

密级：

论文编号：

中国农业科学院 博士学位论文

肉仔鸡氧化应激模型的研究

Study of Oxidative Stress Model in Broiler Chicks

博 士 研 究 生：武书庚

指 导 教 师：齐广海 研究员

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：动物营养与饲料科学

研 究 方 向：家禽应激与营养

培 养 单 位：研究生院

饲料研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural
Sciences

**Dissertation Submitted for
Doctor of Philosophy Degree**

**STUDY OF OXIDATIVE STRESS MODEL
IN BROILER CHICKS**

Ph.D. Candidate: Wu Shugeng

Supervisor: Professor Qi Guanghai

Major: Animal Nutrition and Feed Science

Specialty: Poultry Stress and Nutrition

Chinese Academy of Agricultural Sciences
June, 2007

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其它人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

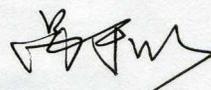
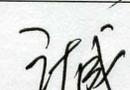
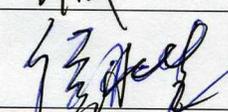
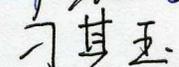
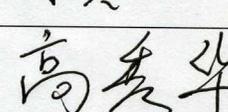
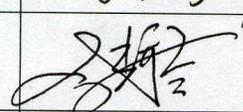
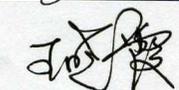
时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

中国农业科学院

博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		肉仔鸡氧化应激模型的研究				
论文作者		武书庚	专 业	动物营养 与饲料科	研究方向	动物营养调控
指导教师		齐广海		培养单位(研究所、中心)		饲料研究所
姓名		职称	硕(博) 导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	文 杰	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院北京畜 牧兽医研究所	动物营养	/
	佟建明	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院北京畜 牧兽医研究所	动物营养	/
	譙仕彦	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业大学	动物营养	/
答 辩 主 席	芮于明	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业大学	动物营养	
答 辩 委 员	计 成	教 授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业大学	动物营养	
	候水生	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院北京畜 牧兽医研究所	动物营养	
	刁其玉	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院饲料所	动物营养	
	高秀华	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院饲料所	动物营养	
	蔡辉益	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院饲料所	动物营养	
	王晓霞	教 授	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	北京农学院	动物营养	
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>		
会议记录(秘书)		张海军 博士				
论文答辩时间地点		2007年6月18日下午2:00, 饲料研究所三楼会议室				

摘 要

本文首先研究了激素处理（注射或口服）对肉仔鸡生产性能、消化能力、免疫功能和肉质的影响，建立了急性和慢性动物营养应激模型；研究了 DEX 对肌卫星细胞的影响，建立了细胞氧化应激模型；进一步研究了激素对卫星细胞内钙离子浓度的影响。研究表明，三种激素处理的应激模型均能引起肉仔鸡肉质、激素、细胞活性等的变化，产生氧化应激，激素可通过细胞内钙离子途径的转导引起肌肉细胞的代谢变化，从而影响肉质。本研究可为研究应激对肉仔鸡的影响及其机理提供方法学借鉴。现摘要如下：

1、急性氧化应激动物试验模型的研究

选择 21d 体重相近的健康肉仔鸡公雏 210 只，随机分成 7 组，每组 3 个重复，每重复 10 只。处理分别为 C(对照组)、S（生理盐水注射 1 mL/只）、S+R(S+Ru486)、D(6 mg/kg BW)、D+R (D+Ru486)、A(6 IU/kg BW)、A+R (A+Ru486)，Ru486 剂量为 50 mg/kg BW；40d 时重复上述过程。结果表明：

(1) 注射 ACTH、DEX 和 PSS 均显著影响了肉品品质（pH 值降低、滴水损失和肉品剪切强度增加），同时注射 Ru486 后肉品质的不正常状况得到了缓解，但均未恢复到未注射状态；腿肌的 pH 值、滴水损失、剪切强度均显著高于胸肌 ($P<0.01$)；29d 屠宰的肉品 pH 值、滴水损失均显著高于 40d 屠宰 ($P<0.01$)；40d 屠宰鸡肌肉的剪切强度显著高于 29d ($P<0.01$)；随着处理后屠宰时间的延长，肌肉 pH 值降低、滴水损失和剪切强度增加趋势明显。这些结果表明，40d 肉仔鸡，DXM (6 mg/kg BW) 或 ACTH (6 IU/kg BW) 注射处理后 8h，可用于模拟研究氧化应激对肉质的影响。

(2) 注射 DEX、ACTH 和 PSS 后组织（胸肌、腿肌、肝脏和心肌）匀浆中蛋白含量、MDA 显著或极显著增加，GSH-Px 和 SOD 显著或极显著降低；同时注射 Ru486 后这种组织的不正常氧化还原状态得到缓解，GSH-Px 和 SOD 显著高于、蛋白含量和 MDA 显著低于仅注射 DEX、ACTH 和生理盐水组，但仍未恢复到对照组水平。注射处理后 4h、8h、12h 和 24h 屠宰鸡氧化还原状态的测定结果表明，不同组织对同一指标的反应有别，以 8h~12h 为合适的激素处理后的作用时间。肌肉注射 DEX 和 ACTH 可用于模拟动物的急性组织氧化应激状态。

(3) 注射 DEX 和 ACTH 后，与其它所有处理组相比，血液 TAOC、GSH-Px 和 SOD 均降到了最低，显著低于对照组 ($P<0.01$)，二者差异不显著 ($P>0.05$)；CAT、MDA、CK 和 AST 则升到了最高，显著高于对照组 ($P<0.01$)，两种处理差异不显著 ($P>0.05$)。同时相应注射 Ru486 后，血液 TAOC、GSH-Px 和 SOD 升高，血液 CAT、MDA、CK 和 AST 降低，与相应的不注射组均差异显著 ($P<0.01$)，但仍高 (TAOC、MDA、CK 和 AST) 或低于 (GSH-Px、SOD、CAT) 对照组 ($P<0.01$)。处理后，随激素作用时间 (4h、8h、12h 和 24h) 的延长，TAOC 逐渐降低，8-12h 无差异；GSH-Px 先降低再升高，8~12h 最低，无差异；SOD 逐渐降低，4~8h 无差异；CAT、MDA、CK 先升高再降低，8h 最高；AST 在 12~24h 达到最高。与 29d 相比，40d 的 TAOC、GSH-Px、SOD、CAT 和 CK 均有下降趋势，MDA 和 AST 升高；但只有 CAT 显著降低，MDA 显著升高 ($P<0.05$)，其余指标均差异不显著 ($P>0.05$)。注射 ACTH 和 DEX 可引起动物血液有关生化指标的激烈变化，引起氧化应激。这些结果表明，40d 肉仔鸡，DEX (6 mg/kg BW) 或 ACTH (6 IU/kg

BW) 注射处理后 8h 后, 可用于开展有关氧化应激的试验研究。

2、慢性氧化应激动物试验模型的研究

选择 320 只 21d AA 肉仔鸡随机分为 4 个处理组, 每组设 8 个重复, 每个重复 10 只试鸡。I、II、III 和 IV 组分别饮用加有 0、10、20 和 30 mg/L 的的松水, 自由饮水和采食, 试验期 10d。结果表明:

(1) 的松水对肉鸡 FC、ADG、F/G 均无显著影响 ($P>0.05$); 血液生化分析表明, 的松水对血液 HDL、LDL、CHOL、TG、肌酐含量无显著影响 ($P>0.05$), 但 20 和 30mg/L 的松水 10d 肉鸡血浆 TP 含量 ($P<0.05$) 和尿酸含量 ($P<0.01$) 显著升高, 30mg/L 的松水 1d 血浆 AST 活性显著升高 ($P<0.05$)。20 和 30mg/L 的松水组, 显著降低了 3~4d 日粮 CP、EE 表观代谢率, 显著降低了 1~2、3~4d 的 Ash 的表观代谢率 ($P<0.05$)。结果表明, 20 和 30mg/L 的松水, 在饮水的第 3~4d 即影响到了日粮 CP、EE 和灰分的消化率, 10d 时血液 TP、尿酸含量升高。

(2) 的松水极显著地 ($P<0.01$) 增加了胸肌、腿肌 6d 和 10d 的滴水损失; 显著升高了胸肌 pH1 ($P<0.05$), 对腿肌无显著影响; pH24 胸肌除 3d 第 II 组显著增加外 ($P<0.05$), 其他均无明显变化 ($P>0.05$), 但腿肌有增加的趋势 ($P>0.05$); 的松水对胸肌、腿肌的相对重量无显著影响 ($P>0.05$); 对胸肌含水量亦无显著影响 ($P>0.05$), 胸肌蛋白有降低的趋势, 显著降低了 2、6d 胸肌脂肪含量 ($P<0.05$), 的松水显著降低了腿肌 6d 第 III 组水分含量 ($P<0.05$), 极显著降低了 6d 第 II、III 组蛋白的含量 ($P<0.01$), 显著降低了 2d 第 III 组和 6d II、III 组脂肪含量 ($P<0.05$)。这表明的松水对肌肉发育的影响不显著, 但显著影响肌肉的营养组成。

(3) 处理 3d, 第 IV 组鸡皮质酮含量显著高于对照组 ($P<0.05$); 血糖浓度在处理 1-2d 明显升高, 处理 2d 显著 ($P<0.05$) 高于对照组; T_3 先降低后升高, 1~2d 均极显著高于 ($P<0.01$) 对照组, 第 3d T_4 极显著 ($P<0.01$) 高于对照组; 对应激氧化状态的影响为, MDA 在 1~3d 和 6d 时均显著 ($P<0.05$) 高于对照组, SOD 第 1~3d 活性降低, GSH-Px 活性处理后 1~3d 均显著 ($P<0.05$) 低于对照组, TAOC 第 2d 显著降低 ($P<0.05$), CK 在第 6d 时显著升高 ($P<0.05$)。这表明 30mg/L 的松水 3d 成功地在肉鸡体内诱发了氧化应激。

(4) 整个试验期, 的松水对心脏、肝脏、胸腺、法氏囊的相对重量均无明显影响 ($P>0.05$); 对脾脏相对重量的影响, 除第 2d 显著差异外 ($P<0.05$), 对其他时间均无显著影响 ($P>0.05$); 的松水对腹脂和肝脏含水量均无显著影响 ($P>0.05$), 肝脏脂肪含量在试验处理 10d 左右极显著增加 ($P<0.01$); 的松水显著增加了试验处理 2~3d 心脏 MDA 含量, 降低了第 10d MDA 含量 ($P<0.05$), 极显著增加了 ($P<0.01$) 处理第 1d 后 GSH-Px 含量, 降低了处理 1d 后 SOD 含量 ($P<0.05$); 的松水显著增加了试验处理 2~3d 肝脏 MDA 含量, 处理 10d 时处理剂量最小的第 II 组 MDA 含量显著高于对照组, 对 GSH-PX、SOD 的含量的影响明显, 除处理第 6d 时显著高于对照组外, 在整个试验期内均显著低于对照组。这表明的松水对组织器官发育的影响较小, 而 1~3d 对心、肝脏的过氧化状态影响显著。

3、肌肉细胞氧化应激模型的研究

用显微镜 (观察细胞形态、活细胞个数、台盼蓝染色)、MTT 试验、NBT 还原试验、脂质过氧化等试验, 研究了不同浓度 DEX 对细胞活性的影响, 并用维生素 C (VC) 对此模型进行了

验证, 结果表明:

(1) 显微镜下可明显看出, 活性 SCs 随 DEX 浓度的增加而减少明显, DEX 浓度大于 0.625g/L, 几乎未见活的 SCs 存在; DEX 浓度小于 0.15625 g/L 则对 SCs 的影响较小, 腿肌 SCs 的抗 DEX 的能力较大。

(2) 随着 DEX 浓度的增加, 培养基中的活细胞个数显著减少, 台盼蓝染色率显著增加, 且两项指标均与 DEX 浓度呈一定的函数关系(活细胞数 ($Y, \times 10^4$) = $35.186e^{-0.7821X}$; 细胞蓝染率(死亡率, $Y, \%$) = $44.039X^{-0.3492}$, X 为 DEX 浓度 (g/L)。细胞培养液中添加 DEX 显著影响了胸肌和腿肌 SCs 的相对存活率, 随 DEX 浓度增加, 细胞存活率呈幂函数曲线降低(胸肌: $y=14.944X^{-0.6082}$; DEX+VC: $y=19.642X^{-0.4663}$; 腿肌: $y=17.091X^{-0.5193}$; DEX+VC: $y=40.418X^{-0.2536}$; 其中 X 为 DEX 剂量 (g/L)、 Y 为 SCs 相对成活率 (%))。

(3) DEX 处理增加了肌肉细胞的膜脂质过氧化作用, 使膜系统受到不同程度的过氧化损伤; 肌细胞 MDA 相对生成量 (Y) 与 DEX ($x, \text{g/L}$) 之间呈幂函数关系: 胸肌 SCs $Y=1.5723x^{0.0983}$; 腿肌 SCs $Y=1.3213x^{0.0789}$ 。随 DEX 浓度的增加 ($x, \text{g/L}$), 校正后的 NBT 被还原量 (Y , 吸光度值) 显著增加, 说明氧自由基量增加明显, 自由基随 DEX 浓度升高而升高, 二者呈幂函数关系(胸肌和腿肌分别为: $Y=0.8328x^{0.457}$ 和 $Y=0.3898x^{0.334}$)。

(4) 培养基中添加维生素 C 改善了肌肉细胞的存活率, 随 DEX 浓度增加, 维生素 C 的改善作用降低; 与胸肌相比, 腿肌 SCs 抵御 DEX 破坏作用的能力更加明显, 维生素 C 对腿肌 SCs 的改善作用优于胸肌 SCs; 培养基中添加不同浓度维生素 C 对细胞相对存活率的影响不同, 浓度越大对细胞存活率的改善作用越强, 维生素 C 浓度与细胞相对存活率呈明显的幂函数关系(VC: $Y=1.5451x^{0.1007}$; VC+DEX: $Y=1.3099x^{0.0685}$)。这表明通过向肌 SCs 培养基中添加不同浓度的 DEX 可以建立肌肉 SCs 的氧化应激模型, 并用于研究应激对肉质的影响机理、抗应激添加剂的作用机理及选择等。

4、DEX 对鸡胸、腿肌卫星细胞中 Ca^{2+} 影响

用 LEICA TCS SP2 SE 激光扫描共聚焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM 简称共聚焦显微镜) 和钙离子指示剂 Fluo-3/AM 标记技术测定了单个细胞内钙离子浓度在不同浓度 DEX 处理后细胞内的动态变化, 以便确定 DEX 能否激发钙离子信号转导系统, 结果表明: 用不同浓度 DEX 处理胸肌和腿肌 SCs, 细胞内游离钙离子浓度均有相应的变化, 随着 DEX 浓度的降低, 两种来源的 SCs 内钙离子浓度的最大值逐渐降低, 达到最大值需要的时间不断延长, 细胞内钙离子浓度恢复到静止状态需要的时间延长; 胸肌 SCs 对 DEX 处理的反应更为敏感; $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{mol/L}$ DEX 均能引起肌细胞内钙离子浓度增加; 细胞外 DEX 可以通过作用于肌肉细胞内钙离子信号转导系统, 而影响肌肉细胞代谢。

关键词: 肉仔鸡, 肌卫星细胞, 氧化应激模型, DEX, ACTH, Ru486, 可的松, Ca^{2+}

ABSTRACT

Two experiments were arranged to evaluate the effect of ACTH, DEX, Ru486 and cortisone on meat quality, performances, digestion and metabolism, immune function, total antioxidant status of broiler chickens firstly. Satellite Cells (SCs) from breast and thigh muscle of broilers were collected and cultured to evaluate the effect of DEX on SCs livability and Ca^{2+} content intracellular. Three kinds of oxidative stress model were evaluated in this study, which were: acute stress, ACTH and DEX injection; chronic stress: drink cortisone water and cell oxidative stress: DEX was added in culture medium of the SCs. The results indicate that all the three oxidative stress models can induce the change of meat quality, hormone, and SCs livability in broilers.

1 Study of acute oxidation stress model in broiler chicks

Abstract: The two-hundred and twenty Arbor Acres male broilers, 21 day-old, were used to study the effect of PSS (Physiological Saline Solution), DEX (Dexamethasone), ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone), and/or R (Ru486, Mifepristone) injection on meat quality. The treatment included: the control group, PSS (1 mL/head), PSS+R, DEX (6 mg/ kg BW), DEX+R, ACTH (6 IU/kg BW), or ACTH+R. Dosage of Ru486 (mifistone) was 50mg/kg BW. The treatments were repeated at 40d. The main results are shown as follows,

The meat qualities were influenced by the injection of ACTH, DEX, and PSS, which include pH value reduced, drip loss and shear strength raised. When Ru486 was injection at the same time, the abnormality of the meat quality was mitigated and did not recover to the quality of no injection. The pH value, drip loss and shear strength of thigh meat (LM) were all higher than that of the breast meat (BM, $P<0.01$). The pH value and drip loss of slaughter at 29-day-old were all higher than that of the 40d ($P<0.01$), shear strength were lower than that of the 40d ($P<0.01$). The pH value decreased, drip loss and shear strength increased as the time prolonged after injection.

The protein and MDA content of the homogenized tissues (BM, TM, liver and heart) increased significantly, GSH-Px and SOD decreased significantly after the injection of DEX and ACTH. The abnormalities of tissues were ameliorated when Ru486 was injected at the same time. As the prolonged of the time after hormone treatment, 4h, 8h, 12h and 24h, the redox status of the tissues were differenced from tissues. In conclusion, 8h-12h after the injection of ACTH and DEX should be the optimal time for oxidative stress.

The T-AOC, GSH-Px and SOD of blood of DEX and ACTH treatment were all reduced to the lowest, lower than the control group ($P<0.01$). The CAT, MDA, CK and AST of blood of DEX and ACTH treatment were raised to the highest level and higher than that of the control group ($P<0.01$). There were no significant difference between DEX and ACTH treatment on the seven determined parameters ($P>0.05$). The abnormal of blood biological value of the DEX and ACTH treatment were all rejuvenation ($P<0.01$) after Ru486 injection at the same time. But the value of T-AOC, MDA, CK and AST of the 3 Ru486 injection treatments were higher than that of the control group ($P<0.01$), and

GSH-Px, SOD, CAT of the 3 Ru486 injection treatments were lower than that of the control group ($P<0.01$). As the prolonged of the time after hormone treatment, 4h, 8h, 12h and 24h, blood T-AOC became lower and lower, there have no difference between the value of 8h and 12h ($P>0.05$). Blood GSH-Px became lower firstly, 8h and 12h were lower than 4 and 24h ($P<0.05$). Blood SOD became lower also, and the value of 4h and 8h were lower than that of 24h ($P<0.05$). Blood CAT, MDA, CK reach the highest level at 8h and then became lower. Blood AST rose to the theist at 12h and 24h. In conclusion, 8h after the injection of ACTH and DEX should be the optimal time for oxidation stress. Compared to 29d, T-AOC, GSH-Px, SOD, CAT and CK of 40d broiler were lower ($P>0.05$), MDA and AST were higher. CAT of 40d was lower and MDA was higher than 29d significantly ($P<0.05$). There were no deference between 40d and 29d for other parameters.

In conclusion, 40 day old birds, 8h after the injection of ACTH (6IU/kg BW) or DEX (6mg/kg BW) can be used to model the accurate oxidative stress.

2 Study of Chronic Oxidation Stress Model in Broiler Chicks

Abstract: The three-hundred and twenty Arbor Acres male broilers, 21 day-old, were used to study the effect of drinking cortisone water on meat quality. The birds were randomly divided into four groups by weights, with 8 replicates of each treatment. The treatment included: 0, 10, 20 and 30 mg/L cortisone water drinking (I, II, III and IV). Cortisone was applied to the birds via drinking water for 10 d. Feed and water were provided ad libitum. The main results are shown as follows,

Drinking cortisone water had little influence on weight gain, feed intake and feed efficiency (F/G) in broilers ($P>0.05$), the same results were observed in HDL, LDL, CHO, TG, GRE of blood ($P>0.05$). Compared with groups I, blood TP ($P<0.05$) and uric acid ($P<0.01$) of III and IV increased significantly at 10d, and blood AST groups IV increased at 1d ($P<0.05$). Compared with control groups, the apparent digestibility of protein and fat of groups III and IV decreased during 3-4d ($P<0.05$), and the apparent digestibility of crude ash of groups III and IV had decreased significantly during 1-2d and 3-4d ($P<0.05$). The results indicated that drink 20-30mg/L cortisone water can be used to simulate the chronic oxidative stress in broilers.

Cortisone water drinking had significantly increased meat drop loss of breast and thigh at 6d and 10d in broilers ($P<0.01$). pH_1 of breast meat was increased significantly of birds that dinked the cortisone water, but pH_1 of the thigh meat had little influenced. Cortisone water drinking had little increased pH_{24} of breast meat, excepted 3d ($P<0.05$), but pH_{24} of thigh meat increased for all the treatments in broilers ($P<0.05$). The relative weight, moisture and protein content of breast and thigh meat did not influenced by the cortisone water drinking ($P>0.05$). Compared with the control group, the lipid content of breast meat decreased significantly for all the cortisone treatments at 2d, 6d ($P<0.05$). Compared to the control group, the moisture of thigh meat of groups III decreased at 6d significantly ($P<0.05$), the protein content of thigh meat of group II and III decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the control group, the lipid content of thigh meat decreased significantly of group III at 2d, groups II and III at 6d ($P<0.05$). The results indicated that drinking cortisone water had little

influence on relative weight of meat, but the nutrients content of the meat were influenced significantly ($P < 0.05$).

Compared with control group, blood CS content of group IV increased significantly at 3d, blood GLU concentration increased significantly at 2d ($P < 0.05$). Compared with the control group, the blood T_3 and T_4 concentration of group IV increased obviously at 2d and 3d respectively ($P < 0.05$). Compared with contrast group, blood MDA content of group IV increased significantly at 1-3d and 6d respectively ($P < 0.05$), blood SOD and GSH-Px activity of group IV decreased significantly at 1d and 3d ($P < 0.05$), T-AOC activity of group IV decreased at 2d ($P < 0.05$), CK activity of group IV increased at 6d ($P < 0.05$). The results indicated that IV group had successfully induced oxidative stress.

The relative weights of heart, liver, thymus and bursa of Fabricius were not influenced by the cortisone water drinking ($P > 0.05$), but the relative weight of spleens was increased at 2d ($P < 0.05$). The abdominal fat and liver moisture did not influenced by the cortisone water drinking ($P > 0.05$) also. However, the lipid content of the liver was increased significantly at 10d of cortisone water drinking ($P < 0.01$). The MDA content of the heart was increased at 2-3d and decreased at 10d significantly ($P < 0.01$), the GSH-Px content was increased at 1d ($P < 0.01$), the SOD content decreased significantly at 1d ($P < 0.05$). The MDA content of the liver was increased at 2-3d significantly ($P < 0.01$), the GSH-Px and SOD activity was significantly decreased throughout the test period except 6d ($P < 0.01$). The results indicated that chronic oxidative stress had little influence on develop of the immune organs in broilers, but the peroxidative status of tissues were significantly Influenced.

3 Study of Oxidation Stress Model in satellite cells from Broiler Chicks

The effect of DEX on SCs morphology and number of living SCs was observed under microscope, detected by means of MTT assay, by nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test, and MDA detection. Then the oxidant model was verified by vitamin C addition. The main results are shown as follows,

With the increasing of DEX concentration in the medium, the lively SCs were decreased markedly, and when DEX concentration was higher than 0.625g/L in the medium, there few lively SCs were seen in the microscope. The numbers of lively SCs from thigh muscle were higher than that of SCs from breast muscle at the same DEX concentration.

With the increasing of DEX concentration in the medium, number of lively SCs decreased significantly and Trypan blue staining rate of SCs increased significantly. The function relation model between the two parameter should be: Y (numbers of lively SCs, $\times 10^4$) = $35.186e^{-0.7821X}$; Y (Trypan blue staining rate of SCs, mortality, %) = $44.039X^{-0.3492}$.

The relative livability of SCs from breast and thigh muscle was influenced by the added DEX in the medium significantly. The function relation model between DEX concentration (X , g/L) and relative livability of SCs (Y , %) should be: for BM, DEX: $y = 14.944X^{-0.6082}$; DEX+VC: $y = 19.642X^{-0.4663}$; for TM: DEX: $y = 17.091X^{-0.5193}$; DEX+VC: $y = 40.418X^{-0.2536}$.

Lipid peroxidation on the membrane of SCs was enhanced by the added DEX in the medium. The function relation model between DEX concentration (X , g/L) and relative MDA producing of SCs (Y , %)

should be: for BM: $Y=1.5723x^{0.0983}$; TM: $Y=1.3213x^{0.0789}$.

DEX in the medium accelerated the reduction of NBT; the rate of photochemical acceleration was connected with the concentration of DEX. With the increasing of DEX concentration in the medium, the rectified absorbency of NBT was increased markedly. The function relation model between DEX concentration (X, g/L) and rectified absorbency of NBT should be: for BM: $Y=0.8328x^{0.457}$; and for TM: $Y=0.3898x^{0.334}$.

The livability of SCs was improved since VC was added in the medium, and the improvement became lower as the increasing of DEX concentration. The function relation model between DEX concentration(X, g/L) and the livability of SCs (Y) should be: for VC: $Y=1.5451x^{0.1007}$; VC+DEX: $Y=1.3099x^{0.0685}$. In conclusion, we can establish the oxidant stress model through added DEX in the medium of SCs. This model would be used to develop additives to improve the meat quality.

