎后 4℃ 放置 5 min, 使用 1 ml 手动玻璃匀浆管匀浆, 匀浆液在冰上孵育 5 min, 轻轻搅动, 再加入 1 ml 含 0.001 mol·L⁻¹ ATP、1% BSA 的预冷的分离介质 (不含 Nagarse 酶), 再次匀浆, 匀浆液经低温离心机 480×g 离心 10 min, 转移上清液, 8 700×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×g 离心 10 min, 取上清液 8 700×g 离心 10 min, 得到沉淀物, 加入 800 μl 保存液, 使用移液器吹打均匀, 即为线粒体悬浮液, 4℃ 冰箱保存, 2 h 内测定 H₂O₂ 产量、钙泵活性, 线粒体悬浮液蛋白含量使用考马斯亮蓝法测定。

分离液组成: 0.1 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.005 mol·L⁻¹ MgCl₂, 0.01 mol·L⁻¹ EDTA, 0.18 mol·L⁻¹ KCl, pH 7.4; 保存液组成: 0.3 mol·L⁻¹ 甘露醇, 0.01 mol·L⁻¹ KCl, 0.01 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4; 其中 ATP 由 Amresco 公司生产, Nagarse 酶和 BSA 为 Sigma 公司产品, 其它常规试剂购自北京试剂公司。

1.3 骨骼肌线粒体 H₂O₂ 产生量的测定

参考 Garait 等^[16]测定线粒体 H₂O₂ 的方法并作适当修改。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 H₂O₂ 标准液, 100 μl 1 200 U·ml⁻¹ 的 SOD 酶溶液, 100 μl 180 U·ml⁻¹ 的 HRP 酶溶液, 100 μl 15 mmol·L⁻¹ HVA, 混匀后加入 100 μl 300 mmol·L⁻¹ 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℃ 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 H₂O₂ 产生量。

测定缓冲液组成为: 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 145 mmol·L⁻¹ KCl, 30 mmol·L⁻¹ HEPES, 15 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.1 mmol·L⁻¹ EGTA, pH 7.4。

1.4 骨骼肌线粒体钙泵 (Ca²⁺-ATPase) 活性的测定

参考 Anand^[17]的方法, 分别测定线粒体 Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase 和 Mg²⁺-ATPase 的活性, 两者之差为 Ca²⁺-ATPase 的活性。取 0.8 ml 缓冲液, 加入 50 μl 线粒体悬浮液, 37℃ 预温 3 min, 加入 30 μl 15 mmol·L⁻¹ 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℃ 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 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}\cdot\text{h}^{-1}$ 为单位计算酶活性。

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 缓冲液组成:imidazole-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4, KCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgCl_2 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCl_2 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg^{2+} -ATPase 缓冲液组成:imidazole-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4; KCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgCl_2 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EGTA 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.5 骨骼肌中乳酸、MDA 含量,培养介质中 CK、LDH 活性的测定

使用南京建成生物工程研究所生产的相关试剂盒测定。

1.6 统计与分析

使用 SAS 软件中 univariate 程序分别对两组试验数据进行配对 Student's Test 检验。

2 结果与分析

2.1 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体 ROS 产生及脂质氧化的影响

由表 1 可见,升高孵育温度增加线粒体 H_2O_2 的产生量 ($P<0.0001$),提高幅度达 24.6%,导致肌肉内的脂质过氧化,提高肌肉中丙二醛 (MDA) 的含量 ($P=0.0368$)。邻苯三酚同样升高线粒体 H_2O_2 的产生量 13.8% ($P=0.0005$),提高肌肉中 MDA 的含量 ($P<0.0001$)。

表 1 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体 H_2O_2 产生及脂质氧化的影响

Table 1 Effect of high incubation temperature and pyrogallol on mitochondrial H_2O_2 production and MDA content of broiler muscle incubated *in vitro* (n=8)

| | H_2O_2 产生量 H_2O_2 production ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}\cdot\text{min}^{-1}$) | | | MDA 含量 MDA content ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ wet weight}$) | | |
|---|--|-------------------------|----------------|--|-------------------------|----------------|
| | 样本均值 Sample mean | 差数均值 Difference mean | P 值 P value | 样本均值 Sample mean | 差数均值 Difference mean | P 值 P value |
| 温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$) | | | | | | |
| 41.5 | 2.07±0.25 | | | 17.04±6.82 | | |
| 44.5 | 2.65±0.26 | 0.58±0.09 | <0.0001 | 19.90±6.92 | 2.86±3.14 | 0.0368 |
| 邻苯三酚 Pyrogallol ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) | | | | | | |
| 0 | 1.96±0.12 | | | 16.17±5.53 | | |
| 0.3 | 2.25±0.19 | 0.29±0.14 | 0.0005 | 26.49±6.34 | 10.33±3.02 | <0.0001 |