4 Effect of DEX treatment on Ca^{2+} content in the satellite cell from broiler muscle

Abstract: The effect of glucocorticoid (GC) on Ca^{2+} content of satellite cells (SCs) from broiler muscle was determined to confirm if GC can activities Ca^{2+} signal transmit system in the muscle cells. The SCs were picked up from leg and breast muscle of day-old Abor Acres broilers respectively, and cultured in DMEM culture medium which content 20% FBS. After 2 days' cultured the SCs was marker with Fluo-3/AM. Using laser scanning confocal microscope (LEICA TCS SP2 SE) and highly sensitive Ca^{2+} fluorescent dye, Fluo-3/AM, we measured the kinetic changes of Ca^{2+} in single intact living SCs, before and after Dexamethasone (DEX) directly treatment. The results showed that:

Intracellular Ca^{2+} content reduced as DEX concentration reduced. The max value of intracellular Ca^{2+} content of SCs from breast muscle and thigh muscle was 144, 80, 63 and 66, 60, 48 for treatment 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} mol/L DEX respectively. The time consumed to reach the max value became longer as DEX concentration reduced, for treatment 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} mol/L DEX, SCs from breast muscle and thigh muscle was 59s, 130s, 158s and 80s, 98s, 216s respectively. The SCs need more time to go down to the stillness level DEX concentration reduced, for treatment 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} mol/L DEX, SCs from breast muscle and thigh muscle was 542s, 389s, 606s and 260s, 675s, 533s respectively. Compared to the SCs from leg muscle, the SCs from breast muscle were more sensitive to DEX treatment. DEX at 10^{-4} - 10^{-6} mol/L can enhance the intracellular Ca^{2+} content. These results indicate that extra cellular DEX can enhance intracellular Ca^{2+} content through activize Ca^{2+} signal transmit system in the muscle cells from broiler.

keywords: broiler, satellite cells, Oxidation Stress Model, DEX, ACTH, Ru486, cortisone, Ca^{2+}

目 录

摘 要	i
ABSTRACT	iv
缩略语对照表	xi
第一章 文献综述	1
1.1 应激与氧化应激	1
1.1.1 应激	1
1.1.2 氧化应激	6
1.2 肉质	7
1.2.1 pH值	7
1.2.2 颜色	8
1.2.3 滴水损失	8
1.2.4 剪切力	9
1.3 自由基与肉质	9
1.4 应激影响肉质的机理	10
1.4.1 应激对肉质的影响	10
1.4.2 应激影响肉品质量的机制	11
1.4.3 脂质过氧化与肉质	12
1.4.4 应激影响肉质的信号传导	12
1.5 应激的模拟	13
1.5.1 应激源	14
1.5.2 应激因子处理后动物的反应	15
1.5.3 应激反应模型的建立与敏感指标	16
1.5.4 应激时动物的生产性能与代谢	17
1.6 本研究的立项依据、技术路线和主要研究内容	17
第二章 急性氧化应激动物试验模型的研究	19
2.1 材料与方法	19
2.2 结果与分析	21
2.2.1 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉质影响的研究	21
2.2.2 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉品生化指标影响的研究	24

2.2.3 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡血液生化指标影响的研究.....	33
2.3 讨论.....	39
2.3.1 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉质的影响.....	39
2.3.2 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡血液生化指标的影响.....	40
2.3.3 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉质生化指标的影响.....	40
2.4 小结.....	41
2.4.1 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉质的影响.....	41
2.4.2 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡肉品生化指标的影响.....	41
2.4.3 肌肉注射DEX和ACTH对肉仔鸡血液生化指标的影响.....	42
2.4.4 结论.....	42
第三章 慢性氧化应激动物试验模型的研究.....	43
3.1 材料与方法.....	43
3.2 结果与分析.....	45
3.2.1 可的松饮水对肉仔鸡生产性能和消化代谢的影响.....	45
3.2.2 可的松饮水对肉仔鸡肌肉发育及肉质的影响.....	48
3.2.3 可的松饮水对肉仔鸡血液激素及过氧化状态的影响.....	52
3.2.4 可的松饮水对组织过氧化状态和免疫器官生长发育的影响.....	55
3.3 讨论.....	59
3.3.1 可的松饮水对肉仔鸡生产性能和消化代谢的影响.....	59
3.3.2 可的松饮水对肉仔鸡肌肉发育及肉质的影响.....	60
3.3.3 可的松饮水对肉鸡血清激素和血浆过氧化状态的影响.....	61
3.3.4 可的松饮水组织过氧化状态和免疫器官生长发育的影响.....	64
3.4 小结.....	65
第四章 肌肉细胞氧化应激试验模型的研究.....	66
4.1 材料与方法.....	66
4.2 结果与分析.....	69
4.3 讨论.....	74
4.4 小结.....	75
第五章 DEX对鸡胸、腿肌卫星细胞中Ca ²⁺ 的影响.....	76
5.1 材料与方法.....	76
5.2 结果与分析.....	77

5.3 讨论.....	79
5.4 小结.....	80
第六章 主要结论和有待进一步研究的问题	81
6.1 主要结论.....	81
6.2 研究的创新点.....	81
6.3 有待进一步研究的问题.....	81
参考文献	82
附录 1 屠宰致晕方法对肉仔鸡肉质的影响	94
1.1 材料和方法.....	95
1.2 结果与分析.....	96
1.3 小结	99
附录 2 肉仔鸡腿、胸肌卫星细胞的培养及其表型	100
2.1 材料与方法.....	101
2.2 结果与分析.....	104
2.3 讨论	106
2.4 小结	108
附录 3 免疫组织化学鉴定步骤.....	109
致 谢	110
作 者 简 介	111

缩略语对照表

ACTH	Adrenocorticotropic Hormone	促肾上腺皮质激素
AST	Aspartate Transaminase	天冬氨酸转氨酶
AT	Atmosphere Temperature	空气温度
BUN	Blood Urea Nitrogen	血液尿素氮
CAT	Catalase	过氧化氢酶
CDP	Calcium Dependent Protein	钙依赖蛋白酶
CHOL	Cholesterol	胆固醇
CK	Creatine Kinase	肌酸激酶
Cort	Corticosterone	皮质酮
Cort	Cortisol	皮质醇
DEX	Dexamethasone	地塞米松
DFD	Dark Firm Dry	色泽暗褐, 质地坚硬, 表面干燥 (肉)
ET	Efficient Temperature	有效温度
FR	Free Radical	自由基
GAS	General Adaptation Syndrome	全身适应综合症
GC	Glucocorticoid	糖皮质激素
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
GSH-Px	Glutathione Peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HDL	High Density Lipoprotein	高密度脂蛋白
H/L	Heterophilic Granulocyte/Lymphocyte	异嗜性粒细胞/淋巴细胞
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LDL	Low Density Lipoprotein	低密度脂蛋白
LPO	Lipid Peroxidation	脂质过氧化物
MB	Myoglobin	肌红蛋白
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
ORP	Oxidation Reduction Potential	氧化反应电位
pH	Hydrogen ion exponent	pH 值
PSE	Pale, Soft, Exudative	苍白、柔软、渗出性 (肉)
PSS	Physiological Saline Solution	生理盐水
RH	Relative Humidity	相对湿度
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
Ru486	Mifepristone	米非司酮
SCs	Satellite Cells	卫星细胞
SOD	Super Oxide Dismutase	超氧化物歧化酶
T ₃	Triiodothyronine	三碘甲状腺原氨酸
T ₄	Tetraiodothyronine	四碘甲状腺原氨酸
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	硫代巴比妥酸反应物
TG	Triglyceride	甘油三酯
TP	Serum Total Protein	血清总蛋白
WBC	Water Binding Capacity	(肉) 系水力

第一章 文献综述

肉品质量包括品质和安全两方面，肉的品质一般指肉的内质质量，包括营养特性、保健功能、感官特性（色泽、风味、多汁性等）和经济特性；而肉的安全是指来源于健康动物、无违禁药物和抗生素等残留的肉。动物以自身遗传为基础，通过摄入人类不能很好利用的资源（营养素），经生长发育，为人类生产优质食品原料。长期以来，国内外畜牧科技工作者的研究重点是提高畜禽生长速度和改善饲料效率，对肉品质的研究多局限于畜牧学指标的测定及肉品质性状定量评定体系和检测方法建立等。随着规模化、集约化养殖业的发展，动物肉质愈来愈受到人们的重视，为适应现代化养殖业发展的需要，动物的高度培育造成现代动物品种适应外界环境的能力较差，抗应激能力较弱，容易引起肉质下降，影响其营养和食用价值，甚至出现劣质肉（PSE、DFD肉等）。研究应激对肉品质的影响，及应激的传导的神经内分泌通路，能更有利于改善应激对动物生产性能的影响和研究新型饲料添加剂，改善畜禽产品品质。

肌肉占人体重量的40%-50%，其理化特性的改变可显著影响整个机体的代谢状况。研究表明许多代谢病（包括肥胖、糖尿病、高血压、心脏病等）均与肌肉纤维类型和脂肪沉积的变化有关。人类所遭受的环境应激（心理、营养等）是导致这些疾病的主要因素之一，而营养和环境又是经过哪些途径造成这些代谢障碍，是否可能通过阻断或活化这些途径中的某些关键位点，达到控制或治疗这些疾病的目的？畜禽肉品质在很大程度上决定于屠宰前动物本身的理化特性，宰前应激能影响屠宰后肉质，因此在研究应激对肉理化特性的影响，应激信号的传导上，人类医学生理学与本项目的研究有相同之处，可互为借鉴。

1.1 应激与氧化应激

应激是机体对外界或内部的各种刺激所产生的非特异性应答反应的综合。涉及神经、内分泌、免疫、氧化与抗氧化体系稳态的保持等系列活动。Dickson（1987）认为肾上腺皮质激素在机体的应激适应过程中起主导作用，该过程途径如下：刺激-受体器官-中枢神经系统-垂体-促肾上腺皮质激素释放激素-肾上腺皮质部-肾上腺皮质激素-靶器官/组织-应激反应。

应激性是生物的普遍特性，生物体对外界刺激发生反应须具备三个条件：①对刺激的感受；②信号的传导，环境的变化刺激了一部分原生质，通过信号传导，使得相邻的原生质也会相继受到影响，这种影响可由原受刺激的地点传播出去；③效应器的反应，不同的生物有不同的效应器，对同一刺激可能会有不同的反应。

1.1.1 应激

应激是动物对外界刺激的本能反应，应激源很多，包括：环境因子（热、冷、湿度、有毒气体浓度、辐射、外伤等），疾病因子（腹泻、炎症等），饲养管理（免疫、饲养密度、抓捕、运输、转群等）和心理因子（焦虑、恐慌等，研究较少）等。因热应激对动物生产造成的影响较大也较为明显，故近年关于热应激的文献报道较多，但这些报道主要研究用添加剂来减轻热应激对生产造成的影响，对于应激信号的传导、应激对机体组织生长的影响，影响的机理研究较少。外源刺激时，动物为了抵御这种刺激，机体首先会经历一系列生化反应，最终通过神经（激素）、内分泌

泌（内分泌物）、免疫（抗体等），来维持体内的内环境稳态（氧化与抗氧化稳态、离子平衡等），产生抵御能力或者衰竭死亡。

1.1.1.1 应激状态的确定

热应激 关于热应激的文献较多，多是通过提高环境温度，模拟热环境，刺激动物产生应激反应，或在气候比较热的情况下做试验，研究抗应激添加剂的使用效果，这些研究关于导致应激的温度和相对湿度报道不一致，并且多数研究缺乏环境相对湿度的有关内容（表 1-1）。研究表明相对湿度肉仔鸡体温无显著影响；高温环境中，提高空气相对湿度可显著提高肉仔鸡体表温度（效梅等，2003）。闵庆文等（1994）以产蛋鸡的产蛋率为指标建立了温湿指数方程： $THI=0.81AT+(0.99AT-14.3)RH+46.3$ ，评估了温、湿度对产蛋性能的影响，据此方程可确定 RH 62.5%时，28.5℃产蛋鸡进入轻度应激，32℃进入重度应激。林海和张子仪（1996）年建立了肉仔鸡有效温度模型： $ET(℃)=AT(0.944+0.655RH)-13.551RH$ ，其中 ET 为有效温度；AT 为空气温度（>20℃）；RH >30%。一般认为鸡在 7.8~30℃范围内，其体温调节机能健全，能够保持稳定的体温。环境温度高于 30℃时，机体体温调节功能失控，常出现喘气、饮水量增加，食量大减，生产性能（如生长速度、产肉力、产蛋量、蛋品质、种蛋受精率等）明显下降等不良现象，发生热应激。环境温度高于 40℃时，生产能力完全丧失，死亡率极高。具体在何种温、湿度条件下、多长时间才能称为应激，即应激程度如何评价，需要进一步研究。

表 1-1 不同动物可能产生应激的温湿度及其与正常环境的比较

Table 1-1 Comparison between stressful conditions and normal environmental conditions for different animals

动物 Bird varieties	正常环境 Normal condition		应激环境 Stress condition		温差 Differences	文献来源 Sources
	T, °C	RH, %	T, °C	RH, %	°C	
雄性 AA 肉仔鸡	21~24	50±5	40±0.5	70±5	16~19	李静等, 2004
AA 肉仔鸡	21.2 (22)	50	28.8~36.5	50	7.6~15.3	李军乔, 2004
肉杂鸡			29.26~34	85~90		黄志毅等, 2004
肉仔鸡	22	40~50	32.5~34.5	80~90		刘思当等, 2003
AA 肉仔鸡			33			吴东等, 2003
肉仔鸡			36			吴孝兵, 2003
鸡			32			李有业, 2003
肉仔鸡	19~25	65~75	29~35(32.7)	75~85	10	效梅等, 2003
肉仔鸡			35 (2h)			DebutM 等, 2003
“882”肉仔鸡	28.20±1.57	80.91±10.05	32	77.6±7.7	3.8	陈忠等, 2002
艾维茵肉仔鸡			33±0.5(12h)			高树新等, 2002
艾维茵肉仔鸡			33±2 (6h)			胡兰等, 2001
肉仔鸡			32 (2h)	75		SandercocK, 2001
AA 肉仔鸡	20~25	65~70	32~35	80~82		文杰等, 2000
AA 肉仔鸡			28~33	80~90		李绍钰等, 2000
AA 肉公鸡	20~23		33			傅伟龙等, 2000
AA 肉鸡			27~35	83~90		刘铀等, 1999
肉仔鸡	29.18±2.48	81.40±4.88	24~35			夏东等, 1999
AA 肉仔鸡			35~37(48h)			应如海等, 1999
AA 肉仔鸡	24	25	32	74		Teeter RG, 1985

RH: Relative Humidity, 相对湿度; T: temperature, 温度; HC: hybridized chicken, 肉杂鸡。

冷应激 寒冷应激通常是指鸡对突然下降环境温度 ($>10^{\circ}\text{C}$) 刺激或是长期处于低温环境 ($<4^{\circ}\text{C}$) 中所产生的系列生理或病理反应。气温低会增加环境能耗和鸡体内能量消耗, 当不能满足增热要求时, 即产生冷应激。冷应激能使动物血清皮质酮 (Corticosterone) 和皮质醇 (Cortisol) 及儿茶酚胺 (catecholamine) 类激素水平显著提高, 使血清肌酸激酶活性明显增强 (李士泽等, 1999; 杨明和李庆芬, 2002; 赵恩军等, 2003)。但对动物血清乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶等的影响报道不一致, 另外低温应激与高温应激的共同性, 应激传导通路的共性等均需要进一步研究。

其它应激 洪奇华等 (1999) 研究了由温度 ($27.52\sim 30^{\circ}\text{C}$)、饲养密度 ($22.5\sim 23.5$ 只/ m^3) 和氨气 ($16\sim 28.2$ mg/m^3) 浓度对肉仔鸡造成的应激, 研究表明应激增加血浆皮质酮的含量。Nijdam 等 (2005) 研究了机械和人工抓捕应激对肉仔鸡血液 (肾上腺酮、葡萄糖、乳酸) 和肉质 (pH、温度、持水力) 的影响, 研究认为两种抓捕方式没有影响。Hambrecht (2005) 研究了驱赶、运输及持续时间对猪的应激, 研究表明长期运输会增加肌肉糖裂解潜力和肉中乳酸浓度、降低肌肉嫩度、降低肌肉亮值, 增加电导率。这些应激均有肾上腺皮质激素的参与, 因此以肾上腺皮质激素为媒介, 通过应激模型的建立, 研究应激信号的传导通路, 是一个值得探索的方法。

1.1.1.2 应激时机体激素和酶的变化

Freeman (1926) 论述了家禽的“全身适应综合症” (General Adaptation Syndrome, GAS), 认为家禽的 GAS 表现为垂体前叶和肾上腺变大, 血浆皮质酮水平升高, 小鸡胸腺萎缩, 白细胞数量, 血糖和游离脂肪酸浓度发生变化, 生产停滞甚至体重减轻。应激动物血清生化及有关酶指标的影响, 见表 1-2。

血液 pH 值 鸡没有汗腺, 在高温环境中, 只有提高呼吸率, 加大肺通气量, 以增加呼吸道的蒸发和对流散热量, 严重时则发生热性喘息, 呼出体内大量 CO_2 , 使 pH 升高, 当 pH 值偏离最适范围时, 会降低酶活性, 从而影响生产力。

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) LDH 是糖代谢中催化丙酮酸产生乳酸的酶, 是糖酵解过程中的关键酶, 血清中该酶的活性升高与无氧酵解加强密切相关。

肌酸激酶 (CK) Mitchell 和 Sandercock (1995) 的研究表明血浆中的 CK (99%) 主要是肌肉同工酶 (MM-CK), 其活性在急性热应激时显著增加。CK 是主要存在于骨骼肌和心肌中的一类细胞内酶, 其功能是催化三磷酸腺苷上的高能磷酸键转移到肌酸分子上, 生成磷酸肌酸, 为肌肉收缩储存能量。以上两种细胞酶在血液中活性的升高可反映出相关组织细胞的损伤以及受损伤的程度 (叶应妩和王毓三, 1991; 王小龙, 1995)。环境应激条件下, 血液 CK 活性升高, 是肌细胞膜功能和通透性受到破坏、骨骼肌损伤的标志, 是动物受到应激的重要特征之一。

肌酸磷酸激酶 (CPK) CPK 含量是反映动物应激状态的最敏感的指标之一, 高温或低温刺激均会引起动物血清 CPK 含量的显著升高, 是因为细胞中的肌酸激酶向血浆中转移的结果。

碱性磷酸酶 (ALP) ALP 是一组酶类, 在碱性条件下有较高的活力, 能水解各种各样的磷酸单酯, 是体内蛋白质、脂肪分解代谢中一种重要的酶, 应激动物要动员体贮 (肌肉) 中的糖原、蛋白质和脂肪分解供能, 因此应激时, ALP 活性加强。

磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2 , PLA_2) PLA_2 是一种能特异性水解甘油磷脂 2 位酯键的脂解酶, 参与细胞膜磷脂的转换及花生四烯酸的代谢, 许多动物实验和临床研究已证明在炎症、休克及应激时 PLA_2 活性升高, 是造成 PSE 肉的主要原因, 影响肉品外观和颜色, 增加滴水损失。

表 1-2 动物应激过程中有关生化指标的变化

Table 2 Changing in some biochemical parameters of different animals during stress			
应激类型	试验动物	血清生化指标	文献来源
Type of stress	Bird verities	Blood biological values	Sources
冷应激	黄羽肉公雏	血清 CPK 升高	哈斯苏荣等, 2005
低温应激	家禽	血浆甲状腺激素增加	Davis 和 Siopes (1987)
低温应激	火鸡	血浆 CORT 升高	Davis 和 Siopes (1987)
高原低氧	老鼠	ACTH 升高	朱海宏等, 2005
饲养密度	肉鸡	血浆 CORT 升高	Marshaly 等, 1984; Hocking 等, 1999; Smith RF 和 Dobson H, 1990; Littin 和 Cockrem, 2001; Kannan 等, 1997a, b; Mitchell 等 (1997)
换羽	蛋鸡	H/L 值显著增加	Davis 等 (2000)
氨气,电击,热	肉仔鸡	H/L 值显著增加	McFarlane 等 (1989)
运输	肉鸡	血浆 CK 显著增加	Mitchell 和 Kettlewell (1998); Mitchell 等 (1992)
运输+热	肉鸡	H/L 值升高	Mitchel 和 Kettlewell 等 (1998; Maxwell (1993), Mitchell 等 (1992)
热应激	肉鸡	CK 升高	Sandercocock, 2001; 李绍钰, 1999; 林海, 1996; 刘春燕和吴中红, 1995; Hocking 等, 1994; Sharma 和 Gangwar, 1986; Ostrowski-Meissner, 1981
热应激	肉鸡	血清 CORT 升高	Ben Nathan 等 (1976)、Gould 和 Siegel (1985)、Devhim 和 Teeter (1991)、Geraert 等 (1996) 刘铀等, 1999; 杜荣和顾宪红, 1995
热应激	肉鸡	LDH 升高	刘铀等, 1999; 刘凤华, 1997; 林海, 1996; Hocking 等, 1994; Sharma 和 Gangwar, 1986; Ostrowski-Meissner, 1981
热应激	肉鸡	AKP 降低	高树新等, 2002; 刘铀等, 1999; 穆淑琴等, 1996; 刘春燕和吴中红, 1995; 邵莹等, 1992; 蔡玉根等, 1990
热应激	肉鸡	甲状腺激素分泌减少	黄昌澍, 1983; 张乐平等, 1998
热应激	肉鸡	T ₃ 降低	傅伟龙等, 2000; 刘铀等, 1999
热应激	肉鸡	T ₄ 降低	刘铀等, 1999
热应激	肉鸡	血清 γ 球蛋白降低	高树新等, 2002
热应激	肉鸡	pH 值升高	Teeter RG, 1985
热应激	肉种鸡	血浆 CK 活性显著增加	Hocking 等, 1994

钙依赖蛋白酶 (Calcium Dependent Protein, CDP) 肌肉中存在三种蛋白质水解系统: 组织蛋白酶、钙依赖蛋白酶和蛋白酶体, 三种酶各自具有其特有的抑制因子。钙依赖蛋白酶主要分布于 Z 线附近, 最佳活性 pH 为 7.5, 负责细胞抑制骨架的分解。

甲状腺激素 (T₃ 和 T₄) 甲状腺活动对动物机体代谢与生长发育等基本机能有重要调节作用, 正常生理状态下, 甲状腺激素水平保持在一定的范围内; 甲状腺活动增强, 甲状腺激素分泌增加, 机体组织代谢率增加, 产热增多, 能量消耗增加, 动物生长速度和效率下降; 相反, 其分泌量减少, 代谢率和产热减少, 从而影响生长速度。热应激时血浆甲状腺素水平降低, 抑制体内代谢功能, 减少产热, 以维持在高温期产热和散热的平衡。热曝晒可使家禽维持代谢较正常基础代谢降

低 25%-35% (Ruckebusch, 1991), 糖和脂质的代谢也因甲状腺活性的降低而降低 (may, 1986)。

皮质酮/醇 (CORT) CORT 是肾上腺皮质分泌的糖皮质激素。其作用是动员能源、提高血糖 (抑制肌肉和脂肪组织对葡萄糖的摄取, 促进肌肉蛋白质的分解, 增强脂肪组织的脂解和促进糖异生)、防止发炎、提高机体总抵抗力, 对提高机体抗应激能力, 维持生命活动有重要意义。应激时, 肾上腺皮质重量增加, 增加皮质激素合成和释放, 升高血清 CORT 浓度, 增加抵御应激的能力, 但应激时间过长, 会造成肾上腺皮质功能衰竭, 可能会降低 CORT 含量 (王新谋, 1985; 杨蕴堂, 1991; 文杰等, 2000)。有报道指出 CORT 进入淋巴细胞后可提高其中环腺苷酸 (cAMP) 含量, 导致淋巴细胞增殖减少, 进而引发免疫抑制。血清 CORT 含量会随肉仔鸡周龄增加的而降低, 从而降低对应激的敏感性 (刘铀等, 1999)。血浆 CORT 浓度有明显的昼夜变化节律 (Etches, 1976; Beuving 和 Vonder, 1977)。应激还能导致交感-肾上腺髓质的激活, 交感末梢和肾上腺髓质释放的去甲肾上腺素增多, 血中含量增高。去甲肾上腺素的释放可使红细胞压积、聚集性、全血粘度、血浆粘度、血浆纤维蛋白原含量等增高。

血清葡萄糖 (G) G 是较早公认的应激指标之一。Vecerek 等 (2002) 报道 16 日龄肉鸡体内的 G 浓度随环境温度的逐渐升高而显著增加。Fujita 和 Yamamoto (1996) 报道限制应激使蛋鸡 G 浓度显著增高。傅玲玉等 (1988) 则得出相反的结果, 发现 36°C 和 30.8°C 高温环境与 18°C 相比, 蛋鸡 G 浓度分别降低 60% 和 34.8%。应激后, 肉仔鸡的血脂、G 大都升高, 因为应激时, 鸡的交感神经兴奋, 引起由其支配的肾上腺大量分泌儿茶酚胺类激素; 这些激素可促进糖原和脂肪组织的分解, 使 G 及血脂升高。高温使血清 G 降低可能是因采食量降低所致 (吴于明等, 1998)。

血清总蛋白 (TP) 应激时肌肉中蛋白被动员分解, 导致 TP 浓度提高。因此可以通过检测 TP 的变化, 来确定动物所受到的应激程度。

血清尿素氮 (BUN) 热应激时, 血液循环也发生明显变化, 外周血管扩张, 心率加快, 大量的血液流向体表, 以加快散热, 而流经胃肠道、肝脏和肾脏等脏器的血流量相对减少, 这样的血液分配虽有利于散热, 但体内营养物质的吸收和利用受到限制, 影响动物生产性能的发挥。由于血管容积增加, 血液含水量增加, 使血液高度稀释, 血细胞压积 (PCV)、血红蛋白、血浆蛋白及血钾、血磷浓度下降, 而尿酸水平则升高 (Andrea 等, 1973)。

血钾、氯 (K、Cl) 低血钾和高血氯是热应激机体的常见变化, 尤其是热应激引起的呼吸性碱中毒、缺血、缺氧等一系列现象, 是导致细胞外液 K^+ 内流及 Cl^- 外流引发低血钾和高血氯的重要原因。热应激时肾上腺皮质分泌醛固酮增加, 由于醛固酮的保钠排钾作用, 使得动物出现低血钾。

血钙 (Ca) 应激会增加细胞膜 Ca^{2+} 的通透性, 增加 Ca^{2+} 内流, 从而降低血钙。热应激时鸡代谢活动加强, 外周血液循环加快机体代谢产物排出体外, 且鸡为对抗热应激大量饮水排出稀粪也会导致矿物元素大量丢失, 范石军等 (1996) 报道在炎热期, 血清 Ca、K、Na 显著降低。

血细胞压积 (Packed Cell Volume, PCV) 动物血液 PCV 的改变是为了调节氧的供应以满足产热的需要, PCV 的变化受儿茶酚胺的影响, 应激引起血压和血管通透性的变化, 从而影响血液量和 PCV。脾脏的血量很大而且比外周循环中的细胞/血浆比高, 应激时脾脏收缩, 脾脏储血量减少, 也导致 PCV 的升高。McFarlane 等 (1989) 对多种应激源同时作用的研究结果表明, 感染球虫后鸡血液 PCV 降低, 而氨气浓度增高和热应激使鸡血液 PCV 增加。

异嗜性粒细胞/淋巴细胞 (H/L) H/L 值是一项比较有效的诊断机体是否处于应激状态的指

标(景栋林, 1986)。下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)激活程度与 H/L 值相一致, H/L 值是 HPA 活性指示指标, 也是动物非特异性应激反应指标(Gross 和 Siegel, 1983; McFarlane 和 Curtis, 1989), 而且 H/L 值相对稳定和持续时间长, 对环境应激反映较小, 相对稳定, 是比皮质酮更好的应激指标。肾上腺皮质激素对机体的体液和细胞免疫均具有抑制作用(姚专旦, 1988), 但应激时产生的儿茶酚胺类激素, 激活 cAMP, 直接促进抗体产生。

免疫器官(Organs of the Immune System) 热应激妨碍了免疫器官的发育, 降低了胸腺、法氏囊、脾脏的相对重量。是因高温抑制了细胞对葡萄糖的摄入和蛋白质的合成(Lillehlj 等, 1992), 从而引起免疫器官的萎缩, 其它应激是否导致免疫器官重量的变化, 还需要研究。

脂质过氧化物(Lipid Peroxidation, LPO) 肌肉组织中含有的大量脂肪(尤其是不饱和脂肪), 容易受到体内自由基引发的自动催化的脂质过氧化反应。林海(1996), Aoyagi(1997) 和李绍钰(1999) 报道短期高温应激使鸡血浆和肝脏中的脂质过氧化物(LPO) 含量显著升高。Altan 等(2000) 发现初次应激比再次应激肉鸡血液中的丙二醛(MDA) 浓度高。MDA 是 LPO 的主要降解产物, 可用硫代巴比妥酸反应(TBARS) 进行检测。TBARS 与肌肉的感观形状品质有显著相关, 被用作肉品质量的评价指标(Raharjo 和 Sofos, 1993; Salih 等, 1987)。应激时, 机体内自由基急剧增加, 若未得到及时清除就会造成蓄积, 从而导致细胞膜脂的氧化损伤或过氧化反应, 影响细胞的结构和生理功能, 如 DNA 转录、RNA 加工等(Lawrie, 1966)。

应激时体内激素和酶的变化可调动机体的能量和免疫体系, 协助机体抵御应激。已发表的文献关于应激对机体影响的研究是单向的, 即应激导致机体的理化反应, 不能通过机体理化指标的变化评价应激程度。根据应激时动物某一(或相关)理化指标的变化, 来动态确定动物受到的应激程度, 建立动态评估程序, 以便于评估应激将对动物(生产性能、肉质等)造成的影响。根据应激时动物理化指标的变化, 模拟应激指标的变化; 研究某一生化指标的变化对其它生化和肉质指标的影响, 达到在人为控制下的研究应激信号的传导特点, 均需进一步研究。

1.1.2 氧化应激

内源性和/或外源性刺激使机体代谢异常而骤然产生大量的自由基(氧自由基、一氧化氮等), 超过了机体抗氧化体系的还原能力, 此时机体处于氧化应激状态, 导致组织和机体的氧化损伤。氧化应激通过其氧化过程调节生理过程和生化反应, 同时也造成细胞、亚细胞结构、生物大分子的氧化损伤, 因此同时涉及到广泛的生理和病理过程。

氧化应激(oxidative stress)的应激源有外源性的和内源性的(Barja, 2002)。物理、化学、生物等因素可引发外源性氧化应激, 其主要起因是其直接或间接引发体内自由基的产生量增加, 为了维持自由基稳态动态正常, 清除自由基系统的效能可能会适应性增高。如果其增加程度不能维持自由基产生与清除的平衡, 就会发生自由基所致生物大分子的损伤。如果得不到应有的修复, 则会发展为氧化损伤(oxidative damage)。

氧化还原反应是动物体内最为广泛和重要的化学反应, 细胞本身的有氧代谢过程及外源性抗氧化剂均能引起活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的产生, 许多实验证明细胞凋亡与 ROS 有关。ROS 可通过引起细胞脂质过氧化, 损伤 DNA 分子或调节细胞凋亡相关基因而诱导细胞凋亡。一定限度内 ROS 的产生, 也可以作为一种特殊的信号分子, 参与细胞内氧化应激激活的特殊信

号传导途径 (Mikhailov 等, 2003)。

应激反应与细胞抗氧化酶活性变化相关联, 各种形式的应激反应包括热休克诱导 HSP 的合成。应激细胞合成和积累获得对随后应激反应的短暂抗性, 这种对应激反应的抗性 (通常指热耐受能力) 与机体增强对自由基的清除能力有关, 其中 SOD、CAT 和 GSH-Px 是机体清除自由基的重要组分。

环境应激的程度与氧化应激的发生、发展的关系方面的研究较少, 环境应激时如何导致机体氧化应激发生的, 需要进一步研究。氧化应激时, 肌肉作为全身最大的储能组织, 最先受到机体的动员, 肌细胞膜受到自由基的攻击, 增加了滴水损失, 降低了肉品的持水力。氧化应激的程度与肉质的受影响程度之间的动态定量关系需要进一步研究。

1.2 肉质

肉质包含四个方面的内容 (Hofmann, 1994): ①感官特征, 鲜肉还包括烹饪后的肉品的感官特征, 是影响消费者购买的主要特征, 包括: 肉品的外观 (色泽、大理石纹样、整洁度、脂肪层)、质地 (嫩度、多汁性)、风味 (气味、滋味)。肉质的新鲜度用消费者的感官判断和技术指标如肉色、吸水力、质地来评定 (Vander Wal 等, 1997)。

②技术指标, 包括: 肉色、pH 值、滴水损失、剪切力和硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 值等指标来量化肉质。肌肉 pH 值对肌肉的嫩度、滴水损失、肉色等有直接影响, 动物屠宰后, pH 值降低与肌糖原酵解有关, 应激会加速体内糖原的酵解, 使肌肉 pH 值迅速降低; 滴水损失是肌肉保持水分性能的指标, 肌肉系水力直接关系到肉品的质地、风味和组织状态, 影响烹饪后肉品的多汁性。剪切力是肌肉嫩度的指标, 是肉品内部结构的反映, 并且在一定程度上反映了肉中肌原纤维、结缔组织以及肌肉脂肪含量、分布和化学结构状态; 肉品 TBARS 值与肉品的酸败、异味、过热味等直接有关, 是肉品脂质过氧化程度的间接量化指标。

③营养指标, 指肉品中的蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质和维生素。

④卫生指标, 与肉品的微生物感染、抗生素及其代谢产物以及激素、粪臭素等残留有关的因素等。肉质的研究需要以量化的指标来进行。

1.2.1 pH 值

pH 值是反映宰杀后猪体肌糖原酵解速率的重要指标, 宰后 45 至 60 分钟度量的 pH 值 (pH₁) 是公认的区别生理正常和异常肉质 (PSE 肉) 的重要指标。正常猪肉 pH 值一般为 6.1~6.4 (表 1-3), 应激时因肌肉中的糖原降解为乳酸, 而导致 pH 值下降, 如 PSE 肉的 pH 值为 5.1~5.5 (陈润生, 1981; Monin, 1985; 姚军虎, 1994)。动物被处死后, 有机体的自动平衡机能终止, 而一系列物理、化学和生物化学反应仍持续进行。动物由有氧代谢转变为无氧代谢 (糖酵解), 将储藏的糖原最终降解为乳酸, 乳酸的积累导致肌肉 pH 值降低。应激会加速体内糖原的酵解, 使肌肉 pH 值迅速降低, 肌肉 pH 值下降的速度和强度, 对肉质性状产生决定性的影响。肌肉呈酸性首先导致肌肉蛋白质变性, 使肌肉保水力降低和颜色变灰白色, 是形成 PSE 肉的重要机制, 肌肉 pH 值对其嫩度、滴水损失、肉色等均有直接影响 (Fletcher, 1995)。一定范围内, 肉的终点 pH 值愈低, 滴水损失愈大, 肉色评分愈低; 反之亦然 (张伟力, 1995)。

表 1-3 常见肉品的 pH 值正常范围

Table 1-3 The pH values of different meat

肉 meat	猪肉 pork	牛肉 beef	鱼肉 fish meat	鸡肉 chicken	平均 average
pH	5.3~6.9	5.1~6.2	6.6~6.8	6.2~6.4	5.5~6.5

1.2.2 颜色

肉色反映了肌肉生理、生化和微生物学的变化，肉色深浅取决于肌肉中肌红蛋白（MB，约占 70%~80%）和血红蛋白（HB，约占 20%~30%）的含量，MB 含量越高，肉色就越深。肌肉中 MB 含量受动物种类（表 1）、肌肉部位、运动程度、年龄及性别等因素的影响，放牧牛羊肉肉色最深呈深红色，猪肉鸡肉次之，而兔肉接近白色。鸡腿肌中 MB 含量是胸肌的 5~10 倍，所以前者肉色发红，后者发白。肉色亦受外界光照、氧化和内部的抗氧化能力的影响，MB 中的亚铁离子能与氧结合生成氧合 MB（呈鲜红色），若肉在空气中放置长久，氧合 MB 被氧化为呈褐色的正铁 MB（Torrent, 1996）。Forrest 等（1975）研究发现，PSE 肉的颜色变浅是由肌肉中游离水含量增多和 pH 值降低对颜色直接影响的结果。肉质的颜色变化与氧化反应导致肉质中的正铁肌红蛋白的水平升高有关。

肉色的评定方法有目测法和仪器测定法。目测法：是在自然光下（忌强光，亦忌弱光）用肉眼观测肉样的方法。要求宰后 1-2h 取肉样观测，或采取的肉样在 4℃冰箱存放 24 小时以后再观测。肉样通常取自胴体腰椎结合处的背最长肌。此法简便易行，适宜于现场操作，并能有效区分正常肉和劣质肉。一般牛肉、猪肉的肉色评定依此法与标准肉色版对比按 5 级分制打分。目前关于禽肉、羊肉还没有标准肉色版可供参考。仪器测定法：是借助光学仪器直接测定肌肉颜色的方法。也有用化学比色法测定肌肉中的红色素的含量。

表 1-4 新鲜动物肉品中肌红蛋白的含量

Table 1-4 Myoglobin content in the fresh meats of different animals

肉来源 meat	兔肉 rabbit	禽肉 chicken	猪肉 pork	羔羊肉 Lamb	牛肉 beef
肌红蛋白含量, mg/g	0.2	0.2~1.8	0.6~40	20~6.0	3.0~10.0

1.2.3 滴水损失

肌肉系水力（water binding capacity, WBC）是指当肌肉受到外力（如：加压、切碎、加热、冷冻、融冻、贮存、加工等）作用时，保持其原有水分的能力。滴水损失（drip loss）是指不施加任何外力，只受重力作用下，蛋白质系统的液体损失量，或称贮存损失和自由滴水（Jauregui 等, 1981; Stina Fjelkaer Modig 等, 1986; 陈润生等, 1995）。肌肉中的水分可分为水化水（不易流动水，80%，影响 WBC 的主要部分）和游离水两部分（Hamm, 1975），因滴水损失受外界的影响因素少，测定方法简便易行，无需复杂设备，测定值与保水力呈强相关。故一般用滴水损失来评价 WBC。

滴水损失不仅直接影响食肉的质地、滋味、香气、多汁性、养分损失、嫩度、颜色等食用品质，而且具有重要的经济意义。WBC 还与肌肉 pH 值有关，屠宰后的糖原酵解使得肌肉 pH 值下降，肌肉蛋白之间的静电强度减弱，减弱了电荷作用，肌球和肌动蛋白纤丝之间的间隙缩小，水

分从肌原纤维渗到肌浆，再到肌细胞外间隙；另外应激时，氧自由基增多，膜脂肪氧化，膜流动性改变和破裂，导致水分外溢，增加了滴水损失。

1.2.4 剪切力

肉品嫩度 (tenderness) 是消费者对食肉口感惬意程度的重要指标。人们通常所谓的肉嫩和老化，是主观的定性描述，客观上是对肌肉各种蛋白质结构特性的总概括 (陈润生, 1995)。嫩度受多种因素的影响，如：肌节长度、结缔组织含量、肌肉结构蛋白的水解敏感性、品种、年龄、肌肉部位 (鸡的胸肌比腿肌嫩)、肌纤维直径、肌肉化学成分 (pH 值、肌内脂肪含量、糖酵解的速度、可溶性胶原蛋白、羟脯氨酸含量)、屠宰全过程尤其是前处理工艺等。目前相关研究主要集中在宰后肌肉嫩度与肌肉蛋白质的降解量上。

肌肉中有三种蛋白水解酶系统，即钙依赖蛋白酶 (Calcium-dependent protein, CDP) 类、溶酶组织蛋白酶类和蛋白酶体。这三种内源蛋白酶系统是体内蛋白质正常代谢周转的酶。因此可调控体内蛋白质的周转速度，控制肉品嫩度。组织蛋白酶特别是 CDP 与屠宰后的蛋白质水解纤维和肉的嫩度有关。肉的嫩度因部位、CDP 及其抑制剂含量不同而不同 (Kim 等, 1992; Sun 等, 1997)。老龄动物肌肉嫩度低，可能与其肉中 CDP 抑制剂活性高有关 (Lonergan 等, 1995b)，CDP 的含量和活性越大，则成熟后肉越嫩 (Koochmaraie 等, 1991)，CDP 抑制剂的含量和活性与肉的嫩度呈负相关 (Carpenter 等, 1996; Lonergan 等, 1997, 1998)。Calkins 和 Sei deman (1998) 研究认为屠宰后第一天肉的嫩度主要决定于 CDP 的作用，因为此时肌肉的 pH 和温度适合 CDP 活性的发挥，但随着时间的延长，肌肉 pH 下降，温度降低，CDP 活性受到抑制，而组织蛋白酶的活性增强，成为影响肉嫩度的主要酶。

随着畜禽年龄的增长，肌肉能溶解于盐和酸的胶原蛋白下降，结缔组织分子间和分子内的交联程度升高 (Lonergan, 1995a)，加热后的胶原蛋白可溶性降低，结缔组织对酸的敏感性降低。

几十年来，人们试图用物理的和化学的方法测定嫩度，尤其是各种复杂机械来模拟人的咀嚼动作，但始终未能找出被普遍接受的方法 (周光宏等, 1999; Pearson, 1963)。早在 20 世纪 30 年代初由 Warner (1928) 和 Bratzler (1932) 设计的一种简单的剪切仪 (Shear Device)，一直沿用至今，被国际认可。陈润生和马小愚等 (1988) 根据剪切力 (Shear force) 原理设计的 C-LM 型肌肉嫩度计在国内得到普遍应用。

1.3 自由基与肉质

早在 1931 年 Michalis 就提出某些酶促氧化还原反应的中间产物为自由基。然而直到自由基生物学迅猛发展的最近 30 年里，自由基在体内的产生与清除才被重视。现在，人们已经认识到自由基与许多疾病的发生和发展密切相关。大量研究表明，动物体内发挥各种生物学效应的生物分子包括非自由基与自由基。活性氧是氧自由基及其活性衍生物，其产生、清除、利用与危害是自由基生物学发展初期研究的主要内容。1986 年 NO 的生物效应被发现 (Palmer 等, 1987)，活性氮也成为自由基生物学的主要研究对象。

自由基与应激过程中的组织损伤、营养物质代谢密切相关，正常生命中自由基不断产生，维护正常的生命功能，应激时自由基浓度过高引起机体的氧化损伤，使肌细胞膜氧化变性，造成组织吸附水能力降低，大量汗液从中流出，肉色苍白、系水力和嫩度降低。

细胞膜中极易氧化的不稳定脂肪酸和磷脂构成了流动双分子层的主要部分。Slate (1984) 认为热应激会造成体内自由基 OH^\cdot 和 O_2^\cdot 的过量产生, 这些自由基能以多种方式引起动物体内代谢紊乱和组织损伤。肉品中的脂肪氧化是自由基调节的自动催化过程, 是由亚细胞膜中高含量的不饱和磷脂部分所引发 (Gray, 1987)。

靠近 DNA 区域所形成的活性自由基会引起细胞分子结构的变化, 从而产生细胞突变或细胞毒性及酶活性变化 (Collins 等, 1994)。活性自由基还可通过攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸 (PUFA), 导致其过氧化而破坏细胞膜结构的完整性, 增加鸡肉水分的渗出。Halliwell 和 Gutteridge (1989) 认为增加动物体内脂质过氧化水平是目前所发现的自由基在动物体内所产生的最重要的破坏形式。热应激使鸡肝脏和血浆中脂质过氧化水平显著升高, 而在日粮中添加 VC 能使热应激鸡血浆及肝脏中 TBARS 值为指标的鸡血浆和肝脏脂质过氧化水平显著降低 (Aoyagi 等, 1997)。养鸡生产中添加 VC 以缓解热应激已有较多报道 (Lyle 等, 1968; Njoku, 1986; Bains, 1996)。Tappel (1972) 报道 VE 具有降低动物体内脂质过氧化水平的作用。VE 主要是对 PLA2 产生了抑制作用, 该酶不仅水解磷脂而引起异味, 而且也是造成 PSE 肉的部分原因。Yamamoto (1963) 发现添加核黄素能显著降低大鼠体内的脂质过氧化水平。

肉鸡的货架寿命是其品质的重要组成部分。肉品中 TBARS 值水平是反映肉品脂质过氧化程度的直观的定量化指标, 与肉品货架寿命直接相关。

1.4 应激影响肉质的机理

动物应激 (如热、运输、宰前处理等) 对肉品质的影响, 是因为这些应激影响了肉的营养组成 (肌糖原、肌蛋白、体脂肪含量等)、理化性状、氧化还原状态等, 从而影响宰后肌肉的酸化速度和程度, 造成蛋白质变性异常, 影响肉品质量。

1.4.1 应激对肉质的影响

研究表明, 热应激降低体蛋白, 增加体组织脂肪的含量。Howilner 等 (1987) 指出, 环境温度 ($12\sim 36^\circ\text{C}$) 每升高 1°C , 体脂和腹脂分别增加 1.58% 和 0.81%, 而水份减少 0.15%, 体蛋白不受温度的影响。热应激时, 由于脂肪 (尤其是腹脂) 的增加, 导致屠宰率降低, 并使饲料的产肉效率降低。应激使禽血浆 CORT 水平升高, 进而促进蛋白质分解, 加强糖异生, 使代谢向降解蛋白质提高糖原合成和脂肪沉积方向进行, 所以造成了腹脂率升高。

现代肉仔鸡生长迅速, 但对应激的适应能力较差。Mitchell (1997) 研究认为, 出现这种情况的原因之一, 是对骨骼肌受损的易感性增大。在热应激、运输应激 (运送活禽) 时可发现 CK 量增高 (97% 为肌肉而非脑或心产生的同工酶)。肌肉是动物的储能器官, 必要时动物会动用这里的能量来满足需要。因此可以说任何应激均会造成动物 (尤其是肉仔鸡) 的肉品质变差。

从神经调节来看, 环境温度的升高, 给鸡带来沉重散热负担, 散热平衡被打破, 进而抑制嗜食中枢, 同时兴奋饮水中枢, 使鸡只饮水成倍增加; 当嗉囊中充满水时, 压迫内部感受器进一步抑制嗜食中枢, 采食量进一步减少 (Lillie, 1976)。采食量降低可能是应激导致的血清 TG 降低的原因 (冯于明等, 1998)。摄入的能量和蛋白质不足, 必然影响肉品质。

有关高温对禽肉品质的影响报道不一。Sonaiya 等 (1990) 报道高温改善鸡肉品质, Northcutt

等（1994）则认为高温预处理仅提高存活率，并不能改善鸡肉品质。Pitcovski 等（1994）报道禽类皮肤的撕裂率与环境温度高度正相关。Altan 等（2000）研究表明，高温预处理可在一定程度上减缓应激，使再度受到热应激的鸡体内的 MDA 浓度降低。

宰前肌肉温度（Klont 和 Lambooy, 1995a）、电刺激（Klont 和 Lambooy, 1995b）会改变肌肉的代谢状况，降低肌肉中糖原和磷酸肌酸浓度（ $P < 0.01$ ），增加乳酸盐和游离氨基酸含量（ $P < 0.01$ ）。热应激时，动物主要动员脂肪组织中的长链脂肪酸，通过脂肪酸的氧化提供能量，如脂质过氧化（LPO）从而破坏细胞膜结构和功能的完整。高温应激使动物肌肉内糖酵解加速，葡萄糖-6-磷酸浓度升高而 ATP 和 CP 浓度降低，最终影响骨骼肌的分化（Judge, 1969），加速 ATP 的耗竭和宰后代谢，使屠宰后肌糖原迅速降解，pH 值降低，于是肌浆和收缩蛋白质变性，肌肉的光散射性增强，L*值变高，肉品颜色变浅和持水力下降。作者认为因为没有统一的应激判定指数，所以文献中有关高温对肉品质量影响不一致。

表 1-5 应激与肉品质 Table 1-5 The effect of stress on meat quality

应激类型 type of stress	试验动物 birds	肉品质 meat quality	文献来源 Sources
热应激	家禽	体脂肪增多	Kubena, 1972
高温	肉鸡	胸肉/黑肉比例降低	Howlinder 和 Rose, 1989
高温	肉鸡	机体蛋白含量降低	Kubena 等, 1972
高温	火鸡	屠宰后 2h 的肌肉中 pH 值降低， 颜色变淡，滴水损失增加	Mckee 和 Sams, 1997; Owen 等, 2000
高温	火鸡	肉的 L*值和滴水损失增加	McCurdy, 1996

1.4.2 应激影响肉品质的机制

鸡处于热应激状态下时（而非体温升高），血的酸碱平衡受到破坏，引起钙流失，导致细胞内的 pH 值增高。钙从肌浆网通过“钙通道”而移动，从而造成肌肉受损。当钙的体内平衡受到破坏时，鸡便试图对钙进行再分配，为此需要消耗能量，从而产生过多的热，使热负荷进一步加重。当糖元的排空速度和死后的酸碱平衡发生变化时，会导致鸡肉质量受到更大的影响。

应激可使机体内脂质过氧化反应增强，这是应激影响肉品质的主要原因。肉中的脂肪氧化是自由基调节的自动催化反应，由亚细胞膜中的高含量的不饱和磷脂所引发（Gray 和 Perason, 1987）。应激时，机体自由基产生增多、脂质过氧化反应、钙稳态失调以及细胞色素 C 释放，是造成氧化应激增强的主要原因。

自由基与应激过程中的组织损伤、营养物质代谢密切相关，产生于正常生命中，维护正常生命功能，浓度过高引起机体的氧化损伤，使肌细胞膜氧化变性，造成机体吸附水能力降低，大量汗液流出，肉色苍白。应激时，敏感猪体组织中 TBARS 的水平高于正常猪（Duthie 等, 1989）。过氧化物链脱离反应导致结缔组织和可溶性肌肉蛋白广泛变性，部分肌浆蛋白质结合于肌原纤维表面，降低肌原纤维蛋白质的溶解度，其结果近似于 PSE 肉（Boles 等, 1993）。

生理应激（剧烈运动、感染、过热、过冷等）会增加肾上腺皮质释放糖皮质激素，导致组织中的蛋白质和脂肪分解，以提供糖异生的原料，应激促进糖代谢。

1.4.3 脂质过氧化与肉质

动物体内 DNA、脂质和蛋白质的氧化损伤是自由基引发疾病的重要因素。应激时机体抗氧化能力下降或者机体产生自由基的能力异常增高，超过抗氧化体系的承受能力，机体就会积累过多的自由基，从而产生系列对机体的破坏作用。

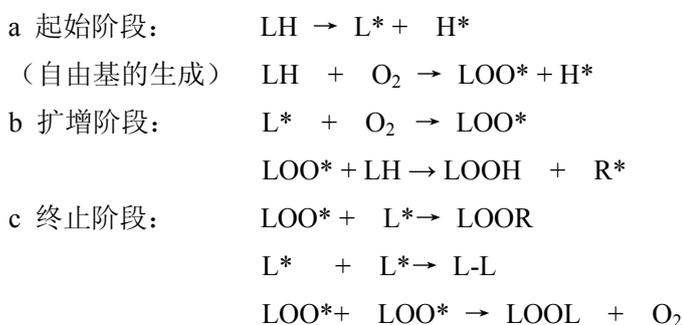
1.4.3.1 体内自由基的清除体系

生物体中的低量活性氧可以被利用，多余的活性氧需要及时清除，否则活性氧会损伤生物膜，引起细胞或组织损伤，产生更多的活性氧，加重损伤。生物体内防御活性氧所致氧化损伤的体系主要为抗氧化酶（SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等）、抗氧化剂（VE、VC、VA、GSH、尿酸、辅酶 Q、 α -硫辛酸、胆红素、血浆铜蓝蛋白、金属硫蛋白等）及与修复有关的损伤或与重新合成有关的体系。