2.2 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体钙泵及乳酸含量的影响

由表 2 可见,升高体外孵育温度抑制线粒体钙泵活性 ($P=0.0001$),使钙泵活性下降 19.60%,并显著升高肌肉中乳酸含量 ($P<0.0001$)。邻苯三酚同样抑制钙泵活性 ($P<0.0001$),使钙泵活性降低 13.70%,并显著增加肌肉中乳酸含量 ($P<0.0001$)。

2.3 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌中 LDH 和 CK 流失量的影响

由表 3 可见,升高体外孵育温度增加孵育介质中 LDH 和 CK 酶活性 ($P=0.0009$, $P=0.0114$),邻苯三酚同样增加孵育介质中 LDH 和 CK 酶活性 ($P=0.0459$, $P=0.0232$),邻苯三酚升高孵育介质中 LDH 和 CK 酶活性的幅度小于孵育温度的影响。

表 2 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体钙泵活性及乳酸含量的影响

Table 2 Effect of high incubation temperature and pyrogallol on mitochondrial Ca^{2+} -ATPase activity and lactate content of broiler muscle incubated *in vitro* (n=8)

| | 钙泵活性 Ca^{2+} -ATPase activity ($\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}\cdot\text{h}^{-1}$) | | | 乳酸含量 Lactate content ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ wet weight}$) | | |
|---|---|-------------------------|----------------|--|-------------------------|----------------|
| | 样本均值 Sample mean | 差数均值 Difference mean | P 值 P value | 样本均值 Sample mean | 差数均值 Difference mean | P 值 P value |
| 温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$) | | | | | | |
| 41.5 | 12.38±2.01 | | | 17.49±5.71 | | |
| 44.5 | 10.17±1.92 | 2.20±0.80 | 0.0001 | 23.26±4.60 | 5.81±1.03 | <0.0001 |
| 邻苯三酚 Pyrogallol ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) | | | | | | |
| 0 | 11.83±1.41 | | | 17.03±5.51 | | |
| 0.3 | 8.98±1.90 | 2.85±1.00 | <0.0001 | 19.62±2.64 | 2.59±0.80 | <0.0001 |

表 3 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌中 LDH 和 CK 流失量的影响

Table 3 Effect of high incubation temperature and pyrogallol on loss LDH and CK from broiler muscle incubated *in vitro* (n=8)

| | 乳酸脱氢酶(LDH activity) IU·g ⁻¹ wet weight | | | 肌酸激酶(CK activity) IU·g ⁻¹ wet weight | | |
|---|---|-----------------|---------|---|-----------------|---------|
| | 样本均值 | 差数均值 | P 值 | 样本均值 | 差数均值 | P 值 |
| | Sample mean | Difference mean | P value | Sample mean | Difference mean | P value |
| 温度 Temperature (°C) | | | | | | |
| 41.5 | 15.01±5.41 | | | 19.90±13.98 | | |
| 44.5 | 28.17±8.13 | 13.2±6.75 | 0.0009 | 45.96±25.11 | 26.06±21.67 | 0.0114 |
| 邻苯三酚 Pyrogallol (mmol·L ⁻¹) | | | | | | |
| 0 | 16.14±6.34 | | | 18.64±14.54 | | |
| 0.3 | 19.43±7.56 | 3.29±3.84 | 0.0459 | 36.08±23.44 | 17.45±17.05 | 0.0232 |

3 讨论

3.1 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体 ROS 产生的影响

本试验测定线粒体 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。Iqbal 等^[18]研究发现, 测定缓冲液中加入 SOD 酶, 可使 H₂O₂ 的产生量增加 10% 左右, 推测是由超氧阴离子自由基歧化为 H₂O₂ 所致。因此本试验测定的线粒体 H₂O₂ 产生量反映了线粒体 ROS 产生量的变化。邻苯三酚很易发生自氧化作用, 在自氧化过程中可产生超氧阴离子自由基、半醌自由基等中间产物^[19], 因此广泛用于超氧化物歧化酶 (SOD) 活力测定和药物抗氧化活性研究^[20,21]。预试验发现, 0.3 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚在骨骼肌孵育的 2 h 内可持续产生超氧阴离子自由基。