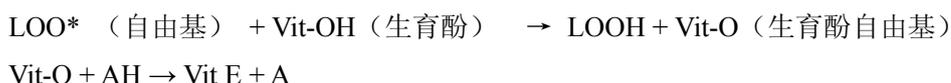
1.4.3.2 自由基、脂质氧化与肉质

自由基具有强氧化作用，可以氧化或过氧化 PUFA，生成 LPO，进而降解成 MDA。生物膜中的脂类主要由 PUFA 组成，极易受到自由基的作用，肉品中 PUFA 的氧化，会导致肉品失色、滴水损失增加，形成酸败和不愉快的气味和味道物质。肉品中的脂肪氧化是自由基调节的自动催化作用，是由亚细胞膜中的不饱和磷脂引发（Gray 和 Pearson, 1987）。宰后肌肉不再能通过血液得到氧，其中的糖原酵解成乳酸，使得肌肉偏酸性，此时动物抗氧化酶系不再起作用，非酶抗氧化体系担任主要抗氧化作用。但宰前营养不足或应激时，肌内的非酶抗氧化体系可能不足，会促进氧化源同 PUFA 的反应，产生自由基，加速氧化反应（Asghar 等, 1988），最终影响肉质。

一般来说，脂质过氧化是自由基攻击 PUFA 的过程，分为三个步骤（Khayat 和 Schwall, 1983）：



ROO* 是一个过氧化自由基，RH 代表 PUFA，一旦反应被启动，就会形成氢过氧化产物（ROOH），继而 ROOH 又被转化为自由基，进一步加速了脂质氧化反应。Matsushita（1977）已从光敏氧化反应的 PUFA 酯中分离出氢过氧化脂质，这种物质在 160℃ 时可分解生成醇、醛、酮和烃等化合物。抗氧化剂（如 VE、VC 等）能通过清除自由基或将其转化为弱活性形式而终止此链式反应：



1.4.4 应激影响肉质的信号传导

应激涉及到机体的神经、内分泌、免疫等系统的一系列活动。应激时机体通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴、交感-肾上腺髓质轴、及下丘脑-垂体-甲状腺轴等三大应激系统的级联反应，改变

机体血清中的某些酶或激素水平，以建立新的热平衡，维持正常的理化功能。机体的适应过程中肾上腺皮质激素起主导作用，其信号传导通路如下：刺激--受体器官--中枢神经系统--垂体--促肾上腺皮质激素-肾上腺皮质部--分泌肾上腺皮质激素--靶组织/器官--应激适应反应（Dickson, 1987）。

1808年，英国化学家 M. Davy 发现了钙（Calcium, Ca）元素。1932年 Chambers 等就发现，肌肉细胞中注射 Ca^{2+} 可以引起肌肉的收缩（Hoyle, 1983），Rasunussen 提出假说认为 Ca^{2+} 作为第二信使媒介细胞的各种反应，它把到达细胞膜表面的电信号和化学信息传递到细胞内的生化机器。此后，随着细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度测定与其它生物化学、生物工程技术的发展，这方面的研究取得了很大的进展。科学家们从各种细胞内发现钙信号及其广泛的调节作用，逐步形成钙生物学。

细胞钙以结合钙(如与带负电的脂质及蛋白质结合)和游离 Ca^{2+} 两种形式存在。细胞内钙 99.9% 以上为结合钙，主要分布在细胞核、线粒体、内质网（Endoplasmic reticulum, ER）/肌浆网和质膜，而游离 Ca^{2+} 极少，细胞在非激活状态时，胞浆内游离钙离子浓度（the intracellular concentration of Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）变化仅为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 左右，约为细胞外的 20 000⁻¹（Clapham, 1995）。细胞兴奋时， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈双相升高（李和旺和韩启德，1996）。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高来自钙库如 ER/SR 内储 Ca^{2+} 的释放和胞外 Ca^{2+} 内流。前者是 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的主要来源，其释放使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度迅速增加达到峰值，调节机制较明了（李和旺等，1995）。后者是使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 保持在平台期及 SR 启动钙诱导的钙释放（ Ca^{2+} induced Ca^{2+} release, CICR）的主要因素之一，机制尚有多处不明。

以细胞 Ca^{2+} 浓度变化为基础的 Ca^{2+} 信号系统，所参与的生理过程非常广泛。国外刊物多以专题形式讨论，如 Ca^{2+} 与细胞有丝分裂（Hepler, 1992）， Ca^{2+} 和 CaM 在细胞运动和行为中的调控作用（Hinrichsen, 1993）、 Ca^{2+} 和 CaM 在细胞核中的功能（Bachs 等，1992）等。概括讲，近年来的研究成果主要反映在以下几个方面：a. 对 Ca^{2+} 所参与的生理过程更深入的研究；b. 对 Ca^{2+} 信号传递系统各组分的分离鉴定以及对其生化性质的研究，包括用经典的生化方法和最近兴起的分子生物学手段；c. Ca^{2+} 信号与其它信号系统的相互作用；d. Ca^{2+} 信号系统中新的信号传递方式（郭艳林和孙大业，1995）。

细胞受到外来化学物质刺激时，细胞膜上的 Ca^{2+} 通道开放，使胞内 Ca^{2+} 浓度升高，通过 CaM 使得 NOS（一氧化氮和酶）激活产生 NO，肌细胞中，NO 的靶酶是鸟苷酸环化酶（Guanylate Cyclase），NO 与其结合后被活化，继而产生肌肉收缩，发生肌肉代谢（图1-1）。

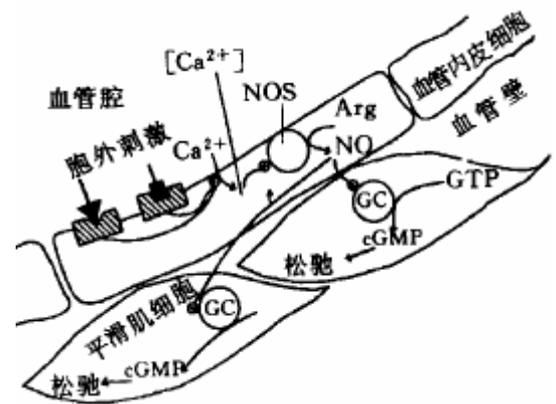


图 1-1 血管内皮平滑肌细胞的 Ca^{2+} 信号转导机制

Figure 1-1 Ca^{2+} influx mechanisms in vascular smooth muscle cells

1.5 应激的模拟

生理应激是动物为保证自己存活，而发生的一系列适应应激状态的反应。应激是人、动物经常遇到的问题，如何减轻应激对动物生产性能的影响，是人们所关心的主要话题。应激模拟是研究应激及应激时动物的反应机理、避免应激、或研究应激的干扰药物具有不可替代的作用，因此

建立合适的动物应激模型，可用于研究动物和人类的应激机理、应激病理及治疗方案，为动物福利和改善动物生产性能提供可靠的方案。

外源刺激时，动物为了抵御这种刺激，机体首先会经历一系列生化反应，最终通过神经（激素）、内分泌（内分泌物）、免疫（抗体等），来维持体内的内环境稳态（氧化与抗氧化稳态、离子平衡等），产生抵御能力或者衰竭死亡，这是建立动物模型的基础。建立模型需要确定可模拟的应激因子、选定试验动物、确定处理方案、选择敏感指标，一个可靠的动物模型需要可重复性好、操作简单方便。

1.5.1 应激源

应激是动物对外界刺激的本能反应，研究的应激源包括：环境因子（热、冷、湿度、有毒气体浓度、辐射、外伤等），疾病因子（腹泻、炎症等），饲养管理（免疫、饲养密度、抓捕、运输、转群等）和心理因子（焦虑、恐慌等，研究较少）等。Puvadolpirod（1997）评估了 110 篇文章，其中涉及 40 个应激因子，试验动物涉及青年肉鸡、日本鹌鹑、火鸡、鸭子和鸽子，以及成年肉鸡、火鸡、日本鹌鹑、鸭子和野鸡。

应激时动物体内一些理化指标产生变化，这些变化的理化指标也可以作为应激因子，反过来刺激动物产生应激。因为应激均有促肾上腺皮质激素（ACTH）的参与，因此以 ACTH 为媒介，通过应激模型的建立，研究有关应激问题，是一个值得探索的方法。近年来关于使用 ACTH 来建立应激模型的研究较多，研究的也较为深入。ACTH 可作为应激源直接调控肾上腺分泌，另外，外源固醇类激素（肾上腺酮（CS）、可的松、CORT、脱氧皮质酮及 DEX 等）也可作为应激源使用。药理性使用 ACTH（Glick, 1961; Davison 等, 1985; Brake 等, 1988; Siegel 等, 1989）；直接使用 ACTH 刺激肾上腺皮质分泌（Garren 等, 1961; Siegel, 1962; Freeman 和 Manning, 1976; Gould 和 Siegel, 1980, 1981; Thaxton 等, 1982），均有助于建立应激模型，研究应激有关问题。Puvadolpirod（1997）总结了 33 篇使用外源 ACTH 研究禽类应激的方案，这些报告中 ACTH 的剂量从 0.25 IU/d（8 d）到 120 IU/kg 体重，每周使用，连用 3 周。使用 ACTH 的途径包括静脉注射、腹腔注射和肌肉注射，载体包括 3 种盐溶液和几种不同浓度的胶溶液。但是这些引起禽类系列给定的应激反应的试验模型，关于 ACTH 的使用途径、剂量、处理时间均没有统一的标准，需要进一步研究。Puvadolpirod 和 Thaxton（2000）提出了一种研究禽类应激的模型，该模型通过皮下埋植的小泵释放 ACTH，获得应激反应，以 8 IU/kg BW/d 的剂量持续 7d 使用 ACTH，是诱导肉仔鸡生理应激反应的最低有小剂量（Puvadolpirod 和 Thaxton, 2000b）。

环境因子（热、冷、湿度、有毒气体浓度、辐射、外伤等）也可用于诱导应激反应。研究环境气候状态变化（热、寒冷处理，Thaxton 等, 1968; Thaxton 和 Siegel, 1970, 1972, 1973; Freeman, 1970; Edens, 1976, 1978; Gould 和 Siegel, 1985; Davis 和 Siopes, 1987）对家禽带来的应激反应较多。因热应激对动物生产造成的影响较大也较为明显，故近年国内关于热应激的文献报道较多，这种应激模型主要通过特制的环控仓（李绍钰, 1999）、温度、湿度等的调整研究家禽的生理变化，或者研究某些添加剂的作用。但此类应激模型的花费较高，标准（温度、湿度、时间等）未统一，且受试验条件的限制。

心理因子（焦虑、恐慌等，研究较少）也可带来动物的应激，动物生存的社会环境（群体密

度等)也是有效的应激因子,研究较多的应激因子包括:社会因素(Siegel, 1959, 1960; Siegel和Gross, 1965; Pesti和Howarth, 1983; Mashaly等, 1984; Craig和Craig, 1985; Craig等, 1986; Smoak和Birrenkott, 1986)和运动约束(Zachariassen和Newcomer, 1975; Freeman和Manning, 1976)。心理因子模拟应激的研究较多,但多用于模拟人的心理变化,以鼠为实验动物。

饲料和饲养管理(断奶、免疫、饲养密度、抓捕、运输、转群等)、饲料营养或者有毒物质(如毒枝菌素和重金属),作为应激源的研究也较多。限饲(Nockels等, 1973; Beuving等, 1989; Kubikova等, 2001),摄入有毒物质(Thaxton等, 1974, 1975, 1982)等均有研究。洪奇华等(1999)研究了温度(27.52~30℃)、饲养密度(22.5~23.5只/m³)和氨气(16~28.2 mg/m³)对肉仔鸡造成的应激,研究表明应激增加血浆CORT浓度。Nijdam等(2005)研究了机械和人工抓捕应激对肉仔鸡血液(肾上腺酮、血浆GLU、乳酸)和肉质(pH、温度、持水力)的影响,研究认为抓捕方式不影响肉质和生化指标。Hambrecht E(2005)研究了驱赶、运输及持续时间对猪的应激,研究表明长期运输会增加肌肉糖裂解潜力和肉中乳酸浓度、降低肉嫩度和亮值,增加电导率。

注射各种药理学试剂,如利血平(王栋等, 2003)、心得安(王玮文, 2004)、去甲肾上腺素(蒋星红等, 2004)、5-羟色胺(刘卫等, 2006),以及左旋多巴(管强等, 2006)等,均可诱导动物产生应激反应,进而研究一些药物的作用效果。

1.5.2 应激因子处理后动物的反应

Siegel(1995)详细描述了应激反应,包括个体反应动力学及天生的生理与代谢的因果关系。与其它动物一样,禽类应激包括一连串的生理适应性反应,但并非像试验模型一样总表现出一套统一的适应性反应;相反,没有任何一篇报道中,同时描述所有的应激反应(Puvadolpirod, 1997),试验模型中的应激反应就更少了。文献调研表明多数此类研究采用的实验动物是青年雄性肉仔鸡,这可能是为了提高血浆CS和增加循环中的异嗜白细胞/淋巴细胞(H/L)比,是禽类应激状态的最敏感的两个指标(Siegel, 1995),而此两指标在青年雄性肉仔鸡表现更为明显。未见以成年肉仔鸡做试验,研究ACTH对肾上腺分泌调控的研究。

ACTH处理后肉仔鸡最常见的生理应激反应见表1-6,没有一个试验中,所有这些参数均受到影响,已有的报道中也未见发生所有的这些应激反应。Thaxton等(1982)研究表明每天注射ACTH,会降低体增重,增加血浆CHOL和总蛋白,降低肾上腺CHOL水平,早期法氏囊的粘液囊萎缩,但血浆GLU、肾上腺相对重量和总肾上腺皮质激素水平未变。Puvadolpirod和Thaxton(2000)的ACTH泵模型的生理变化包括:体重、肝脏水分含量、主要免疫器官(如脾脏、胸腺和法氏囊的粘液囊)相对重量降低,血浆指标(CS、GLU、CHOL、H/L比值)升高,肝脏重量及其脂肪含量升高(Puvadolpirod和Thaxton, 2000a)。

除上述指标外,衡量应激的指标还有血清CPK升高(哈苏荣等, 2005);血浆CK升高(Mitchell和Kettlewell, 1998; Mitchell等, 1992; Hocking等, 1994; Andercock, 2001; 李绍钰, 1999; 林海, 1996; 刘春燕和吴中红, 1996; Sharma和Gangwar, 1986; Ostrowski-Meissner, 1984); H/L值显著增加(Davis等, 2000; McFarlane等, 1989; Mitchel和Kettlewell等, 1998; Maxwell 1993; Mitchell等, 1992; Hocking等, 1999); AKP降低(高树新等, 2002; 刘铀等, 1999; 穆淑琴等, 1996; 刘春燕和吴中红, 1996; 邵莹等, 1992; 蔡玉根等, 1994); 低温时血

浆甲状腺激素浓度增加 (Davis 和 Siopes, 1987), 高温时降低 (傅伟龙等, 2000; 刘铀等, 1999; 黄昌澍, 1983; 张乐平等, 1998); 另外还有研究 LDH 升高 (刘铀等, 1999; 刘凤华, 1997; 林海, 1996; Hocking 等, 1994; Sharma 和 Gangwar, 1986; Ostrowski-Meissner, 1984)、血清 γ 球蛋白降低 (高树新等, 2002) 和 pH 值升高 (Teeter, 1985) 等。

表 1-6 肉仔鸡使用 ACTH 处理后最常见的生理应激反应

Table 1-6 Physiological stress responses in broilers following ACTH treatments

应激反应 Physiological stress responses	文献来源 Sources
肾上腺胆固醇 (CHOL) 消耗 Adrenal cholesterol depletion	Siegel 和 Beane, 1961; Siegel, 1960, 1962a,b; Siegel 和 Siegel, 1966; Nir 等, 1975; Thaxton 等, 1968, 1982
淋巴组织萎缩 Involution of lymphoid tissues	Garren 等, 1960, 1961; Siegel 和 Beane, 1961; Thaxton 等, 1982; Gray 等, 1989
淋巴球减少症 Lymphopenia	Siegel, 1962a; Thaxton 等, 1968, 1974
血浆 CS 升高 Elevation of plasma CS	Siegel, 1968; Beuving 和 Vonder, 1978, 1986; Edens 和 Siegel, 1975; Beuving 等, 1989
血浆 GLU 升高 Elevation of plasma glucose	Siegel 和 Beane, 1961; Siegel, 1962a,b
血浆 CHOL 升高 Elevation of plasma CHOL	Siegel 和 Siegel, 1966; Siegel, 1968
体液和细胞的免疫抑制 Immunosuppression of humoral and cell-mediated immune responses	Thaxton 等, 1968; Thaxton 和 Siegel, 1970, 1972, 1973; Siegel 等, 1983; Murray 等, 1987a,b

1.5.3 应激反应模型的建立与敏感指标

1.5.3.1 应激反应模型的建立

模型应具备处理精密、可操作性强、高可重复性, 能预测处理后, 随时间变化动物将发生的适应性变化。因此一个模型应包括, 选择的动物及其所处生理阶段; 应激因子及其使用方法、强度、持续时间; 动物随后发生的随时间变化的不同适应性反应, 包括应激对生产和代谢的影响等。

Puvadolpirod 和 Thaxton (2000a,b,c,d) 研究了通过小型渗透泵持续释放 ACTH 的应激模型及对照的确认 (Puvadolpirod 和 Thaxton, 2000a), 得出结论最小反应剂量是连续 7 天使用 8 IU/kg BW/d 的 ACTH, 研究表明 2h 后血浆 CS 提高; 12h 血浆 GLU 升高; 18h 肝脏重量伴随肝脏脂肪增加, 而肝脏水分含量降低; 24h, 脾脏相对重量降低; 2d 后 H/L 比值升高; 4d, BW 和法氏囊和胸腺的粘液囊相对重量降低; 12d 肝脏蛋白含量降低。ACTH 处理其间, 采食量有所升高; 但是饮水量和排泄显著升高。并且, ACTH 引起动物很多营养素的消化率降低。应激后, 动物对营养素的吸收降低, 采食量也降低。显然, 应激家禽已经建立了一套新的采食量设定点, 7d 的恢复期不足以恢复损失的体重, 损失的大部分体重用于骨骼肌的糖异生。

该应激模型是描述适应性反应的可预测模型, 主要应激反应该模型的应激反应包括血浆 CS、GLU、CHOL、TG、HDL、TCP、相对肝脏重和肝脏脂肪增加, 以及 H/L 比值升高, 体重和胴体重降低, 免疫生化器官 (脾脏、胸腺、法氏囊的粘液囊) 萎缩、ACTH 的放射测定, 应激模型的反应, 包括消化和代谢 (对出于应激的动物没有得到充分的研究), 并且该模型还描述了这些应激反应随时间的变化。该模型提供了方便的方法来确保应激状态适应, 而连续的层叠应激反应, 影

响了动物对饲料的利用、动物健康和生产效率。

1.5.3.2 应激反应的敏感指标

关于应激时家禽的生理反应,已有广泛的研究。那么哪些指标对应激反应最为敏感,这些敏感指标在应激处理后何时出现,均为应激模型所阐述清楚。

测定 CS 的精细化学技术及广泛应用,使得 CS 成为敏感且可信的禽类应激反应的敏感指标。有很多试验研究了多种应激条件下禽类的血液 CS 升高 (Marshaly 等, 1984; Hocking 等, 1999; Smith 和 Dobson, 1990; Littin 和 Cockrem, 2001; Kannan 等, 1997a, b; Mitchell 等, 1999)。H/L 值是众多反应家禽应激指标中比较好的指标 (Gross 和 Siegel, 1983; Gross, 1989), 在换羽 (Davis 等, 2000)、氨气、电击和热 (McFarlane 等, 1989)、运输+热 (Mitchel 和 Kettlewell 等, 1998; Maxwell, 1993; Mitchell 等, 1992) 的应激模型中均检测到了 H/L 值的增加。

Thaxton 和 Puvadolpirod(2000)分别以处理反应比(某一指标的处理组与对照组数据的比值),与 P 值得分 ($P < 0.01$ 得 4 分; $0.05 > P > 0.02$, 得 2 分; $P < 0.05$, 得 1 分) 的乘积,来计算应激反应得分,从而评估某一指标是否敏感。根据计算结果作者排序了前 10 个应激敏感指标,血浆 CS (124.4)、GLU (13.2)、肝脏脂肪含量 (10.92) 相对肝脏重量 (9.36)、H/L 比值 (9.08)、可消化含氮化合物 (8.68)、总排泄物 (8.28)、HDL (8.00)、饮水量 (8.00)、CHOL (7.08)。

1.5.4 应激时动物的生产性能与代谢

Siegel 和 Van Kampen (1984) 详细研究了 CS 对肉仔鸡的消化和代谢的影响。应激会影响动物福利、生长和繁殖,应激禽类的血浆 CS 升高,使用 ACTH 处理动物 (Siegel, 1968; Davison 等, 1985; Davis 和 Siopes, 1989), CS (Siegel 和 Van Kampen, 1984; Donker 和 Beuving, 1989), 或者限饲 (Weber 等, 1990) 导致的应激均如此。血浆 CS 水平的升高,会作用于碳水化合物、蛋白和脂肪的中间代谢,而引起能量水平的升高。CS 的一个重要作用是催化肉蛋白分解,增加 GLU 产量。肌蛋白分解直接受 CS 激活的糖异生驱动。糖异生期间,血浆 GLU 水平升高,伴随有尿酸排泄增加 (Siegel 和 Van Kampen, 1984; Davison 等, 1985)。

CS 除影响碳水化合物和蛋白代谢外,还影响脂肪代谢。Siegel 和 Van Kampen (1984) 研究表明,在肾上腺皮质激素调控禽类糖异生期间,随蛋白分解的增加,因为能量滞留增加,而使得能量吸收效率降低。若忽略尿能损失,这里的能量吸收可理解为 ME。因此应激期间,在生长降低的同时,体脂肪含量升高 (Nagra 和 Meyer, 1963; Siegel 和 Van Kampen, 1984)。

总之,使用 ACTH 制造肉鸡应激模型研究的比较详细和系统,但其它激素、日粮因素等,未来需要研究肉仔鸡应激反应随时间的变化,尤其是一个反应的发生,在时间上与另一个反应发生的关系如何,应激反应随时间的变化等方面均需要进一步研究。

1.6 本研究的立项依据、技术路线和主要研究内容

综上所述,较多学者研究了不同营养素对肉品质的影响 (Young 等, 2004), 有些亦涉及饲养密度、饲养环境等应激因素对肉品质的影响 (Dawkins 等, 2004; Debut 等, 2003; Gentry 等, 2004; Young 等, 2003)。关于应激对动物肌肉品质的影响往往仅着眼于缓解应激对动物生产性能和肉品质的影响,偶尔会将肉的感官指标与肌肉的生理生化、机体的神经内分泌相联系 (李德

发, 2004)。

应激是一个复杂的全身性、系统性反应, 可能与动物种类、性别、所处生理阶段, 应激强度、持续时间、日粮等因素有关。肉仔鸡应激强度的确定, 是判断应激结果和人为制造应激的前提, 当前肉仔鸡应激强度的确定没有统一客观性的衡量指标或数学模型。应激判定标准的不同是造成各位学者所得出的应激对肉质影响结论不同的原因, 因此有必要就应激时间、应激条件以及应激时动物体内血液、肉质等有关指标的综合评估, 建立适于模拟不同应激状况的动物模型, 为进一步研究各种应激源(温度、湿度、饲养密度、断奶、换群、宰前运输等)影响肌肉组织与脂肪组织养分分配的可能网络通路及其神经内分泌机制提供科学依据。

本研究围绕肉仔鸡应激模型的建立, 首先在研究屠宰致晕方法对肉仔鸡影响的基础上, 利用体外激素导入方式, 建立了动物急性和慢性应激模型, 研究了应激对动物生理生化反应和肉质的影响; 通过受体阻断试验研究, 建立了应激严重程度的动态评价方案以及氧化应激的评判指标; 根据激素、肉质、氧化应激敏感指标, 建立了细胞氧化的应激模型, 研究了激素变化对细胞活性、细胞钙离子浓度变化的影响, 初步探讨了 GC 对肉质的影响及其信号传导通路, 利用抗氧化剂验证了所建立细胞氧化应激模型的可行性。本论文的技术路线和主要研究内容见图 1-2。

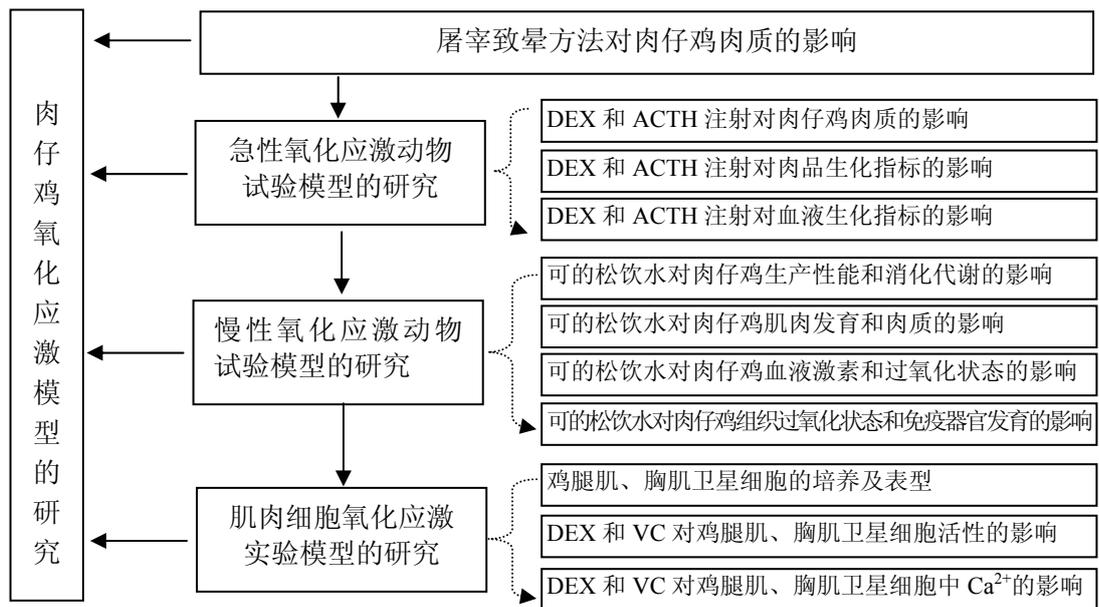


图 1-2 研究路线和研究内容

Figure 1-2 Technical route of the Study

第二章 急性氧化应激动物试验模型的研究

动物试验中自然条件下的应激,会因为应激源不稳定,应激强度、时间,动物的饲养管理等受到一定的影响;因此试验中多通过人为因素来模拟动物应激状态,尤以通过环控仓来定量模拟生产条件下的高温、高湿、高密度、低温等研究,但类似的研究设备投入成本较高,因为设备设施复杂,系统误差可能会较大,另外动物需要饲养到一定生理阶段后才能进入试验仓,动物的运输也会带来较大的应激,总之,其局限性较大。

动物受到应激(热、冷等)时,血中促肾上腺激素(ACTH)浓度会迅速增加,糖皮质激素(GC,血清皮质醇、酮)和儿茶酚胺也相应明显升高(Ben Nathan 等, 1976; Marshaly 等, 1984; Gould 和 Siegel, 1985; Davis 和 Siopes, 1987; Smith 和 Dobson, 1990; Devhim 和 Teeter, 1991; 杜荣和顾宪红, 1995; Geraert 等, 1996; Mitchell 等, 1997; Kannan 等, 1997a, b; Hocking 等, 1999; 刘铀等, 1999; Littin 和 Cockrem, 2001)。除 ACTH、GC 与儿茶酚胺的分泌增加外,在应激反应中, β -内啡肽、生长素、催乳素、抗利尿激素、胰岛素及醛固酮等均可增加。

由于应激时动物的共同反应是血液中 GC 升高,且 GC 的分泌与应激强度(量、时间)呈一定的比例关系,但动物不同组织的反应可能不同,于是人们试图通过 GC 或 ACTH 的注射或口服来模拟动物的应激状态。但能否通过肌肉注射 ACTH 的刺激动物分泌 GC,来建立动物应激模型,以便于进一步研究应激对肉质的影响;直接注射 DEX 在医学上常用于疾病治疗,能否通过 DEX 的注射建立氧化应激模型;另外, Ru486 是阻断 GR 的主要机制,通过肌肉注射 ACTH、DEX、Ru486 对肉仔鸡肉质和有关生化指标随着屠宰后的时间的变化的动态变化,从肉质变化的角度,直接研究通过建立肉质影响的氧化应激模型,未见报道。因此,本研究拟选择适宜的激素和适宜的能在体内刺激这些激素发生反应的体外注射剂(ACTH、DEX 等)方式,建立氧化应激模型;在建立应激模型的基础上,检测鸡肉质有关指标(pH 值、剪切力、滴水损失等)的变化,并与血清生化指标(如血清皮质激素、血糖,尿酸和胆固醇等)、抗氧化指标(血清 MDA、GSH、SOD 等)的变化进行比较,以便建立激素浓度与血液抗氧化指标和肉质之间的关系,探讨激素对肉鸡内分泌、肉品质、代谢方面的影响,为研究禽类应激的机制提供理论依据。

2.1 材料与方方法

2.1.1 主要试剂

ACTH 购自上海子能制药有限公司(批号: 24P051204, CAS NO. 16960-16-0, EP5.0, 800IU/mg); PVA (polyvinyl alcohol, 型号: 1788, 聚乙烯醇, CAS No.: 9002-89-5, 北京有机化工厂敬赠) 12g 溶于 100g 蒸馏水中; Ru486 (批次: 20060119, $C_{29}H_{35}NO_2$ 含量大于 98.5%, 购自北京紫竹天工科技有限公司), 用 12%PVA 溶解; 地塞米松磷酸钠注射液(5mg/ml, 天津药业焦作有限公司生产, 批号: 06022011)。

2.1.2 试验动物分组

选 21d 体重相近的健康肉仔鸡公雏 210 只, 随机分成 7 组, 每组 3 个重复, 每重复 10 只, 29d 分别于腿部肌注 DEX (6 mg/kg BW) 或 ACTH (6 IU/kg BW) 或生理盐水 (1 mL/只), 每个处理或注射米非司酮 (Ru486), 或不注射, 对照组不做任何处理(表 2-1); 40d 重复上述过程。

表 2-1 试验的处理设置 Table 2-1 Arrangement of experimental treatments

项目 Item	对照 Contrast	生理盐水 PSS		地塞米松 DEX	促肾上腺皮质激素 ACTH		
处理 Treatment	1 (C)	2 (PSS)	3 (R+PSS)	4 (D)	5 (R+D)	6 (A)	7 (R+A)
注射 Injection	-	1 mL/只	1 mL/只	6 mg/kg	6 mg/kg	6 IU/kg	6 IU/kg
Ru486	-	-	50 mg/kg	-	50 mg/kg	-	50 mg/kg

注: D, DEX, Dexamethasone, 地塞米松磷酸钠注射液 (含 DEX 5mg/ml);

A, ACTH, Adrenocorticotrophic Hormone, 促肾上腺皮质激素;

R, Ru486, mifepristone, 米非司酮; S, PSS, Physiological saline solution, 生理盐水。

2.1.3 样品采集

分别于处理后 4、8、12 和 24 h 心脏采血 (40d 仅测定 4、12 和 24h), 每次每重复取 1 只鸡采血, 每只采血 10 mL, 其中 5 mL 制血浆 (3.8% 柠檬酸钠抗凝, 1 份抗凝剂+9 份血), 5mL 制血清。血浆在采血后经 3 000 r/min (1800g) 离心 20 min 获得, 立即保存于-20℃中备用; 血清在采血后静置 2h 经 3 000 r/min (1800g) 离心 10 min 获得, 立即保存于-20℃中备用。

采血后分别于处理后 4、8、12 和 24 h 屠宰试鸡, 取肝脏、心脏、右侧胸肌和腿肌, 液氮速冻后, 于-20℃的冰箱中冷冻保存; 再取右侧胸肌和腿肌, 于-4℃的冰箱保存, 备测有关肉质指标。检测前解冻, 制成 10%匀浆, 进行各种生化指标测定。

2.1.4 有关指标测定

pH 值 肉鸡屠宰后 1h 和 24h, 分别用 KL-013 型高精度酸度计测定屠体肌肉的 pH 值, 用手术刀在两侧胸肌和两个腿肌分别刺口, 将测定探头埋于 (约 2cm) 下, 两次测定用同一创口。

滴水损失 肉鸡屠宰后取右侧胸大肌和腿大肌的中间部分, 分别修整成长×宽×厚为 55×50×15 mm³ 和 50×45×11 mm³ 的长方体后称重 (W₁), 然后用铁丝钩住肉样的一端, 使肌纤维垂直, 装入充气的塑料袋中, 封口, 肉样不与袋壁接触, 扎好袋口, 悬挂于 4℃冰箱中, 放置 24h 后, 取出肉样称重 (W₂)。计算滴水损失 (%) = (1-W₂/W₁) × 100。

剪切强度 取肉样置于自封口塑料袋中, 放于 80℃水浴中, 待肉样中心温度达 72℃后, 取出肉样, 修整成 50×10×10 mm³ 的长方体, 用型号为 TA-XT2i/25 的力学结构分析仪 (Texture Analyzer) 测定剪切力 (g), 记录运行时间 (s) 和距离 (mm), 每个样品测定 3 个数据, 剪切力/时间/距离即为剪切强度。

组织匀浆蛋白含量 采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒, 在 CHEM-5 半自动生化分析仪 (北京生化分析仪器厂) 上测定。

组织抗氧化指标 心脏、肝脏、肌肉组织 GSH-Px、T-SOD、MDA, 均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒, 在 CHEM-5 半自动生化分析仪 (北京生化分析仪器厂) 上测定。

血清抗氧化指标 血清谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性、过氧化氢酶 (CAT) 活性、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 含量均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒, 在 CHEM-5 半自动生化分析仪 (北京生化分析仪器厂) 上测定。

肌酸激酶 (CK) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性 细胞膜受到自由基造成的损害而具有高水平的血浆丙酮酸激酶和肌酸激酶活性 (Duthie 等, 1987)。根据 CK 试剂盒说明书要求, 用肌酸显色法测定肌酸激酶 (CK) 含量, 利用比色法检测天冬氨酸转氨酶活性。CK 试剂盒和天冬氨酸

转氨酶（AST）试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

其它生化指标 血糖（GLU）采用酶连续检测法；总蛋白（TP）采用双缩脲法；白蛋白（ALB）采用溴甲酚绿法；尿酸（UA）采用尿酸酶-过氧化物酶法。在CHEM-5半自动生化分析仪（北京生化分析仪器厂）上测定。

2.1.5 数据处理与统计

采用 SAS6.12 软件 PROC ANOVA 程序进行统计分析，用 LSD（最小显著极差）法对差异显著的数据进行多重比较。

2.2 结果与分析

2.2.1 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉质影响的研究

宰后肉的代谢仍未停止，其中糖原酵解使肉 pH 值降低。宰前应激时，动物为抵御应激，而动肉中储存的糖原，造成 pH₁ 过低，同样会影响到 pH₂₄，从而影响肉品的成熟。DP 是表明肉品持水力（WBC）的一个指标，DP 大则 WBC 小。屠宰后肉品剪切力来表示肉品嫩度变化，本研究用剪切强度（kg/s/mm）来表示。

2.2.1.1 对肉品 pH 值的影响

注射 PSS、DEX 和 ACTH 后肉 pH 值均低于对照组（表 2-2），同时相应注射 Ru486 后，肉品 pH 值比相对应的不注射组均有所升高，但数值仍低于对照组；其中注射 ACTH 组的 pH 值最低，显著低于其它处理组（DEX 组除外，P<0.01），对照组 pH 值最高，显著高于其它处理组（P<0.01）；注射任何物质，对肉仔鸡来说均是一种应激，即使注射 PSS，因为有抓捕、固定、注射等程序，也造成了肉仔鸡的应激，并且对于注射 PSS 来讲，Ru486 的注射还在一定程度上有 pH 值降低的作用。因为 Ru486 竞争性地与 GR 的结合，阻止了 GC 引起的肌肉细胞中的葡萄糖代谢成乳酸，从而保持了肌肉细胞的正常 pH 值，维持了肉品的正常代谢。现有的处理均影响了宰后肉品的 pH 值，对 pH 降低的次序依次为：ACTH、DEX、PSS；同时注射 Ru486 可以缓解因这些药物的注射而引起的肌肉 pH 值的不正常变化。

表 2-2 激素处理对肌肉 pH 的影响 Table2-2 Effect of treatments on pH value of broiler meat

项目, Item	n	对照, C	PSS	R+S	DEX	R+DSX	ACTH	R+ACTH	P value
29 day 胸肌 BM	98	6.13±0.14 ^{aA}	5.98±0.097 ^{bBC}	6.10±0.090 ^{aAB}	5.84±0.11 ^{cD}	6.07±0.15 ^{abAB}	5.89±0.14 ^{cCD}	6.10±0.10 ^{aA}	0.0001
29 day 腿肌 TM	98	6.31±0.10 ^{aA}	6.18±0.080 ^{bB}	6.30±0.094 ^{aA}	6.05±0.093 ^{cC}	6.27±0.12 ^{aAB}	6.04±0.11 ^{cC}	6.29±0.078 ^{aA}	0.0001
40 day 胸肌 BM	84	6.02±0.11 ^{aA}	5.89±0.082 ^{aA}	5.97±0.090 ^{aA}	5.83±0.12 ^{bBC}	6.00±0.094 ^{aA}	5.78±0.084 ^{bC}	5.96±0.093 ^{aA}	0.0001
40 day 腿肌 TM	84	6.22±0.044 ^{aA}	6.19±0.067 ^{aA}	6.29±0.092 ^{aA}	6.04±0.071 ^{bBC}	6.25±0.049 ^{aA}	6.00±0.081 ^{bC}	6.26±0.085 ^{aA}	0.0001

a, b, c: 同一行肩标无相同字母者差异显著 (p<0.05)。下同。

a, b, c: Means within a row with no common superscripts differ significantly (p<0.05) .

A, B, C: 同一行肩标无相同字母者差异显著 (p<0.01)。下同。

A, B, C: Means within a row with no common superscripts differ significantly (p<0.01) .

BM: breast muscles; TM: thigh muscles。下同。

C: contrast; S: normal salt; R: Ru486, mifepristone; R+S: Ru486+normal salt; DSX: Dexamethasone; R+DSX: Ru486+DSX; ACTH: Adrenocorticotrophic Hormone; R+ACTH: Ru486+ACTH。下同。

此外, 29d 屠宰肉仔鸡的 BM 和 TM 的 pH 分别为 6.01 ± 0.16 和 6.21 ± 0.14 ($P=0.0001$), 40d 屠宰 BM 和 TM 的 pH 值分别为 5.92 ± 0.13 和 6.18 ± 0.12 ($P=0.0001$), pH 值 $TM>BM$ ($P<0.01$)。TM 属于运动性骨骼肌, 其中糖原含量较高; BM 仅作为能量和蛋白质的储存器官, 在应激时, 更易被动物体动员用于供能。29d 与 40d 的肉品 pH 值分别为 6.11 ± 0.18 和 6.05 ± 0.18 ($P=0.0028$), 屠宰日龄低则 pH 值高 ($P<0.01$)。可能是由于低龄动物抵御应激的能力有限。

本研究可见, 注射 ACTH、DEX 和 PSS 均降低了肉品 pH 值, 同时注射 Ru486 后这种肉品质的不正常得到了缓解, 但未恢复到未注射的状态。pH 值 $LM>BM$ ($P<0.01$); 29d 屠宰的肉品 pH 值显著高于 40d。激素的注射处理对肉品的 pH 值有一定的影响。

2.2.1.2 激素处理对肌肉滴水损失 (drip loss, DP) 的影响

表 2-3 处理对肌肉 DP 的影响 Table2-3 Effect of treatment on drip loss of meat

项目, Item	n	对照, C	PSS	R+S	DEX	R+DEX	ACTH	R+ACTH	A P ¹ value
29 day 胸肌 BM	56	11.46 ± 1.10^{dC}	13.60 ± 1.00^{bcB}	12.89 ± 1.82^{cBC}	17.19 ± 0.88^{aA}	13.09 ± 1.87^{bcBC}	18.15 ± 0.97^{aA}	14.44 ± 1.40^{bB}	14.40,0.0001
29 day 腿肌 TM	56	13.74 ± 1.16^{cB}	15.42 ± 1.26^{bB}	14.72 ± 0.92^{bcB}	19.39 ± 1.71^{aA}	14.84 ± 1.30^{bcB}	19.55 ± 1.38^{aA}	14.97 ± 1.82^{bcB}	16.09,0.0001
40 day 胸肌 BM	42	10.09 ± 0.93^{dD}	13.06 ± 1.73^{bcB}	10.40 ± 1.38^{dCD}	15.83 ± 2.34^{aA}	11.41 ± 1.36^{cdBCD}	12.62 ± 0.75^{bcBC}	13.68 ± 1.98^{bAB}	12.44,0.0001
40 day 腿肌 TM	42	13.06 ± 1.49^{cB}	14.85 ± 0.95^{bcB}	13.23 ± 1.03^{cB}	17.68 ± 1.99^{aA}	13.54 ± 1.18^{bcB}	15.13 ± 1.65^{bB}	15.09 ± 2.25^{bB}	14.66,0.0002

A, B, C, D, a, b, c, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-2。Same as table 2-2.; A,P:Average, P value; 平均值和 P 值。

注射 PSS、DEX 和 ACTH 后肉品 DP 均大于对照组 (表 2-3), 同时相应注射 Ru486 后, DP 比相对应的不注射组均有所降低, 但数值仍高于对照组; 其中注射 DEX 和 ACTH 组的 DP 最大; 29d 屠宰时, 两处理组均极显著高于其它处理组 ($P<0.01$), 40d 屠宰 DEX 注射仍极显著高于其它处理组 ($P<0.01$), 而 ACTH 注射, 并未显著增加 DP; 同时注射 Ru486, 改善了因注射 DEX 而增加的 DP, 29d 屠宰注射 Ru486, 均显著改善了因注射 DEX 和 ACTH 而造成的 DP 增加 ($P<0.01$), 而 40d 屠宰 ACTH 注射未显著引起 DP 增加, 作用不明显, 但对 DEX 注射导致的 DP 的增加改善显著 ($P<0.01$); Ru486 对因 PSS 注射而增加的 DP 的改善作用有限 ($P>0.05$)。总之, 注射 DEX 和 ACTH 以及生理盐水均影响了肉品 DP, 同时注射 Ru486 后, 这种增加均得到了改善, 提示我们宰前应激时, 血液 GC 增加, 导致宰后肉品 DP 的变化, 通过肌注激素的方法可以作为研究应激对肉品 DP 影响的手段。另外, 29d 屠宰的 DP 高于 40d (15.24 ± 2.71 和 13.55 ± 2.49 , $P=0.0001$)。动物的年龄越小, 其肌肉水分含量越高, 肉细胞壁越容易破裂而失去其中的水分。

29d 处理后 4、8、12 和 24h 后屠宰, 肉的 DP 均无显著差异 (表 2-4), 但注射后 12h 屠宰的肉 DP 偏高, 24h 屠宰的 DP 有所降低, 各处理之间 DP 的变异较大, 是造成屠宰时间间 DP 差异不显著的原因; 40d 处理的肉 DP 以处理后 24h 最高, 显著高于 4h 屠宰 ($P<0.01$), BM 的 DP 随处理后屠宰时间的变化呈线性增加趋势, 而 LM 激素处理后 8h 和 24h 屠宰的肉品 DP 没有差异 ($P>0.05$)。以本研究处理的剂量, 激素处理后 12~24h 可能是激素发挥作用的区间。但是本研究未作激素处理 24h 以后有关肉质指标, 需要进一步研究激素处理后的具体发挥作用的时间区间, 以便更好的模拟应激。

可见, 激素注射处理对肉品 DP 有一定影响。注射 DEX 和 ACTH 及 PSS 均影响了肉品 DP, 同时注射 Ru486 后, 这种增加均得到了改善, 但未恢复到未注射的状态; 注射 DEX 和 ACTH 组的 DP 最大, 29d 屠宰时, 两处理组均极显著高于其它处理组 ($P<0.01$), 40d 屠宰 DEX 注射仍极

显著高于其它处理组 ($P<0.01$)。激素处理后屠宰时间的长短 (4h、8h、12h 和 24h)，29d 处理各时间段处理均未见显著差异 ($P>0.05$)，40d 处理组激素处理后 12h 肉品 DP 显著增加，尤以 BM 表现明显 ($P<0.01$)；滴水损失 $LM>BM$ ($P<0.01$)；29d 屠宰的肉品 DP 显著高于 40d ($P<0.01$)。

表 2-4 处理时间对肌肉 DP 的影响 Table2-4 Effect of treatment on drip loss of broiler meat

处理后时间 Hours from injection to slaughter		4h*	8h*	12h*	24h*	P value
29d n=56	胸肌, BM	14.97±2.76	13.57±2.99	15.11±2.32	13.95±2.16	0.3138
	腿肌, TM	15.69±1.96	16.08±2.17	16.39±2.34	16.21±3.69	0.9101
40d n=42	胸肌, BM	11.25±1.84 ^{bb}	12.27±1.80 ^{abAB}	-	13.81±2.78 ^{aA}	0.0129
	腿肌, TM	13.56±1.31 ^b	15.19±1.88 ^a	-	15.21±2.57 ^a	0.0517

A, B, a, b, c, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-2。 Same as table 2-2.

*: 注射到屠宰的时间 The time from injection to slaughter.

2.2.1.3 对肉品嫩度的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后肌肉的剪切强度均高于对照组 ($P<0.01$, 表 2-5)，同时相应注射 Ru486 后，剪切强度比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$)，但数值仍高于对照组 ($P>0.05$)；其中注射 ACTH 组剪切强度最高，DEX 和 PSS 注射处理组依次降低，3 处理间差异不显著 ($P>0.05$)；3 个注射 Ru486 处理组的肉品剪切强度均未见显著差异 ($P>0.05$)，但高于对照组。3 种注射剂均可影响肉品的剪切强度，注射 Ru486 后均得到了改善。因为 Ru486 竞争性地与细胞膜内 GR 的结合，阻止了 GC 的结合，阻止了 GC 引起的肌肉细胞中的葡萄糖代谢成乳酸，从而保持了肌肉细胞的正常 pH 值，维持了肌肉的正常代谢，因此会改善肉品的剪切强度。现有的处理均影响了宰后肉品的剪切强度，对剪切强度升高的次序依次为：ACTH、DEX、PSS。另外，29d 屠宰肉仔鸡的 BM 和 TM 剪切强度分别为 $55.40±11.18$ 和 $86.19±15.76$ ($P=0.0001$)；40d 屠宰 BM 和 TM 的剪切强度分别为 $95.51±18.68$ 和 $109.83±24.49$ ($P=0.0001$)；剪切强度： $LM>BM$ ($P<0.01$)；40d 屠宰鸡肌肉的剪切强度显著高于 29d ($102.67±22.89$ 和 $75.93±20.45$, $P=0.0001$)，屠宰日龄低则剪切强度高。

表 2-5 处理对肌肉剪切强度的影响 Table2-5 Effect of treatment on shear strength of broiler meat

项目, Item	n	对照, C	PSS	R+S	DEX	R+DEX	ACTH	R+ACTH	A P ¹ value	
29 day	胸肌	84	46.10	69.66	47.69	62.86	51.12	62.77	47.63	55.40
	BM		±2.49 ^{cb}	±12.64 ^{aA}	±6.44 ^{cb}	±3.56 ^{ba}	±4.52 ^{cb}	±10.44 ^{ba}	±2.79 ^{cb}	0.0001
	腿肌	168	66.85	91.04	75.10	104.32	80.52	106.59	78.91	86.19
	TM		±6.83 ^{ed}	±7.70 ^{bb}	±7.02 ^{dc}	±9.09 ^{aa}	±7.58 ^{cc}	±7.57 ^{aa}	±6.36 ^{cd}	0.0001
40 day	胸肌	126	76.89	107.68	82.66	113.49	86.01	118.77	82.29	94.67
	BM		±13.96 ^D	±4.97 ^B	±4.29 ^{CD}	±12.49 ^{AB}	±12.33 ^C	±9.37 ^A	±5.10 ^{CD}	0.0001
	腿肌	130	86.64	126.58	89.18	134.42	98.15	136.39	96.79	109.83
	TM		±11.55	±12.29	±8.13	±23.88	±10.42	±17.03	±7.10	0.0001

A,B,C, a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-2。 Same as table 2-2.

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

随处理后屠宰时间的延长，肌肉剪切强度增加趋势明显 (表 2-6)。29 日龄屠宰，其 12h 和 24h 的肌肉剪切强度均显著高于 4h 和 8h ($P<0.01$)；虽然 4h 和 8h，以及 12h 和 24h 之间差异不

显著, 但处理后 4h 屠宰到 24h 屠宰的肉品剪切强度增加明显; 40 日龄屠宰的结果趋势相同, 24h 屠宰的肌肉的剪切强度显著高于 12h 和 4h ($P<0.01$), 这种差异在腿肌表现得更为明显。

可见, 注射 ACTH、DEX 和 PSS 均增加了肉品剪切强度, 同时注射 Ru486 后这种肉品质的不正常得到了缓解, 但未恢复到未注射的状态; 腿肌的肌肉剪切强度显著高于胸肌 ($P<0.01$); 40 日龄屠宰鸡肌肉的剪切强度显著高于 29 日龄 ($P<0.01$); 随着处理后屠宰时间的延长, 肌肉剪切强度增加趋势明显。

表 2-6 处理时间对肌肉剪切强度的影响 Table 2-6 Effect of treatment on shear force of broiler meat

处理后时间 Hours from injection to slaughter		4h*	8h*	12h*	24h*	P value
29d n=56	胸肌, BM	52.40±5.89 ^b	58.41±14.15 ^a	-	-	55.40,0.0130
	腿肌, TM	80.66±13.40 ^{cB}	84.33±15.81 ^{bcAB}	87.31±18.62 ^{abAB}	92.45±12.60 ^{aA}	86.19,0.0049
40d n=42	胸肌, BM	92.24±19.38 ^B	-	90.25±15.88 ^B	104.19±17.82 ^A	95.51,0.0008
	腿肌, TM	96.36±17.09 ^{cB}	-	110.17±19.72 ^{bA}	122.64±28.12 ^{aA}	109.83, 0.0001

A,B; a,b,c, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-2。Same as table 2-2.

*: 注射处理到屠宰的时间; The time from injection to slaughter;

#: 平均值和 P 值; The average value and P value.