急性高温应激显著升高肉鸡骨骼肌线粒体活性氧 (ROS) 产生量^[3,4], 导致肉鸡氧化应激^[5]。Zuo 等^[22]在体外孵育大鼠横膈肌研究中发现, 提高孵育温度可显著增加横膈肌细胞内外 ROS 的产生。Abele 等^[23]报道, 泥蛤线粒体随孵育温度升高, ROS 产生量呈显著上升趋势。本试验发现升高孵育温度, 肉鸡骨骼肌线粒体 H₂O₂ 产生量升高, 与上述文献报道一致。ROS 同样影响线粒体的功能, 导致线粒体 ROS 产生量进一步升高, Tonkonogi 等^[24]报道, 人骨骼肌线粒体暴露于 ROS 可降低 3 态耗氧量, 升高 4 态耗氧量, P/O 显著降低。Jou 等^[25]利用聚焦显微镜荧光成像技术, 发现培养介质中加入 H₂O₂ 使鼠脑星细胞线粒体 ROS 产生量显著升高, 表明氧化应激影响线粒体的功能, 进一步加重线粒体 ROS 的产生量。

3.2 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌线粒体钙泵及乳酸含量的影响

体外研究证实, ROS 可抑制膜上钙泵的活性^[26,27]。Ahuja 等^[7]认为 ROS 抑制钙泵活性可能存在以下 4 种机制: (1) ROS 直接氧化酶蛋白的巯基; (2) ROS 通过膜脂质过氧化间接氧化酶蛋白; (3) ROS 通过膜脂质过氧化影响膜结构, 间接影响酶的活性; (4) ROS 氧化酶蛋白, 导致蛋白肽链断裂, 抑制酶的活性。本试验发现高温和邻苯三酚显著抑制线粒体钙泵活性, 与增加肉鸡骨骼肌线粒体 ROS 产生量的结果相一致。

体外研究表明, ROS 除抑制钙泵活性外, 还可通过影响膜上离子通道导致细胞内钙离子超载^[28,29]。Wang 等^[30]报道, H₂O₂ 促进胞外钙离子通过细胞膜上的钠通道和钙通道进入胞内, 导致神经细胞内钙离子浓度升高。而细胞内钙离子浓度升高将激活 ATP 酶, 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^[31], 导致糖酵解产物乳酸在肌肉中积累^[11,12,32]。本试验发现升高孵育温度及邻苯三酚均提高肌肉中乳酸含量, 表明高温影响骨骼肌乳酸产生量与高温诱导氧化应激有关。

3.3 高温及邻苯三酚对体外孵育肉鸡骨骼肌中 LDH 和 CK 流失量的影响

LDH 和 CK 主要存在于骨骼肌中, 血液和孵育液中 LDH 和 CK 酶活性升高表明肌纤维膜完整性受损^[33,34]。本试验发现高温及邻苯三酚均显著升高孵育液中该酶的活性, 表明高温损伤肌纤维膜的完整性与氧化应激有关。Sandercick 等^[35]的研究表明, 体外孵育肉鸡骨骼肌, 在孵育液中添加特异性钙离子载体 A23187, 显著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。其它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^[33,34]。由此推测高温可能通过提高 ROS 产生量, 调控肌纤维钙信号, 影响肌纤维膜的完整性。高温和邻苯三酚抑

制线粒体钙泵活性、提高肌肉乳酸含量的研究结果也支持这一推测。

4 结论

高温增加肉鸡骨骼肌线粒体 ROS 产量, 抑制钙泵活性, 增加骨骼肌中乳酸含量, 并损伤肌纤维膜完整性, 模拟氧化应激产生相似影响。表明高温影响线粒体钙离子转移系统功能、增加乳酸浓度、损伤肌纤维膜完整性与氧化应激有关。