2.2.2 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉品生化指标影响的研究

2.2.2.1 对组织匀浆中蛋白含量的影响

应激时肌肉蛋白合成代谢减弱、分解代谢增强, 糖原的摄取和合成率降低, 造成可溶性蛋白增加流失, 骨骼肌质量下降。测定组织匀浆中水溶性蛋白含量的变化, 能初步反应动物受到应激的程度。

2.2.2.1.1 激素注射对胸肌匀浆中蛋白含量的影响

表 2-7 处理对肉仔鸡在胸肌 10% 匀浆蛋白含量 (g/L) 的影响

Table 2-7 Effect of DEX and ACTH on protein content in breast meat of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄, Slaughter day		注射处理后的时间, Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	0.952±0.069 ^{dB}	0.937±0.086 ^{cDB}	0.913±0.033 ^{abAB}	0.964±0.008 ^{eD}	1.034±0.034 ^{dC}	0.883±0.066 ^b
PSS	1.782±0.46 ^{abcA}	1.200±0.21 ^{abAB}	1.046±0.093 ^{aA}	2.129±0.038 ^{bcABC}	1.695±0.29 ^{abAB}	1.559±0.53 ^a
R+S	1.440±0.40 ^{bcAB}	0.999±0.25 ^{bcdAB}	0.808±0.12 ^{bB}	1.918±0.058 ^{cdBC}	1.444±0.22 ^{abcABC}	1.167±0.16 ^{ab}
DEX	1.915±0.54 ^{aA}	1.138±0.15 ^{abcAB}	1.047±0.15 ^{aA}	2.367±0.066 ^{aA}	1.741±0.49 ^{aAB}	1.564±0.55 ^a
R+D	1.389±0.39 ^{cAB}	0.901±0.20 ^{dB}	0.775±0.10 ^{bB}	1.868±0.17 ^{dC}	1.247±0.13 ^{cdBC}	1.174±0.34 ^{ab}
ACTH	1.856±0.53 ^{abA}	1.268±0.27 ^{aA}	1.034±0.11 ^{aA}	2.244±0.083 ^{abAB}	1.845±0.29 ^{aA}	1.613±0.54 ^a
R+A	1.416±0.45 ^{cAB}	0.994±0.12 ^{bcdAB}	0.866±0.032 ^{bAB}	2.017±0.14 ^{bcdBC}	1.310±0.23 ^{bcdABC}	1.138±0.16 ^{ab}
A, P [#]	1.5358, 0.0005	1.0626, 0.0160	0.9271, 0.0015	1.9296, 0.0001	1.474, 0.0036	1.2999, 0.0974

BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-2。Same as table 2-2.

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

a, b, c: 同一列肩标无相同字母者差异显著 ($p<0.05$)。下同。

a, b, c: Means within a column with no common superscripts differ significantly ($p<0.05$) .

A, B, C: 同一列肩标无相同字母者差异显著 ($p<0.01$)。下同。

A, B, C: Means within a column with no common superscripts differ significantly ($p<0.01$) .

与对照组相比,注射 ACTH、DEX 和 PSS 后,胸肌蛋白含量显著升高 ($P<0.01$, 表 2-7),三处理差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后,蛋白含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.05$),但数值仍高于对照组 ($P<0.05$); 与对照组相比,注射 PSS 反而使得肌肉蛋白含量升高 ($P<0.01$),虽低于 DEX 和 ACTH,但差异不显著 ($P>0.05$),同时注射 Ru486 使得蛋白降低; 3 个注射 Ru486 的处理均高于对照组,但 4 者差异不显著 ($P>0.05$)。另外,29d 屠宰测定的胸肌匀浆蛋白含量极显著高于 40d 屠宰 (1.5358 ± 0.516 和 1.0626 ± 0.223 ; $P=0.0001$)。29d 肉鸡胸肌未成熟,提示我们 29d 肉仔鸡胸肉在应激时容易被动物动用,受到损伤。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长,胸肌蛋白含量先升高,后逐渐降低,4h、8h、12h 和 24h 分别为: 0.9271 ± 0.14 、 1.9296 ± 0.45 、 1.4736 ± 0.37 和 1.2999 ± 0.43 ($P=0.0001$)。激素处理后 4h 腿肌蛋白含量与对照组无差异,8h 则极显著高于其它时间 ($P<0.01$),12h 和 24h 则逐渐降低,是肉品损伤得到恢复的过程,12h 极显著高于 24h 的处理 ($P<0.01$),提示我们激素处理后 4h 胸肌还没有得到动员,8h 胸肌的受损(降解)最为明显,随后逐渐恢复,24h 均未恢复到应激前的水平。

2.2.2.1.2 激素注射对腿肌匀浆中蛋白含量的影响

与其它所有处理组相比,注射 DEX 和 ACTH 后,腿肌蛋白含量显著升高 ($P<0.01$, 表 2-8),两处理组差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后,蛋白含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$),但数值仍高于对照组; 与对照组相比,注射 PSS 使得肌肉蛋白含量升高 ($P<0.01$),虽低于 DEX 和 ACTH,但差异不显著 ($P>0.05$),同时注射 Ru486 使得蛋白降低; 3 个注射 Ru486 的处理均高于对照组,但 4 者差异不显著 ($P>0.05$)。另外,29d 测定的腿肌蛋白含量极显著高于 40d (1.622 ± 0.577 和 1.158 ± 0.215 ; $P=0.0001$),提示我们 29d 肉仔鸡腿肉在应激时易被动物用。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长,腿肌蛋白含量先升高,后逐渐降低,4h、8h、12h 和 24h 分别为: 1.028 ± 0.15 、 1.961 ± 0.50 、 1.579 ± 0.44 和 1.395 ± 0.52 ($P=0.0001$)。激素处理后 4h 腿肌蛋白含量与对照组无差异,8h 则极显著高于其它时间 ($P<0.01$),12 和 24h 则逐渐降低,两处理变异较小 ($P>0.05$),提示我们激素处理后 8h 腿肌肌肉的受损(降解)最为明显。

表 2-8 处理对肉仔鸡在腿肌 10%匀浆蛋白含量 (g/l) 的影响

Table 2-8 Effect of DEX and ACTH on protein content in thigh meat of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄, Slaughter day		注射处理后的时间, Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h/28 ¹	8h/14 ¹	12h/28 ¹	24h/28 ¹
C	1.032 ± 0.057^{dD}	1.023 ± 0.058^{cB}	0.987 ± 0.032^{bcAB}	1.002 ± 0.035^C	1.088 ± 0.040^{dC}	1.022 ± 0.054^b
PSS	1.965 ± 0.52^{abAB}	1.257 ± 0.17^{abAB}	1.126 ± 0.068^{abAB}	2.374 ± 0.11^A	1.717 ± 0.360^{abcABC}	1.784 ± 0.60^a
R+S	1.570 ± 0.49^{bcABCD}	1.070 ± 0.20^{bcB}	0.926 ± 0.16^{cB}	1.861 ± 0.19^B	1.553 ± 0.31^{bcdABC}	1.336 ± 0.56^{ab}
DEX	1.955 ± 0.56^{abABC}	1.366 ± 0.21^{aA}	1.197 ± 0.13^{aA}	2.431 ± 0.076^A	1.937 ± 0.41^{abAB}	1.610 ± 0.48^{ab}
R+D	1.400 ± 0.39^{cdCD}	1.030 ± 0.16^{cB}	0.914 ± 0.072^{cB}	1.877 ± 0.061^B	1.350 ± 0.201^{cdBC}	1.143 ± 0.25^{ab}
ACTH	2.103 ± 0.66^{aA}	1.292 ± 0.27^{aAB}	1.123 ± 0.10^{abAB}	2.408 ± 0.048^A	2.064 ± 0.518^{aA}	1.754 ± 0.81^a
R+A	1.331 ± 0.37^{cdCD}	1.067 ± 0.13^{bcB}	0.920 ± 0.12^{cB}	1.773 ± 0.056^B	1.343 ± 0.156^{cdBC}	1.11 ± 0.18^{ab}
A,P [#]	1.6222,0.000	1.1579,0.0064	1.0276,0.0026	1.9610,0.0001	1.5788,0.0036	1.3945,0.1624

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

1: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; hours from injection to slaughter/number of observed value;

2: 平均值和 P 值; the average value and P value.

2.2.2.1.3 激素注射对心肌匀浆中蛋白含量的影响

注射 DEX 和 ACTH 后, 与其它所有处理组相比, 心肌蛋白含量显著升高 ($P<0.01$, 表 2-9), 两处理组差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, 蛋白含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$), 但数值仍高于对照组; 与对照组相比, 注射 PSS 也升高了可溶蛋白含量 ($P<0.01$), 虽低于 DEX 和 ACTH, 但差异不显著 ($P>0.05$), 同时注射 Ru486 使得蛋白降低; 3 个注射 Ru486 的处理均高于对照组, 但 4 者差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 心肌蛋白含量稍高于 40d (1.0197 ± 0.206 和 1.0097 ± 0.156 ; $P=0.7925$)。

激素注射后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长, 心肌蛋白含量先升高, 后逐渐降低, 4h、8h、12h 和 24h 分别为: 1.087 ± 0.15 、 1.168 ± 0.50 、 0.974 ± 0.092 和 0.909 ± 0.098 ($P=0.0001$)。激素处理后 4h 腿肌蛋白含量与对照组无差异, 8h 则极显著高于 12 和 24h ($P<0.01$), 12 和 24h 两时间变异较小 ($P>0.05$), 提示我们激素处理后 8h 心肌受损 (降解) 最为明显。

表 2-9 处理对肉仔鸡在心肌 10% 匀浆蛋白含量 (g/L) 的影响

Table 2-9 Effect of DEX and ACTH on protein content in the broilers heart

处理 Treatment	屠宰日龄, Slaughter day		注射处理后的时间, Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h/28 ¹	8h/14 ¹	12h/28 ¹	24h/28 ¹
C	0.908±0.072 ^{cB}	0.893±0.042 ^{bC}	0.930±0.055 ^{cC}	0.989±0.001 ^C	0.867±0.011 ^{dC}	0.864±0.050 ^{cdB}
PSS	1.043±0.17 ^{bcAB}	1.087±0.11 ^{aAB}	1.111±0.12 ^{bb}	1.297±0.088 ^B	1.020±0.080 ^{abcAB}	0.937±0.061 ^{bcAB}
R+S	0.909±0.090 ^{cB}	0.932±0.051 ^{bC}	0.918±0.018 ^{cC}	1.026±0.046 ^C	0.935±0.070 ^{cdBC}	0.849±0.058 ^{cdB}
DEX	1.223±0.28 ^{aA}	1.176±0.11 ^{aA}	1.393±0.10 ^{aA}	1.484±0.043 ^A	1.042±0.085 ^{abAB}	1.034±0.085 ^{aA}
R+D	0.911±0.080 ^{cB}	0.854±0.080 ^{bC}	0.911±0.11 ^{cC}	0.938±0.043 ^C	0.914±0.024 ^{dBC}	0.810±0.064 ^{dB}
ACTH	1.208±0.24 ^{abA}	1.185±0.16 ^{aA}	1.372±0.027 ^{aA}	1.486±0.046 ^A	1.075±0.072 ^{aA}	1.003±0.066 ^{abA}
R+A	0.936±0.10 ^{cB}	0.940±0.083 ^{bBC}	0.973±0.12 ^{cBC}	0.957±0.003 ^B	0.965±0.085 ^{bcdABC}	0.865±0.060 ^{cdB}
A,P ²	1.020,0.0001	1.101,0.0001	1.087, 0.0001	1.168,0.0001	0.974,0.0026	0.909,0.0004

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。Same as table 2-7.

表 2-10 处理对肉仔鸡在肝脏 10% 匀浆蛋白含量 (g/L) 的影响

Table 2-10 Effect of DEX and ACTH on protein content in the broilers liver

处理 Treatment	屠宰日龄, Slaughter day		注射处理后的时间, Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h/28 ¹	8h/14 ¹	12h/28 ¹	24h/28 ¹
C	0.856±0.087 ^{bcBC}	0.830±0.049 ^B	0.828±0.12 ^{bb}	0.841±0.001 ^{cB}	0.832±0.079 ^{bcABC}	0.876±0.010 ^{bBC}
PSS	0.973±0.052 ^{abAB}	1.003±0.097 ^A	0.961±0.053 ^{abAB}	1.019±0.026 ^{bcB}	0.967±0.094 ^{aA}	1.013±0.090 ^{aAB}
R+S	0.810±0.075 ^{cBC}	0.813±0.056 ^B	0.826±0.054 ^{bb}	0.803±0.077 ^{cB}	0.809±0.073 ^{cBC}	0.805±0.088 ^{bcC}
DEX	0.968±0.12 ^{bAB}	0.992±0.058 ^A	1.031±0.030 ^{aAB}	1.124±0.046 ^{bAB}	0.938±0.077 ^{aAB}	0.895±0.074 ^{bABC}
R+D	0.786±0.045 ^{cC}	0.819±0.045 ^B	0.827±0.067 ^{bb}	0.814±0.027 ^{cB}	0.774±0.013 ^{cC}	0.791±0.051 ^{bcC}
ACTH	1.136±0.27 ^{aA}	1.018±0.090 ^A	1.115±0.23 ^{aA}	1.439±0.19 ^{aA}	0.930±0.084 ^{abAB}	1.035±0.10 ^{aA}
R+A	0.800±0.098 ^{cBC}	0.807±0.034 ^B	0.836±0.027 ^{bb}	0.817±0.21 ^{cB}	0.802±0.041 ^{cBC}	0.764±0.057 ^{cC}
A,P ²	0.904,0.0001	0.898,0.0001	0.918, 0.0028	0.979, 0.0058	0.865, 0.0031	0.883,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。Same as table 2-7.

2.2.2.1.4 激素注射对肝脏匀浆中蛋白含量的影响

注射 ACTH、生理盐水和 DEX 后, 肝脏匀浆蛋白含量显著升高 ($P<0.01$, 表 2-10), 其中 ACTH 处理最高, 显著高于 PSS 和 DEX 两处理组 ($P<0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, 蛋白含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$), 数值仍低于对照组, 但 4 者差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 与 40d 屠宰的肉鸡的肝脏匀浆中蛋白含量变异较小 (0.904 ± 0.17 和 0.898 ± 0.11 ; $P=0.8280$), 提示我们肝脏与胸肌和腿肌不同, 两个屠宰日龄均对肝脏中蛋白含量影响不明显, 肝脏不是应激用能量的主要来源。

注射处理后激素的作用时间的延长 (4h、8h、12h 和 24h), 肝脏匀浆中蛋白含量先增加, 而后逐渐降低, 数值分别为: 0.918 ± 0.15 、 0.979 ± 0.24 、 0.865 ± 0.096 和 0.883 ± 0.12 ($P=0.0908$), 8h 最高, 显著高于 12 和 24h ($P<0.05$), 8h 可能是激素作用于组织器官中蛋白裂解的最为显著的时间段。

2.2.2.2 激素注射对组织匀浆中 GSH-Px 含量的影响

2.2.2.2.1 激素注射对心肌匀浆中 GSH-Px 含量的影响

注射 DEX、PSS 和 ACTH 后, 心肌 GSH-Px 含量显著降低 ($P<0.05$, 表 2-11), 其中 DEX 处理最低, 但 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, GSH-Px 含量比相对应的不注射组均显著升高; 但与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 的 GSH-Px 显著高于 40d (131.75 ± 32.52 , 95.46 ± 16.90 , $P=0.0001$)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h), 心肌 GSH-Px 含量先降低再增加, 数值分别为: 110.24 ± 17.88 , 102.12 ± 20.98 和 135.84 ± 38.67 ($P=0.0002$), 因未测定 8h 的心肌 GSH-Px 含量, 24h 最高, 基本恢复到对照组的水平, 显著高于 4 和 12h ($P<0.01$), 12h 最低, 可能是激素发挥作用时期, 在对心肌匀浆中蛋白含量的分析中, 8h 可能是激素作用于组织器官的最为显著时间段。

表 2-11 处理对肉仔鸡在心肌 GSH-Px 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-11 Effect of DEX and ACTH on GSH-Px activity in the broiler heart

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	145.34±31.54 ^{abAB}	125.14±4.76 ^{aAB}	124.92±0.67 ^{bA}	185.96±0.43 ^{bB}	94.83±0.73 ^{aA}	113.71±1.92 ^A
PSS	111.47±17.52 ^{bcB}	93.87±2.26 ^{cC}	108.19±4.01 ^{cdBC}	132.36±0.69 ^{dD}	66.37±4.25 ^{dC}	90.52±5.38 ^B
R+S	140.36±27.31 ^{abAB}	118.87±0.63 ^{bB}	127.11±0.43 ^{abA}	175.09±6.48 ^{bBC}	92.73±2.49 ^{abA}	119.24±4.42 ^A
DEX	106.07±16.41 ^{cB}	85.74±1.33 ^{dC}	112.21±1.98 ^{cB}	120.26±5.99 ^{eD}	76.75±3.40 ^{cB}	91.70±2.35 ^B
R+D	159.54±46.53 ^{aA}	129.15±2.77 ^{aA}	129.92±2.61 ^{abA}	219.56±1.45 ^{aA}	96.50±0.36 ^{aA}	119.41±1.01 ^A
ACTH	120.11±33.98 ^{bcAB}	93.14±1.63 ^{cC}	103.95±1.83 ^{dC}	163.26±8.19 ^{cC}	75.55±1.79 ^{cB}	89.91±2.22 ^B
R+A	139.33±16.80 ^{abcAB}	125.78±2.04 ^{aAB}	131.65±1.71 ^{aA}	160.55±4.25 ^{cC}	88.96±0.77 ^{bA}	120.30±2.18 ^A
A,P [#]	131.75,0.0286	110.24,0.0001	119.71,0.0001	165.29,0.0001	84.55,0.001	106.40,0.001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7, Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7. Same as table 2-7.

2.2.2.2.2 激素注射对肝脏匀浆中 GSH-Px 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后, 肝脏 GSH-Px 含量显著降低 ($P<0.05$, 表 2-12), 其中 ACTH 处理最低, 但 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, GSH-Px 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.05$), 但仍低于对照组, 与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d

肉鸡的心肌 GSH-Px 含量高于 40d (136.68±42.82 和 107.49±17.51, P=0.0011)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h), 肝脏 GSH-Px 含量逐渐降低, 数值分别为: 184.34±40.96, 111.41±15.94 和 108.92±16.55 (P=0.0001), 4h 的肝脏 GSH-Px 含量显著高于 12h 和 24h (P<0.01), 24h 最低, 肝脏 GSH-Px 未得到恢复。

表 2-12 处理对肉仔鸡在肝脏 GSH-Px 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-12 Effect of DEX and ACTH on GSH-Px activity in the broilers liver

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	160.57±54.83 ^a	230.91±10.87 ^{aA}	128.91±4.53 ^{aA}	121.89±0.95 ^{aA}	130.87±0.53 ^{aA}	111.05±1.75 ^{bA}
PSS	117.57±32.65 ^{abc}	158.23±16.45 ^{cC}	92.98±21.5 ^{cB}	101.49±4.70 ^{bB}	99.13±2.49 ^{cC}	81.69±2.27 ^{cB}
R+S	148.85±37.90 ^{abc}	197.68±3.20 ^{bB}	122.63±0.16 ^{abA}	126.24±1.93 ^{aA}	127.50±1.02 ^{aA}	123.34±8.29 ^{aA}
DEX	113.17±22.53 ^{bc}	139.66±6.26 ^{cdCD}	90.17±3.47 ^{cB}	109.66±0.53 ^{bAB}	99.65±4.18 ^{cC}	78.99±5.79 ^{cB}
R+D	158.36±55.59 ^{ab}	229.99±2.46 ^{aA}	120.64±0.47 ^{bA}	124.46±6.14 ^{aA}	126.57±3.07 ^{aA}	116.92±3.66 ^{abA}
ACTH	107.06±18.05 ^c	128.60±5.53 ^{dD}	91.05±0.69 ^{cB}	101.53±9.82 ^{bB}	92.33±0.64 ^{dC}	86.70±0.93 ^{cB}
R+A	151.15±42.09 ^{abc}	205.29±4.93 ^{bAB}	123.02±3.64 ^{abA}	125.15±4.89 ^{aA}	114.35±1.85 ^{bB}	115.72±3.52 ^{abA}
A,P ²	136.68,0.0927	184.34,0.0001	109.92,0.0001	115.78,0.0045	112.91,0.0001	102.06,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。 Same as table 2-7.

2.2.2.2.3 激素注射对胸肌匀浆中 GSH-Px 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后, 胸肌 GSH-Px 含量显著降低 (P<0.05, 表 2-13), 其中 ACTH 和 DEX 极显著低于对照组 (P<0.01), 但 3 处理之间差异不显著 (P>0.05); 同时相应注射 Ru486 后, GSH-Px 含量比相对应的不注射组均显著升高 (P<0.01); 但均低于对照组 (P>0.05)。另外, 29d 肉鸡的胸肌 GSH-Px 含量显著高于 40d (84.39±22.11, 68.25±23.29, P=0.0046)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h), 胸肌 GSH-Px 含量逐渐降低, 数值分别为: 99.18±13.22, 68.14±23.42 和 77.11±21.92 (P=0.0002), 4h 的胸肌 GSH-Px 含量显著高于 12h 和 24h (P<0.01), 12h 最低可能是激素的作用时机, 24h 有所恢复, 但未恢复到对照水平。

表 2-13 处理对肉仔鸡在胸肌 GSH-Px 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-13 Effect of DEX and ACTH on GSH-Px activity in breast meat of broilers

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	105.06±17.93 ^{aA}	105.83±2.75 ^{aAB}	124.61±2.62 ^{aA}	84.73±0.02 ^{aA}	75.18±1.34 ^{aA}	92.67±2.68 ^a
PSS	70.21±19.81 ^{bBC}	81.65±1.76 ^{bC}	84.15±4.71 ^{cdC}	44.84±0.61 ^{cBC}	44.90±2.16 ^{cdBC}	77.38±4.31 ^{ab}
R+S	91.12±12.51 ^{aAB}	106.61±0.34 ^{aAB}	80.53±2.13 ^{dC}	86.20±4.96 ^{aA}	53.66±0.85 ^{bcBC}	102.75±39.30 ^a
DEX	69.14±17.58 ^{bBC}	91.48±2.83 ^{bBC}	61.01±0.21 ^{eD}	54.95±2.20 ^{bB}	42.10±4.56 ^{dB}	52.37±2.87 ^b
R+D	97.31±14.50 ^{aA}	115.58±3.48 ^{aA}	87.07±0.31 ^{bcBC}	89.27±5.68 ^{aA}	55.79±9.95 ^{bB}	88.56±14.30 ^{ab}
ACTH	61.02±19.37 ^{bC}	84.00±4.30 ^{bC}	57.77±1.25 ^{eD}	41.29±0.67 ^{cC}	40.04±0.39 ^{dC}	73.28±4.22 ^{ab}
R+A	96.86±10.76 ^{aA}	109.07±9.69 ^{aA}	92.59±2.08 ^{bB}	88.94±4.57 ^{aA}	54.53±1.82 ^{bcBC}	102.35±3.38 ^a
A,P ²	84.39,0.0001	99.18,0.0007	83.96,0.0001	70.03, 0.0001	52.31,0.0011	84.20,0.1278

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。 Same as table 2-7.

表 2-14 处理对肉仔鸡在腿肌 GSH-Px 含量 (U/ mg prot) 的影响

Table 2-14 Effect of DEX and ACTH on GSH-Px in thigh meat of broilers

处理 Treatment	29 日龄宰 D- 29			40 日龄宰 D-40		
	29d, n=28	4h/14 ¹	24h/14 ¹	40d, n=28	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	124.46±11.29 ^{aA}	115.08±5.37 ^{aA}	133.85±1.09 ^{aA}	103.68±5.45 ^{aA}	103.94±7.39 ^{aA}	103.41±5.85 ^{aA}
PSS	80.98±3.80 ^{cdCD}	83.84±0.26 ^{cb}	78.12±3.26 ^{cC}	54.04±4.71 ^{dD}	50.48±2.42 ^{dD}	57.61±3.14 ^{dC}
R+S	106.10±11.46 ^{bAB}	115.80±2.30 ^{aA}	96.40±3.47 ^{bB}	80.28±8.23 ^{bcBC}	86.20±5.67 ^{bB}	74.36±5.56 ^{cb}
DEX	71.04±12.81 ^{deD}	81.76±3.37 ^{cbC}	60.32±4.60 ^{dD}	63.77±6.83 ^{dCD}	69.58±1.84 ^{cC}	57.96±1.22 ^{dC}
R+D	101.83±11.39 ^{bABC}	111.43±2.42 ^{abA}	92.23±3.79 ^{bB}	80.15±6.40 ^{bcBC}	75.30±1.72 ^{cbC}	85.00±5.09 ^{bB}
ACTH	62.39±12.65 ^{cd}	73.31±1.64 ^{dC}	51.47±0.32 ^{cd}	65.91±17.87 ^{cdCD}	50.70±1.76 ^{dD}	81.12±5.50 ^{bcB}
R+A	94.41±14.64 ^{bcBC}	107.06±1.61 ^{bA}	81.76±0.84 ^{cC}	89.12±14.47 ^{abAB}	76.85±4.88 ^{bcBC}	101.39±1.34 ^{aA}
A,P ²	91.60,0.0001	98.32,0.0001	84.88,0.0001	76.71,0.0001	73.29,0.0001	80.12,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。 Same as table 2-7.

2.2.2.2.4 激素注射对腿肌匀浆中 GSH-Px 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后, 腿肌 GSH-Px 含量极显著低于对照组 ($P<0.01$, 表 2-14), 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, GSH-Px 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.01$), 但仍低于对照组 ($P<0.01$)。另外, 29d 肉鸡腿肌 GSH-Px 含量显著高于 40d (91.60 ± 22.76 , 76.71 ± 18.28 , $P=0.0093$)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h), 腿肌 GSH-Px 含量逐渐降低, 数值分别为: 98.32 ± 17.42 , 73.29 ± 18.52 , 82.50 ± 22.09 ($P=0.0002$), 4h 的肝脏 GSH-Px 含量显著高于 12h 和 24h ($P<0.01$), 12h 最低是处理后激素的作用最佳时间, 24h 有所恢复, 恢复到了对照组的 65% 左右。

2.2.2.3 激素注射对组织匀浆中 SOD 含量的影响

表 2-15 处理对肉仔鸡在心肌 SOD 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-15 Effect of DEX and ACTH on SOD activity in the broilers heart

处理 Treatment	29 日龄宰 D- 29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	12h ³ /28 ¹
C	93.98±4.58 ^A	92.15±0.56 ^{ab}	90.49±1.36 ^{abcAB}	99.31±3.84 ^{abAB}	84.15±0.69 ^{abAB}	87.32±3.77 ^{ab}
PSS	83.90±4.19 ^B	80.64±1.52 ^{bc}	84.18±2.20 ^{cb}	86.89±6.42 ^{cdBC}	63.45±3.88 ^{dC}	73.81±12.24 ^b
R+S	98.96±7.20 ^A	96.09±0.93 ^{ab}	93.96±5.49 ^{abAB}	106.84±6.11 ^{aA}	71.22±0.095 ^{cdBC}	82.59±13.51 ^{ab}
DEX	83.22±6.46 ^B	75.65±1.04 ^c	86.57±1.42 ^{bcB}	87.45±5.69 ^{cdBC}	61.53±13.15 ^{dC}	74.05±16.35 ^b
R+D	97.62±9.45 ^A	93.88±17.84 ^{ab}	94.94±1.64 ^{abAB}	104.05±0.73 ^{aAB}	90.91±2.27 ^{aA}	92.93±2.84 ^a
ACTH	79.40±5.10 ^B	75.37±0.42 ^c	84.61±2.81 ^{cb}	78.26±5.70 ^{dC}	65.35±1.92 ^{cdBC}	74.98±11.29 ^b
R+A	97.31±3.59 ^A	97.20±2.18 ^a	97.68±6.26 ^{aA}	97.06±4.48 ^{abcAB}	77.55±2.77 ^{bcABC}	87.61±12.28 ^{ab}
A,P ²	90.63,0.0001	87.28,0.0456	90.35,0.0336	94.27,0.0064	73.45,0.0062	81.90,0.1356

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。 Same as table 2-7.

3: 29 日龄和 40 日龄的两个 12h 处理的值; the value of 29d and 40d.

2.2.2.3.1 激素注射对心肌匀浆中 SOD 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后, 心肌 SOD 含量极显著低于对照组 ($P<0.01$, 表 2-15), 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, SOD 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.01$), 注射 PSS 处理组 SOD 的下降幅度较小, 与加注 Ru486 后的 SOD 值差异未达极显著 ($P<0.05$); 3 个注射 Ru486 的处理 SOD 高于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 屠宰的肉鸡的心肌 SOD 含量显著高于与 40d (90.63 ± 9.50 , 73.45 ± 11.44 , $P=0.0001$)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h) 心肌 SOD 含量先降低, 后升高, 24h 升到最高, 显著高于其它时间段 ($P<0.01$), 数值分别为: 87.28 ± 10.59 , 81.90 ± 12.38 , 94.27 ± 10.62 ($P=0.0072$), 24h 已经达到初始水平, 恢复良好; 4 和 12h 差异不显著, 因此是激素的作用时段。

2.2.2.3.2 激素注射对肝脏匀浆中 SOD 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后, 肝脏 SOD 含量极显著低于对照组 ($P<0.05$, 表 2-16), 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, SOD 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.05$), 与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 肉鸡肝脏 SOD 含量大于 40d (124.63 ± 48.54 , 98.30 ± 14.43 , $P=0.0518$)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h) 心肌 SOD 含量先降低, 后升高, 24h 仍未恢复到未应激的水平, 4h 最高, 显著高于其它时间段 ($P<0.01$), 数值分别为: 172.94 ± 56.72 , 97.72 ± 13.38 , 103.80 ± 16.04 ($P=0.0001$)。心肌 SOD 24h 已基本恢复到了初始水平, 但肝脏仍未恢复到初始水平, 从 SOD 的作用次序上, 心肌首先受到作用, 恢复也快, 肝脏 4h 的 SOD 较高, 12h 最低, 24h 才开始恢复。

表 2-16 处理对肉仔鸡在肝脏 SOD 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-16 Effect of DEX and ACTH on SOD activity in the broiler liver

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	12h ³ /28 ¹
C	141.85±68.24 ^{ab}	227.54±34.73 ^A	100.33±4.03 ^B	97.69±4.97 ^{bcAB}	109.78±2.42 ^A	105.05±6.09 ^A
PSS	95.37±12.56 ^b	110.82±4.86 ^B	84.15±0.19 ^C	91.23±0.39 ^{bcB}	81.77±1.43 ^B	82.96±1.61 ^B
R+S	144.28±57.82 ^{ab}	216.31±23.33 ^A	96.89±2.47 ^B	119.66±9.14 ^{aAB}	114.17±0.87 ^A	105.53±10.09 ^A
DEX	94.28±14.22 ^b	109.15±16.30 ^B	85.71±1.75 ^C	87.99±8.64 ^{cB}	85.71±1.49 ^B	85.71±1.33 ^B
R+D	156.28±57.30 ^a	229.03±13.37 ^A	113.72±5.16 ^A	126.11±13.51 ^{aA}	106.18±2.57 ^A	109.95±5.48 ^A
ACTH	98.76±16.25 ^b	118.58±8.72 ^B	84.93±0.09 ^C	92.77±1.85 ^{bcB}	81.09±3.51 ^B	83.01±3.00 ^B
R+A	141.56±46.00 ^{ab}	199.17±19.26 ^A	114.28±3.25 ^A	111.23±15.16 ^{abAB}	109.43±9.05 ^A	111.86±6.22 ^A
A, P ²	124.67, 0.0657	172.94, 0.0007	97.14, 0.0001	103.80, 0.0223	98.30, 0.0002	97.72, 0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

¹⁻²⁻³: 同表 2-15。Same as table 2-15.

2.2.2.3.3 激素注射对胸肌匀浆中 SOD 含量的影响

注射 PSS、DEX 和 ACTH 后, 胸肌 SOD 含量显著低于对照组 ($P<0.01$, 表 2-17), 3 处理之间差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, SOD 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.05$); 但与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。另外, 29d 肉鸡的肝脏 SOD 含量显著高于 40d (83.56 ± 28.80 , 71.42 ± 12.31 , $P=0.0392$)。

随注射处理后激素作用时间的延长（4h、12h 和 24h）胸肌 SOD 含量先降低后升高，24h 仍未恢复到对照组水平，显著高于 12h ($P<0.01$)，低于 4h ($P<0.01$)，数值分别为：116.29±16.51，63.85±11.20，73.77±16.38 ($P=0.0001$)。

表 2-17 处理对肉仔鸡胸肌 SOD 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-17 Effect of DEX and ACTH on SOD activity in breast meat of broilers

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	106.79±24.83 ^a	131.76±1.69 ^{aa}	77.57±0.81 ^A	111.06±9.40 ^{aa}	76.27±6.36 ^A	88.32±0.94 ^{aa}
PSS	67.23±23.62 ^b	97.60±1.79 ^{dbc}	49.88±1.03 ^C	54.21±0.38 ^{dd}	52.15±1.01 ^B	63.13±0.27 ^{cb}
R+S	93.50±31.04 ^{ab}	133.15±1.52 ^{aa}	68.83±2.17 ^B	78.52±0.07 ^{bBC}	70.05±2.39 ^A	86.64±0.78 ^{aa}
DEX	65.82±21.22 ^b	92.97±3.25 ^{dc}	49.60±0.79 ^C	54.90±0.29 ^{cd}	53.32±3.58 ^B	69.95±3.46 ^{bb}
R+D	87.21±27.61 ^{ab}	122.76±4.16 ^{ba}	70.02±1.51 ^B	68 ⁸⁵ ±0.33 ^{cC}	73.94±3.15 ^A	85.07±1.51 ^{aa}
ACTH	69.76±28.56 ^b	106.41±6.83 ^{cb}	51.02±1.23 ^C	51.84±0.82 ^{dd}	54.98±2.88 ^B	65.68±2.71 ^{bcB}
R+A	94.62±27.88 ^{ab}	129.36±2.82 ^{abA}	69.39±3.29 ^B	85.10±0.29 ^{bb}	76.91±3.45 ^A	83.47±2.88 ^{aa}
A,P ²	84.56,0.0675	116.29,0.0001	62.33,0.0001	72.07,0.0001	65.37,0.004	77.47,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

^{1,2}: 含义同表 2-7。Same as table 2-7.

2.2.2.3.4 激素注射对腿肌匀浆中 SOD 含量的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后，腿肌 SOD 含量显著低于对照组 ($P<0.01$ ，表 2-18)，3 处理之间 ACTH 组降的最低，PSS 最高，但 3 者差异不显著 ($P>0.05$)；同时相应注射 Ru486 后，SOD 含量比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.05$)，ACTH 和 DEX 组基础上注射 Ru486 后，SOD 值极显著升高 ($P<0.01$)；3 个注射 Ru486 的处理组 SOD 均低于对照组，但差异不显著 ($P>0.05$)。29d 肉鸡的腿肌 SOD 含量显著高于 40d (68.21±24.44，58.40±10.17， $P=0.0487$)。

随注射处理后激素作用时间的延长（4h、12h 和 24h），腿肌 SOD 含量先降低后升高，24h 仍未恢复到对照组水平，虽高于 12h 处理，但二者差异不显著 ($P>0.05$)，显著低于 4h ($P<0.01$)，数值分别为：91.83±15.26，50.78±11.16 和 64.03±15.84 ($P=0.0001$)。

表 2-18 处理对肉仔鸡在腿肌 SOD 含量 (U/mg 蛋白) 的影响

Table 2-18 Effect of DEX and ACTH on SOD activity in thigh meat of broiler

处理 Treatment	29 日龄宰 D-29				40 日龄宰 D-40	
	29d, n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	83.66±15.72 ^{aa}	93.99±0.55 ^{cc}	64.10±3.96 ^{aa}	92.90±8.40 ^{aa}	61.84±1.51 ^{aa}	76.39±3.30 ^{aa}
PSS	54.89±23.73 ^{baB}	84.32±2.54 ^{dd}	32.93±0.04 ^{cc}	47.43±0.14 ^{deCD}	48.05±2.58 ^{dCD}	49.51±1.11 ^{cb}
R+S	69.45±20.38 ^{abAB}	95.66±3.26 ^{cbC}	55.37±0.14 ^{bb}	57.30±0.05 ^{cc}	62.45±0.02 ^{aa}	73.45±6.17 ^{abA}
DEX	53.78±19.06 ^{baB}	75.57±3.06 ^{ede}	33.12±0.07 ^{cc}	52.65±1.03 ^{cdCD}	46.01±1.44 ^{dd}	50.84±0.55 ^{cb}
R+D	85.04±26.32 ^{aa}	116.25±1.66 ^{aa}	57.85±0.87 ^{baB}	81.02±0.28 ^{bb}	54.14±3.63 ^{bcBC}	66.70±0.19 ^{ba}
ACTH	48.44±19.16 ^{bb}	72.23±2.05 ^{ee}	30.87±0.54 ^{cc}	42.24±2.36 ^{ed}	50.03±0.14 ^{cdBCD}	50.83±2.10 ^{cb}
R+A	82.21±21.33 ^{aa}	104.80±3.82 ^{bb}	57.50±2.48 ^{bb}	84.33±1.75 ^{baB}	56.61±2.27 ^{baB}	70.76±4.14 ^{abA}
A,P ³	68.21,0.0099	91.83,0.0001	47.39,0.0001	65.41,0.0001	54.16,0.0004	62.64,0.0002

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

^{1, 2, 3}: 同表 2-15。Same as table 2-15.

2.2.2.4 激素注射对组织匀浆中 MDA 含量的影响

动物处于应激状态时，交感—肾上腺系统反应增强，从而导致儿茶酚胺类激素分泌增多。肾上腺素能神经末梢释放的去甲肾上腺素，可致自由基产生量增加，进而产生组织内脂质过氧化作用 (Haggendal, 1987)。MDA 是细胞受自由基攻击严重程度的一个指标。

2.2.2.4.1 激素注射对心脏和肝脏匀浆中 MDA 含量的影响

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后，肝脏 MDA 含量显著高于对照组 ($P<0.01$ ，表 2-19)，3 处理之间 DEX 组最高，PSS 最低，但 3 者差异不显著 ($P>0.05$)；同时相应注射 Ru486 后，MDA 含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$)，但于对照组差异不显著 ($P>0.05$)。随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h)，肝脏 MDA 含量先升高后降低，24h 仍未恢复到对照组水平，虽低于 12h 处理，但二者差异不显著 ($P>0.05$)，显著低于 4h ($P<0.01$)，这里 12h 是肝脏受攻击最大的时刻。数值分别为： 7.12 ± 1.97 ， 8.26 ± 1.06 和 7.89 ± 1.17 ($P=0.1218$)。

注射 ACTH、PSS 和 DEX 后，心脏 MDA 含量显著高于对照组 ($P<0.01$ ，表 2-19)，3 处理之间 DEX 组最高，PSS 升的最少，但 3 者差异不显著 ($P>0.05$)；同时相应注射 Ru486 后，MDA 含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$)，与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h) 心肌 MDA 含量先降低后升高，24h 基本恢复到对照组水平，虽高于 12h 处理，但三时间段差异不显著 ($P>0.05$)，数值分别为： 3.07 ± 0.78 ， 2.91 ± 0.59 ， 3.06 ± 0.20 ($P=0.7313$)。对照组 2.62，因此 24h 不足以使心脏 MDA 恢复到初始水平。

表 2-19 处理对肉仔鸡在心肌和肝脏 10%匀浆 MDA 含量 (nmol/mg 蛋白) 的影响

Table 2-19 Effect of DEX and ACTH on MDA content in the heart and liver of broilers

处理 Treatment	肝脏 Liver				心脏 Heart			
	29d,n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹	29d,n=42	4h/14 ¹	12h/14 ¹	24h/14 ¹
C	6.93 ± 0.64^B	6.17 ± 0.29^{cB}	7.23 ± 0.29^{cC}	7.38 ± 0.40^{bcB}	2.62 ± 0.35^{dBC}	2.21 ± 0.024^{eF}	2.82 ± 0.32^{ab}	2.83 ± 0.06^b
PSS	$8.81\pm .78^A$	8.68 ± 0.12^{bA}	9.72 ± 0.19^{aA}	8.02 ± 0.24^{bAB}	3.46 ± 0.44^{abA}	3.56 ± 0.14^{bB}	3.63 ± 0.78^a	3.18 ± 0.34^a
R+S	6.75 ± 1.24^B	5.19 ± 0.54^{cB}	7.44 ± 0.30^{cC}	7.63 ± 0.084^{bcB}	2.79 ± 0.28^{cdBC}	2.95 ± 0.008^{cCD}	2.43 ± 0.03^b	3.00 ± 0.05^{ab}
DEX	9.58 ± 0.34^A	9.85 ± 0.07^{aA}	9.35 ± 0.13^{aAB}	9.56 ± 0.56^{aA}	3.23 ± 0.15^{bcAB}	3.09 ± 0.15^{cC}	3.34 ± 0.08^a	3.27 ± 0.10^a
R+D	6.67 ± 1.10^B	5.62 ± 0.61^{cB}	7.76 ± 0.62^{bcAB}	6.63 ± 0.83^{cB}	2.70 ± 0.32^{dBC}	2.62 ± 0.05^{dDE}	2.39 ± 0.07^b	3.09 ± 0.05^{ab}
ACTH	9.10 ± 0.63^A	9.14 ± 0.53^{abA}	8.86 ± 1.16^{abABC}	9.29 ± 0.44^{aA}	3.74 ± 0.69^{aA}	4.60 ± 0.13^{aA}	3.41 ± 0.30^a	3.21 ± 0.007^a
R+A	6.46 ± 1.08^B	5.21 ± 0.71^{cB}	7.47 ± 0.11^{cC}	6.70 ± 6.51^{cB}	2.55 ± 0.31^{dC}	2.45 ± 0.15^{deEF}	2.38 ± 0.47^b	2.82 ± 0.05^b
A,P ³	7.76,0.0001	7.12,0.0001	8.26,0.0092	7.89,0.0019	3.01,0.0001	3.07,0.0001	2.91,0.0485	3.06,0.0655

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

^{1, 2, 3}: 同表 2-15。Same as table 2-15.

2.2.2.4.2 激素注射对胸肌匀浆中 MDA 含量的影响

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后，胸肌 MDA 含量显著高于对照组 ($P<0.01$ ，表 2-20)，3 处理之间 DEX 组最高，PSS 最低，但 3 者差异不显著 ($P>0.05$)；同时相应注射 Ru486 后，MDA 含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$)，但与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。另外，29d 肉鸡胸肌 MDA 含量与 40d 屠宰差异不显著 (49.80 ± 8.10 和 46.58 ± 8.36 ， $P<0.0766$)。

随注射处理后激素作用时间的延长 (4h、12h 和 24h) 胸肌 MDA 含量几乎未见差异 ($P>0.05$)，数值分别为： 48.36 ± 7.69 ， 48.83 ± 10.60 和 47.39 ± 6.41 ($P=0.8082$)。

表 2-20 处理对肉仔鸡在胸肌 10%匀浆 MDA 含量 (nmol/mg 蛋白) 的影响

Table 2-20 Effect of DEX and ACTH on MDA content in breast meat of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection		
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	12h, n=28	24h, n=28
C	45.70±3.18 ^{cBC}	43.72±3.76 ^B	44.87±3.32 ^{bABC}	43.92±2.83 ^{bBC}	45.33±4.89 ^{cdCD}
PSS	52.75±4.52 ^{bAB}	53.67±4.51 ^A	54.76±4.87 ^{aA}	55.43±3.53 ^{aAB}	49.44±1.98 ^{bcBC}
R+S	45.35±1.93 ^{cBC}	39.02±1.32 ^B	42.08±2.19 ^{bC}	42.51±5.49 ^{bBC}	41.96±3.73 ^{dD}
DEX	58.14±10.72 ^{abA}	55.53±5.77 ^A	55.71±6.89 ^{aA}	61.65±11.87 ^{aA}	53.15±3.84 ^{abAB}
R+D	44.33±2.64 ^{cC}	39.49±6.30 ^B	42.97±7.48 ^{bC}	39.55±4.40 ^{bC}	43.21±3.85 ^{dCD}
ACTH	59.54±5.39 ^{aA}	53.46±7.47 ^A	54.59±7.08 ^{aAB}	57.97±10.51 ^{aA}	56.93±3.09 ^{aA}
R+A	42.81±2.53 ^{cC}	41.15±4.60 ^B	43.50±4.71 ^{bBC}	40.77±3.86 ^{bC}	41.68±2.56 ^{dD}
A, P ³	49.80, 0.0001	46.58, 0.0001	48.36, 0.0021	48.83, 0.0003	47.39, 0.0001

A, B, C; a, b, c, d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

1, 2, 3: 同表 2-15。 Same as table 2-15.

2.2.2.4.3 激素注射对腿肌匀浆中 MDA 含量的影响

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后, 腿肌 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$, 表 2-21), 3 处理之间 DEX 组最高, PSS 最低, 但 3 者差异不显著 ($P > 0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, MDA 含量比相对应的不注射组均显著降低 ($P < 0.01$), 与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。另外, 29d 肉鸡的腿肌 MDA 含量显著高于 40d (49.82±8.53 和 45.39±6.53, $P = 0.0091$)。

随激素处理后时间的延长 (4h、12h 和 24h) 腿肌 MDA 含量几乎未见差异 ($P > 0.05$), 数值分别为: 49.39±8.88, 45.78±6.88 和 47.64±7.59 ($P = 0.2322$)。

表 2-21 处理对肉仔鸡在腿肌 10%匀浆 MDA 含量 (nmol/mg 蛋白) 的影响

Table 2-21 Effect of DEX and ACTH on MDA content in thigh meat of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection		
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	12h, n=28	24h, n=28
C	46.61±3.19 ^B	42.28±3.50 ^B	45.57±1.44 ^{bB}	42.53±6.15 ^{bcBC}	45.24±2.96 ^{bcdBC}
PSS	55.69±5.76 ^A	50.88±4.86 ^A	59.01±3.74 ^{aA}	51.43±5.90 ^{aAB}	49.40±0.76 ^{bcABC}
R+S	42.33±3.27 ^B	41.01±1.81 ^B	41.70±0.62 ^{cBC}	42.83±1.26 ^{bcBC}	40.49±4.41 ^{dC}
DEX	60.09±7.14 ^A	51.44±6.64 ^A	59.70±3.77 ^{aA}	49.62±3.89 ^{abABC}	57.97±11.25 ^{aA}
R+D	43.01±3.82 ^B	40.68±3.09 ^B	40.76±1.03 ^{cBC}	40.13±3.09 ^{cC}	44.66±4.35 ^{bcdBC}
ACTH	58.43±4.38 ^A	51.24±5.29 ^A	58.27±2.68 ^{aA}	53.88±6.60 ^{aA}	52.35±7.39 ^{abAB}
R+A	42.56±1.69 ^B	40.18±3.74 ^B	40.69±1.42 ^{cC}	40.03±4.60 ^{cC}	43.39±1.43 ^{cdBC}
A, P [#]	49.82, 0.0001	45.39, 0.0001	49.39, 0.0001	45.78, 0.0013	47.64, 0.0052

A, B, C; a, b, c, d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

1, 2, #: 同表 2-15。 Same as table 2-15.

2.2.3 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡血液生化指标影响的研究

2.2.3.1 血浆 T-AOC

总抗氧化能力 (T-AOC) 是近几年研究发现的用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标。包括酶促谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 等

(McCord, 1969; Diplock, 1976) 和非酶促 (还原型谷胱甘肽(GSH)、VE、VC、VK、VA 等维生素类、尿酸、血浆铜蓝蛋白(CP)、胡萝卜素、葡萄糖等 (Mukai 等, 1993; Burton 等, 1990)) 两类, 其作用是清除自由基、分解过氧化物、除去其催化作用的金属离子, 是代表体内抗氧化能力总体水平的一项指标, 由于 T-AOC 具有很强的代表性, 所以是反映机体抗氧化功能的一个良好指标 (刘国艳等, 2001)。

注射 DEX 和 ACTH 后, 与对照组相比血液 T-AOC 显著降低 ($P<0.01$, 表 2-22), 同时相应注射 Ru486 后, 血液 T-AOC 比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.01$), 但数值仍高于对照组 ($P>0.05$); 与对照组相比, 注射生理盐水反而使得血液 T-AOC 升高, 同时注射 Ru486 使得 T-AOC 升的更高, 显著高于对照组 ($P<0.01$), 可能与注射生理盐水后动物机体的防御体系发生反应, 刺激机体产生更多的抗氧化酶或抗氧化剂; 3 个注射 Ru486 的处理的 T-AOC 值均较高, 其中 R+D 处理最高, 但 3 者差异不显著 ($P>0.05$); 注射 ACTH 和 DEX 均降低了血液 T-AOC, 但两者差异不显著 ($P>0.05$), 与其它指标不同的是对于 T-AOC 来说, 注射 PSS 与 ACTH 和 DEX 的反应不一致。另外, 29d 血浆 T-AOC 与 40d 差异不显著 (10.19 ± 1.26 和 10.13 ± 1.05 ; $P=0.7963$), 肉仔鸡血液总抗氧化能力与年龄无相关性。

注射处理后随着激素和 Ru486 作用时间的延长, 血清 T-AOC 值逐渐降低, 4h、8h、12h 和 24h 分别为: 10.61 ± 1.43 、 10.29 ± 1.37 、 10.17 ± 0.85 和 9.66 ± 0.87 ($P=0.0227$)。4h 显著高于 24h 的 T-AOC 值 ($P<0.01$), 8~12h 则变异较小, 4~12h 的数值均高于对照组 (9.98 ± 0.73), 24h 的数值则低于此值。

表 2-22 处理对肉仔鸡血浆 T-AOC (nmol/ml) 的影响

Table 2-22 Effect of DEX and ACTH on T-AOC level in broiler serum

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	10.11 ± 0.66^{bAB}	9.81 ± 0.84^{bcBCD}	10.36 ± 0.48^{dB}	10.63 ± 0.18^{bB}	10.30 ± 0.19^{bBC}	8.96 ± 0.17^{deCD}
PSS	10.44 ± 1.00^{abA}	10.31 ± 0.58^{bABC}	11.09 ± 0.42^{bcAB}	10.88 ± 0.60^{bAB}	10.52 ± 0.24^{bAB}	9.32 ± 0.45^{cdBC}
R+S	11.17 ± 1.06^{aA}	10.60 ± 0.70^{abAB}	11.88 ± 0.63^{aA}	11.80 ± 0.28^{aA}	10.56 ± 0.28^{bAB}	9.90 ± 0.080^{bB}
DEX	9.09 ± 1.46^{cB}	8.93 ± 0.67^{dD}	7.54 ± 0.63^{cC}	8.85 ± 0.35^{cC}	9.67 ± 0.44^{cC}	9.94 ± 0.70^{bB}
R+D	11.11 ± 0.36^{aA}	11.37 ± 0.31^{aA}	11.44 ± 0.24^{abA}	10.92 ± 0.099^{bAB}	11.13 ± 0.55^{aA}	11.25 ± 0.16^{aA}
ACTH	8.83 ± 1.04^{cB}	9.25 ± 1.06^{cdCD}	10.51 ± 0.10^{cdB}	7.85 ± 0.071^{dC}	8.51 ± 0.23^{dD}	8.59 ± 0.32^{eD}
R+A	10.60 ± 0.81^{abA}	10.66 ± 0.76^{abAB}	11.44 ± 0.37^{abA}	11.10 ± 0.14^{abAB}	10.50 ± 0.30^{bAB}	9.69 ± 0.24^{bcB}
A, P [#]	10.19, 0.0001	10.13, 0.0001	10.61, 0.0001	10.29, 0.0001	10.17, 0.0001	9.66, 0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

1, 2, 3: 同表 2-15。Same as table 2-15.