References

- [1] Northcutt J K, Foegeding E A, Edens F W. Water-holding properties of thermally preconditioned chicken breast and leg meat. *Poultry Science*, 1994, 73: 308-316.
- [2] Mckee S R, Sams A R. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poultry Science*, 1997, 76: 1616-1620.
- [3] Mujahid A, Yoshiki Y, Akiba Y, Toyomizu M. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science*, 2005, 84: 307-314.
- [4] Mujahid A, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poultry Science*, 2007, 86: 364-371.
- [5] Lin H, Eddy D, Johan B. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2006, 144: 11-17.
- [6] Kourie J I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology*, 1998, 275: 1-24.
- [7] Ahuja R P, Borchman D, Dean W L, Paterson C A, Zeng J, Zhang Z. Effect of Oxidation on Ca^{2+} -ATPase Activity and Membrane Lipids in Lens Epithelial Microsomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 27: 177-185.
- [8] 杨志伟, 聂玉生, 杨福愉. 超氧阴离子对心肌细胞 Ca^{2+} 平衡及硒的保护作用. *生物化学杂志*, 1994, 10: 196-201.
Yang Z W, Nie Y S, Yang F Y. Change of Ca^{2+} homeostasis in cardiac myocytes caused by O_2^- and protective of Se. *Chinese Biochemical Journal*, 1994, 10: 196-201. (in Chinese)
- [9] Bielefeldt K, Whiteis C A, Sharma R V, Abboud F M, Conklin J L. Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*, 1997, 272: 1439-1450.
- [10] 廖钢陵, 李 芸, 俞志宏, 刘 旭, 吴元德. 超氧阴离子自由基对大鼠肝卵圆细胞内自由钙浓度的影响. *基础医学与临床*, 2000, 20: 367-369.
Liao G L, Li Y, Yu Z H, Liu X, Wu Y D. Effect of superoxide anion on intracellular free calcium concentration in rat liver oval cells. *Basic Medical Sciences and Clinic*, 2000, 20: 367-369. (in Chinese)
- [11] Block B A. Thermogenesis in muscle. *Annual Review of Physiology*, 1994, 56: 535-577.
- [12] Imaeda N. Characterization of lactic acid formation and adenosine triphosphate consumption in calcium-loaded erythrocytes of broiler chickens. *Poultry Science*, 2000, 79: 1543-1547.
- [13] Warriss P D, Brown S N. The relationship between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. *Meat Science*, 1987, 20: 65-74.
- [14] McKee S R, Sams A R. Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale exudative turkey meat characteristics. *Poultry Science*, 1998, 77: 169-174.
- [15] Thakar J H, Ashmore C R. An improved method for isolation of mitochondria from chick breast muscle using nargarse. *Analytical Biochemistry*, 1975, 69: 545-551.
- [16] Garait B, Couturiera K, Servaisb S, Letexierb D, Perrinb D, Batandiera C, Rouanetb J L, Sibilleb B, Reyb B, Levervea X, Faviera R. Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H_2O_2 production. *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, 39: 1249-1261.
- [17] Anand M B. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activities of heart sarcolemma microsomes and mitochondria. *Journal of Biochemical*, 1977, 82: 1731-1739.
- [18] Iqbal M, Cawthon D, Wideman R F, Bottje J, Bottje W G. Lung mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome. I. Site-specific defects in the electron transport chain. *Poultry Science*, 2001, 80: 485-495.
- [19] 高若梅, 邹 洪, 袁倬斌. 用电化学方法研究邻苯三酚的自氧化机理. *化学分析*, 1997, 25: 297-300.
Gao R M, Zou H, Yuan Z B. Study on the auto-oxidation of pyrogallol by electrochemistry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 25: 297-300. (in Chinese)
- [20] Olinescu R M, Kummerow F A. Fibrinogen is an efficient antioxidant. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, 12: 162-169.
- [21] Mayhan W G, Sharpe G M. Generation of superoxide anion impairs histamine-induced increases in macromolecular efflux. *Microvascular Research*, 2001, 61: 275-281.
- [22] Zuo L, Christofi F L, Wright V P, Liu Y, Merola A J, Berliner L J, Clanton T L. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen

- species produced during heat stress in diaphragm muscle. *American Journal Physiology*, 2000, 279: 1058-1066.
- [23] Abele D, Heise K, Portner H O, Puntarulo S. Temperature dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205: 1831-1841.
- [24] Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, Sahlin K. Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *Journal of Physiology*, 2000, 528: 379-388.
- [25] Jou M J, Peng T I, Reiter R J, Jou S B, Wu H Y, Wen S T. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *Journal of Pineal Research*, 2004, 37: 55-70.
- [26] Scherer N M, Deamer D W. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphydryl groups in the Ca^{2+} -ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 246: 589-601.
- [27] Karen M, Lounsbury H Q, Ziegelstein R C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 28: 1362-1369.
- [28] Favero T G, Zable A C, Abramson J J. Hydrogen peroxide stimulates the Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal Biological Chemistry*, 1995, 270: 25557-25563.
- [29] Oba T, Murayama T, Ogawa Y. Redox states of type I ryanodine receptor alter Ca^{2+} release channel response to modulators. *American Journal Physiology*, 2002, 282: C684-C692.
- [30] Wang H, Joseph J A. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC_{12} cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 28: 1222-1231.
- [31] Hardie D G. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 2003, 144: 5179-5183.
- [32] Reiner G, Hartmann J, Dzapo V. Skeletal muscle sarcoplasmic calcium regulation and sudden death syndrome in chickens. *British Poultry Science*, 1995, 36: 667-675.
- [33] Sandercock D A, Mitchell M A. The Role of sodium ions in the pathogenesis of skeletal muscle damage in broiler chickens. *Poultry Science*, 2004, 83: 701-706.
- [34] Mitchell M A, Sandercock, D A, Hunter R R, Carlisle A J. Skeletal muscle damage following halothane anaesthesia in the domestic fowl: plasma biochemical responses. *Research in Veterinary Science*, 1999, 67: 59-64.
- [35] Sandercock D A, Mitchell M A. Myopathy in broiler chickens: A role for Ca^{2+} -activated phospholipase A_2 ? *Poultry Science*, 2003, 82: 1307-1312.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)