2.2.3.2 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)

GSH-Px 能特异性催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与过氧化物 (H_2O_2 等) 的氧化还原反应, 降解 H_2O_2 , 防止自由基形成, 因此可防止因自由基产生的脂质过氧化物堆积所造成的细胞及亚细胞的损伤, 维持细胞膜结构完整与功能正常, 从而保护生物膜使其不受损害。鉴于其对机体具有重要的抗氧化保护特性, 已经把这种酶的活性高低作为自由基代谢方面机体抗氧化水平的重要标志。

与其它所有处理组相比,注射 DEX 和 ACTH 后,血液 GSH-Px 显著降低 ($P<0.01$, 表 2-23),二者差异不显著 ($P>0.05$);同时相应注射 Ru486 后,血液 T-AOC 比相对应的不注射组均显著升高 ($P<0.01$),但数值仍低于对照组;与对照组相比,注射 PSS 反使得血液 GSH-Px 显著降低 ($P<0.01$),但显著高于注射 DEX 和 ACTH 组 ($P<0.01$),同时注射 Ru486 使得 GSH-Px 升高;3 个注射 Ru486 的处理以及对照组的 GSH-Px 均较高,但 4 者差异不显著 ($P>0.05$)。另外,29d 与 40d 相比差异不显著 (147.62 ± 20.62 和 141.91 ± 26.31 ; $P=0.2370$)。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长,血清 GSH-Px 值逐渐降低,4h、8h、12h 和 24h 分别为: 155.14 ± 15.96 , 139.02 ± 24.49 , 138.84 ± 27.09 和 144.71 ± 22.45 ($P=0.0394$)。8~12h 的至最低,显著低于 4h 的值 ($P<0.01$),两处理变异较小,提示我们激素处理后 8~12h 做实验更加合适。

表 2-23 处理对肉仔鸡血浆 GSH-Px (U/ml) 活性的影响

Table 2-23 Effect of DEX and ACTH on GSH-Px activity in broiler serum

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	163.47±4.17 ^{aA}	162.40±2.84 ^A	164.36±6.32 ^A	162.14±2.53 ^{aAB}	162.38±1.84 ^A	162.72±2.50 ^{aAB}
PSS	149.01±6.53 ^{bb}	122.30±26.45 ^B	125.93±20.52 ^B	151.43±1.01 ^{bb}	123.86±25.36 ^B	155.97±2.41 ^{abABC}
R+S	158.12±3.17 ^{aAB}	156.76±4.21 ^A	156.10±3.37 ^A	158.21±0.51 ^{abAB}	154.82±2.50 ^A	161.33±2.32 ^{aAB}
DEX	118.78±10.20 ^{cC}	118.91±29.27 ^B	119.95±10.51 ^B	126.61±4.29 ^{cC}	98.64±9.52 ^C	134.04±23.85 ^{cC}
R+D	160.66±3.70 ^{aA}	156.11±8.63 ^A	162.71±2.38 ^A	161.61±1.26 ^{aAB}	151.21±6.10 ^A	160.75±5.37 ^{aAB}
ACTH	118.86±13.65 ^{cC}	118.26±29.27 ^B	120.06±14.41 ^B	118.04±4.80 ^{dC}	95.44±4.39 ^C	140.60±16.29 ^{bcBC}
R+A	164.43±11.77 ^{aA}	159.12±5.61 ^A	163.86±5.66 ^A	165.54±6.31 ^{aA}	150.32±4.80 ^A	170.59±6.82 ^{aA}
A, P [#]	147.62, 0.0001	141.98, 0.0001	144.71, 0.0001	149.08, 0.0001	133.81, 0.0001	155.14, 0.021

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/number of observations;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

表 2-24 处理对肉仔鸡血浆 SOD (U/ml) 活性的影响

Table 2-24 Effect of DEX and ACTH on SOD activity in broiler serum

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	145.35±8.69 ^{abA}	148.57±11.57 ^A	141.85±3.58 ^{bBC}	158.06±2.87 ^{aA}	154.14±10.13 ^A	138.53±3.25 ^{aA}
PSS	115.10±4.86 ^{dC}	113.28±7.74 ^B	112.66±10.44 ^{cD}	115.30±4.91 ^{dE}	116.17±1.69 ^C	113.65±5.44 ^{cdDE}
R+S	134.60±4.49 ^{cB}	139.00±17.50 ^A	149.65±12.99 ^{bAB}	137.41±0.64 ^{bBC}	131.92±2.98 ^B	127.43±5.74 ^{bB}
DEX	118.98±4.59 ^{dC}	112.80±8.97 ^B	120.91±3.60 ^{cD}	123.21±6.29 ^{cDE}	115.64±6.42 ^C	109.01±5.30 ^{dE}
R+D	147.98±11.39 ^{aA}	151.02±28.14 ^A	169.15±19.99 ^{aA}	161.74±1.60 ^{aA}	143.05±3.22 ^{AB}	129.41±3.73 ^{bB}
ACTH	120.57±6.78 ^{dC}	108.88±8.15 ^B	108.04±5.76 ^{cD}	128.05±0.29 ^{cCD}	114.52±12.25 ^C	117.87±1.68 ^{cCD}
R+A	139.74±9.61 ^{bcAB}	147.75±20.65 ^A	157.65±9.74 ^{abAB}	140.25±0.87 ^{bB}	149.01±9.54 ^A	124.32±3.01 ^{bBC}
A, P [#]	131.76, 0.0001	131.61, 0.0001	137.13, 0.0001	137.72, 0.0001	132.06, 0.0001	122.89, 0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/number of observations;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

2.2.3.3 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后,与其它所有处理组相比,血液 SOD 显著降低($P<0.01$,表 2-24),三者差异不显著($P>0.05$);同时相应注射 Ru486 后,血液 SOD 比相对应的不注射组均显著升高($P<0.01$);3 个注射 Ru486 的处理以及对照组的 SOD 均较高,但 4 者差异不显著($P>0.05$)。29d 与 40d 差异不显著(131.76 ± 14.49 和 131.61 ± 23.39 , $P=0.9698$)。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长,血清 GSH-Px 值逐渐降低,4h、8h、12h 和 24h 分别为: 137.13 ± 24.21 、 137.72 ± 16.83 、 132.06 ± 17.34 和 122.89 ± 10.24 ($P=0.0161$)。激素处理 24h 后,肉仔鸡血液 SOD 值降至最低,显著低于 4h 的值($P<0.01$),4h 和 8h 两处理变异较小,提示我们激素处理后 4~12h 做实验更加合适。

3.2.3.4 过氧化氢酶(Catalase, CAT)

CAT 广泛存在于动植物体内,作用是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,防止它与 $\cdot O_2$ 生成更有害的 $\cdot OH$,保护组织免受毒害。生物体内, $\cdot O_2$ 被 SOD 催化转变成 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 可被 CAT 清除。过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 也可清除 H_2O_2 。SOD、CAT、POD 组成了一个防御体系,共同清除自由基, Fridovich (1977) 将其称之为保护酶系统。研究普遍认为,保护酶在清除自由基和保护机体免受损伤方面有重要作用 (方允中等, 1989)。

表 2-25 处理对肉仔鸡血浆 CAT (U/ml) 的影响

Table 2-25 Effect of DEX and ACTH on CAT activity in broiler serum

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	69.21±6.20 ^{cC}	69.83±3.83 ^{cC}	68.07±2.08 ^{dD}	79.10±0.55 ^{eF}	65.89±1.05 ^D	69.64±5.25 ^{cD}
PSS	103.26±16.52 ^{bAB}	89.71±8.30 ^{bAB}	103.72±4.75 ^{bB}	125.10±0.83 ^{cC}	92.21±6.59 ^B	82.61±1.76 ^{aAB}
R+S	79.38±4.14 ^{cC}	75.30±3.84 ^{cBC}	78.08±2.51 ^{cdCD}	84.39±1.85 ^{fF}	72.47±2.30 ^{CD}	78.96±1.51 ^{abABC}
DEX	116.14±25.43 ^{abA}	96.10±11.27 ^{abA}	122.18±15.63 ^{aA}	142.63±2.60 ^{bB}	97.97±3.89 ^B	84.97±3.32 ^{aA}
R+D	80.85±6.69 ^{cC}	74.21±5.85 ^{cC}	81.44±2.39 ^{cd}	90.14±1.50 ^{eE}	72.34±5.31 ^{CD}	74.16±0.91 ^{bcCD}
ACTH	121.95±25.36 ^{aA}	101.80±18.82 ^{aA}	129.51±12.99 ^{aA}	149.06±1.56 ^{aA}	107.70±1.57 ^A	84.85±7.61 ^{aA}
R+A	84.52±8.87 ^{cBC}	77.42±6.70 ^{cBC}	84.53±2.61 ^{cC}	96.12±1.17 ^{dD}	78.03±7.42 ^C	74.55±4.29 ^{bcBCD}
A,P [#]	93.61,0.0001	83.48,0.0001	95.36, 0.0001	109.50,0.0001	83.80,0.0001	78.53,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/number of observations;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

注射 ACTH、DEX 和 PSS 后,血液 CAT 显著降低($P<0.01$,表 2-25),三者差异不显著($P>0.05$);同时相应注射 Ru486 后,血液 CAT 比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$),但与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。另外,29d 血液 CAT 值高于 40d (93.61 ± 24.04 和 83.48 ± 14.61 ; $P=0.0176$)。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长,血清 CAT 值先升高再降低,4h、8h、12h 和 24h 分别为: 95.36 ± 23.27 、 109.51 ± 27.80 、 83.80 ± 15.25 和 78.53 ± 6.70 ($P=0.0001$)。激素处理 24h 后,肉仔鸡血液 MDA 值降至最低,显著低于 4h 和 8h 的值 ($P<0.01$),8h 的值最高,显著高于 4h($P<0.05$),以及 12h 和 24h ($P<0.01$),12h 和 24h 两处理变异较小 ($P>0.05$),提示我们激素处理后 8h 作实验更加合适,24h 激素已经基本代谢完毕。

2.2.3.5 丙二醛 (MDA)

当机体受到应激时, 机体防御体系的抗氧化能力下降, 体内自由基代谢产物(MDA)含量升高。本文测定不同日龄肉仔鸡, 随着应激处理时间的延长, 其血液 MDA 的变化情况。

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后, 与其它所有处理组相比, 血液 MDA 显著升高 ($P<0.01$, 表 3.3-9), 三者差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, 血液 MDA 比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$); 3 个注射 Ru486 的处理以及激素处理组的 MDA 均较高, 显著高于对照组 ($P<0.01$)。另外, 29d 血液 MDA 小于 40d (9.20 ± 2.10 和 9.72 ± 2.02 ; $P=0.02190$)。

激素注射处理后随着 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长, 血清 MDA 值逐渐降低, 4h、8h、12h 和 24h 分别为: 9.09 ± 1.87 、 10.75 ± 2.68 、 9.84 ± 2.17 和 8.66 ± 1.39 ($P=0.0079$)。处理后 8h MDA 升到最高, 显著高于 4h ($P<0.05$) 和 24h ($P<0.01$), 激素处理 24h 后, 肉仔鸡血液 MDA 值降至最低, 显著低于 4h 和 12h 的值 ($P<0.01$), 提示我们激素处理后 8~12h 作实验更加合适。

表 2-26 处理对肉仔鸡血浆 MDA (nmol/ml 血浆) 的影响

Table 2-26 Effect of DEX and ACTH on serum MDA content of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h, n=28	8h, n=14	12h, n=28	24h, n=28
C	6.78±0.92 ^d	7.11±0.58 ^{dC}	6.77±0.90 ^{dC}	7.37±0.27 ^{dD}	7.50±0.31 ^{dC}	6.26±0.72 ^C
PSS	9.32±1.14 ^{bBC}	10.02±0.84 ^{bB}	9.11±0.94 ^{bB}	10.96±0.53 ^{bB}	10.15±1.01 ^{bB}	8.94±0.46 ^B
R+S	7.95±1.03 ^{bcCD}	8.52±0.45 ^{cBC}	7.58±1.32 ^{cdBC}	8.50±0.80 ^{cdCD}	8.52±0.52 ^{cdBC}	8.33±0.48 ^B
DEX	10.92±2.26 ^{aAB}	12.16±1.85 ^{aA}	11.09±1.36 ^{aA}	14.07±1.20 ^{aA}	12.66±1.77 ^{aA}	9.29±0.97 ^B
R+D	8.80±0.84 ^{bc}	9.14±0.48 ^{bcB}	8.74±0.38 ^{bcB}	9.92±0.13 ^{b^cBC}	9.02±0.74 ^{bcBC}	8.59±0.78 ^B
ACTH	12.00±1.87 ^{aA}	12.29±1.29 ^{aA}	11.69±0.39 ^{aA}	14.73±0.53 ^{aA}	12.69±1.44 ^{aA}	10.70±0.92 ^A
R+A	8.62±0.83 ^{bcD}	8.80±0.51 ^{cB}	8.68±0.88 ^{bcBC}	9.73±0.67 ^{bcBCD}	8.38±0.41 ^{cdBC}	8.51±0.31 ^B
A, P [#]	9.20, 0.0001	9.72, 0.0001	9.09, 0.0001	10.75, 0.0001	9.84, 0.0001	8.66, 0.0001

A, B, C; a, b, c, d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/numbers of observed;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

2.2.3.6 磷酸肌酸激酶 (Creatine Phosphokinase, CK)

CK 包括肌肉型 (MM)、心肌型 (MB) 和脑型 (BB) 三种同工酶, 对机体的能量代谢, 特别是肌肉收缩起重要作用, 人体内 CK 以骨骼肌含量最多, 含量为 3386.6 IU/g 鲜组织(wakabayashi 等, 1979)。骨骼肌细胞膜的完整性受到损伤后, 组织内的 CK-MM 含量减少, 血液中含量增加, 因此血清中这种肌肉特异性酶的增加常作为肌肉损伤的标志 (Byrnes 等, 1985; Clarkson 等, 1992; Ebbeling 和 Clarkson, 1989; Nosaka 和 Clarkson, 1996)。刘建华 (2000) 等认为高温可以明显使 CK 的活性呈升高趋势。

注射 DEX、ACTH 和 PSS 后, 与其它所有处理组相比, 血液 CK 显著升高 ($P<0.01$, 表 3.3-7), 三者差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, 血液 CK 比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$), 但仍高于对照组 ($P<0.01$)。另外, 29d 血 CK 与 40d 差异不显著 (1.4668 ± 1.2629 和 1.0764 ± 0.7940 , $P=0.0818$)。

激素注射处理后随 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长, 血清 CK 值先升高再逐渐降低,

4h、8h、12h 和 24h 分别为: 1.5438±0.986、2.5878±1.769、1.1230±0.5879 和 0.5875±0.192 (P=0.0001)。激素处理 8h, CK 升至最高, 显著高于其他处理时间段 (P<0.01), 12h 和 24h 的 CK 值均低于 4h, 提示我们激素处理后 8-12h 进行试验更加合适。

表 2-27 处理对肉仔鸡血浆 CK (U/ml) 活性的影响

Table 2-27 Effect of DEX and ACTH on serum CK activity of broilers

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	29d, n=56	40d, n=42	4h,n=28	8h,n=14	12h,n=28	24h,n=28
C	0.3317±0.0612 ^{bc}	0.3679±0.0351 ^{dc}	0.2953±0.0546 ^{ed}	0.3872±0.0155 ^{db}	0.3717±0.0527 ^{dc}	0.3548±0.0304 ^{cb}
PSS	2.0493±1.182 ^{aAB}	1.3281±0.664 ^{bcAB}	2.2936±0.231 ^{cb}	3.6421±0.133 ^{ba}	1.2462±0.112 ^{bb}	0.7299±1.111 ^{aA}
R+S	0.9462±0.426 ^{bcB}	0.6861±0.156 ^{cdBC}	0.8663±0.0776 ^{dc}	1.5116±0.387 ^{cb}	0.8226±0.0790 ^{cBC}	0.4770±0.0396 ^{bcB}
DEX	2.6367±1.627 ^{aA}	1.6509±0.760 ^{abA}	2.6097±0.307 ^{baB}	4.944±0.470 ^{aA}	1.8743±0.204 ^{aA}	0.7939±0.135 ^{aA}
R+D	0.9856±0.483 ^{bcB}	0.6849±0.223 ^{cdBC}	0.8323±0.0887 ^{dc}	1.7216±0.275 ^{cb}	0.8216±0.0495 ^{cBC}	0.4838±0.0926 ^{bb}
ACTH	2.4095±1.617 ^{aA}	2.0912±1.087 ^{aA}	2.9050±0.301 ^{aA}	4.6944±0.860 ^{aA}	1.8895±0.606 ^{aA}	0.8151±0.0996 ^{aA}
R+A	0.9086±0.2905 ^{bcB}	0.7245±0.259 ^{cdBC}	1.0041±0.0767 ^{dc}	1.2141±0.00309 ^{cdB}	0.8350±0.127 ^{cBC}	0.4578±0.0429 ^{bcB}
A,P [#]	1.4668,0.0001	1.0764,0.0001	1.5438,0.0001	2.5878,0.0001	1.1230,0.0001	0.5875,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/number of observations;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

2.2.3.7 天冬氨酸氨基转移酶 (AST)

AST 广泛存在于多种器官, 按含量多少顺序为心脏、肝、骨骼肌和肾, 还有少量存在于胰腺、脾、肺及红细胞中, 肝 AST 大部分(70%)存在于肝细胞线粒体中, 应激时肝脏细胞受损, 转氨酶便会释放到血液里, 使血清转氨酶升高, 肌肉损伤时正常或轻度升高(可高达 2-5 倍); 肌萎缩时明显上升(可达 8 倍)。

表 2-28 处理对肉仔鸡血浆 AST (U/ml) 活性的影响

Table 2-28 Effect of DEX and ACTH on AST activity in broiler serum

处理 Treatment	屠宰日龄 Slaughter day		注射处理后的时间 Hours after injection			
	20d, n=56	40d, n=42	4h,n=28	8h,n=14	12h,n=28	24h,n=28
C	24.02±5.72 ^{dc}	27.13±4.80 ^{cb}	19.15±2.80 ^B	21.06±0.12 ^{TE}	28.51±2.09 ^D	30.54±0.86 ^E
PSS	38.52±10.38 ^{bcBC}	40.96±11.34 ^{bcAB}	25.33±1.37 ^A	34.92±0.60 ^{dc}	48.63±1.00 ^C	47.06±0.66 ^C
R+S	26.59±6.50 ^{cdC}	27.13±6.10 ^{cb}	18.78±1.45 ^B	27.59±1.20 ^{ed}	29.76±5.48 ^D	31.54±0.56 ^E
DEX	58.36±22.95 ^{aA}	61.28±28.80 ^{aA}	24.12±0.88 ^A	58.40±1.38 ^{aA}	81.70±4.54 ^A	73.63±2.61 ^A
R+D	39.26±15.08 ^{bcBC}	41.92±17.48 ^{bcAB}	19.12±1.28 ^B	34.50±1.20 ^{dc}	50.00±2.57 ^C	55.05±1.96 ^B
ACTH	45.79±14.86 ^{abAB}	48.18±17.07 ^{abAB}	25.47±1.55 ^A	42.58±2.01 ^{bb}	60.89±1.63 ^B	56.19±0.69 ^B
R+A	36.57±10.88 ^{bcdBC}	38.05±14.09 ^{bcAB}	20.27±1.55 ^B	37.75±0.63 ^{cC}	48.89±2.44 ^C	42.17±1.90 ^D
A,P [#]	38.45,0.0001	40.66,0.0110	21.75,0.0001	36.69,0.0001	49.77,0.0001	48.03,0.0001

A,B,C; a,b,c,d, BM, TM, C, S, R, R+S, DEX, R+DEX, ACTH, R+ACTH, 同表 2-7。 Same as table 2-7.

*: 注射处理到屠宰的时间/观察值个数; the time from injection to slaughter/number of observations;

#: 平均值和 P 值; the average value and P value.

注射 DEX 和 ACTH 后, 与其它所有处理组相比, 血液 AST 显著升高 (P<0.01, 表 2-28),

ACTH 低于 DEX, 但二者差异不显著 ($P>0.05$); 同时相应注射 Ru486 后, 血液 AST 比相对应的不注射组均显著降低 ($P<0.01$), 但数值仍高于对照组; 注射 PSS 使得血液 AST 显著升高 ($P<0.01$), 但仍显著低于注射 DEX 和 ACTH 组 ($P<0.01$), 同时注射 Ru486 使得 AST 降低。另外, 29d 的 AST 虽低于 40d, 但差异不显著 (38.45 ± 16.71 和 40.66 ± 18.62 ; $P=0.5374$)。

激素注射处理后随着 DEX、ACTH 和 Ru486 作用时间的延长, 血清 AST 值先逐渐升高而后降低, 4h、8h、12h 和 24h 分别为: 21.75 ± 3.25 、 36.69 ± 11.41 、 49.77 ± 17.43 和 48.03 ± 14.38 ($P=0.0001$)。12h 的至最高, 显著高于 4h 和 8h 的值 ($P<0.01$), 12 和 24h 两处理变异较小, 提示我们激素处理后 12h AST 表现较为明显。

2.3 讨论

2.3.1 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉质的影响

动物受到应激 (热、冷等) 时, 血中促肾上腺激素 (ACTH) 浓度会迅速增加, 糖皮质激素 (GC, 血清皮质醇、酮) 也相应明显升高 (Ben Nathan 等, 1976; Marshaly 等, 1984; Gould 和 Siegel, 1985; Davis 和 Siopes, 1987; Smith 和 Dobson, 1990; Devhim 和 Teeter, 1991; 杜荣和顾宪红, 1995; Geraert 等, 1996; Mitchell 等, 1997; Kannan 等, 1997a, b; Hocking 等, 1999; 刘铀等, 1999; Littin 和 Cockrem, 2001), 在这一反应中, 除垂体-肾上腺皮质系统参加外, 交感-肾上腺髓质系统也参加, 应激反应中, 血中儿茶酚胺含量也相应增加。应激反应可能从以下几个方面调节机体的适应能力: ①减少应激刺激引起的一些物质 (缓激肽、蛋白水解酶及前列腺素等) 的产生量及其不良作用; ②使能量代谢以糖代谢为中心, 保持对重要器官 (如脑和心) 的葡萄糖供应; ③在维持血压方面起允许作用, 增强儿茶酚胺对血管的调节作用。应激反应中, 除 ACTH、GC 与儿茶酚胺的分泌增加外, β -内啡肽、生长素、催乳素、抗利尿激素、胰岛素及醛固酮等均可增加, 说明应激反应是多种激素参与并使机体抵抗力增强的非特异性反应。

GC 作用广泛而复杂, 医学上认为皮质醇 (酮) 属于分解代谢类异化激素 (谢敏豪, 1993), GC 促进蛋白质分解, 较多的氨基酸进入肝脏, 同时增强肝内与糖异生有关酶的活性, 致使糖异生过程大大加强, 还能促进脂肪分解, 增强脂肪酸在肝内氧化过程, 有利于糖异生作用, 同时又有抗胰岛素作用, 升高血糖。GC 的分泌与应激强度 (量、时间) 呈一定正比例关系, 应激强度大则分泌多, 此时会因蛋白质分解增强, 合成减少, 而出现肌肉消瘦、骨质疏松、皮肤变薄、淋巴组织萎缩等现象, 因为肌肉是动物体内能量的储存器官, 因此, 此反应剧烈可造成肌肉细胞损伤或凋亡; 皮质醇也影响水在体内的分布, 可减少水分进入细胞并促进细胞内水分排出, 从而增加细胞外液的含量, 直接影响肌肉细胞的功能以及肉品质 (蛋白含量、滴水损失等); 另外, GC 对身体不同部位的脂肪作用不同, 四肢脂肪组织分解增强, 而腹、面、肩及背部脂肪合成有所增加, 以致呈现面圆、背厚、躯干部发胖而四肢消瘦的特殊体形。本研究表明, 注射 ACTH、DEX 和生理盐水均显著影响了肉品质 (pH 值降低、滴水损失和肉品剪切强度增加), 同时注射 Ru486 后这种肉品质的不正常得到了缓解, 但均未恢复到未注射状态。腿肌的 pH 值、滴水损失、剪切强度均显著高于胸肌 ($P<0.01$); 29d 屠宰的肉品 pH 值、滴水损失均显著高于 40d ($P<0.01$); 40d 屠宰鸡肌肉的剪切强度显著高于 29d ($P<0.01$); 随处理后屠宰时间的延长 (4, 8, 12 和 24h), 肌肉 pH 值降低、滴水损失和剪切强度增加趋势明显。

2.3.2 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡血液生化指标的影响

促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotropin Hormone, ACTH) 是腺垂体释放的一种激素, 主要刺激肾上腺束状带和网状带的增生, 促进糖皮质激素 (Glucocorticoid, GC) 的合成和分泌。朱海宏等 (2005) 研究认为低氧应激会增加老鼠外周血 ACTH 含量, Gould 和 Siegel (1985) 研究表明肌注 (或静注) ACTH 降低了肉仔鸡 HDL (High-density lipoproteins, 高密度脂蛋白) 的相对含量, 降低血液 GC 最大结合力 (maximum corticosteroid binding capacity, MCBC), 增加了血清皮质酮浓度 (Gould 和 Siegel, 1985b), 而 Beuving 等 (1989) 给蛋鸡注射 ACTH (0.1 IU/kg BW), 14min 后皮质酮浓度开始增加, Puvadolpirod 和 Thaxton (2000a) 连续 7 天给 5 周龄肉鸡体外注射 ACTH (8IU/kg BW/d), 高皮质酮浓度水平可维持 6 天。Puvadolpirod 和 Thaxton (2000a 和 2000b) 的试验表明, 注射 ACTH 使肉鸡血液 H: L (Heterophil to Lymphocyte ratios) 比值在 2 天后开始上升, 较高浓度可持续 10 天。国内也有人研究了肉鸡腿部肌注地塞米松 (DEX, 6mg/kg BW) 或 ACTH (6IU/kg BW) 对鸡血浆纤维连接蛋白含量影响 (梁礼成等, 2000)。动物应激时, ACTH 分泌增加, 进而刺激肾上腺皮质分泌肾上腺皮质激素迅速增加 (Munck 等, 1984), 血清皮质激素 (Corticosterone, CORT) 与结合球蛋白 (Corticosteroid Binding Globulin, CBG) 连接, 运输到靶组织; 一旦与 CBG 结合, CORT 即失去活性, 正常情况下血液中的 CORT 80%~90% 以结合态存在, 应激时血液 CORT 的升高是因为 CORT 与 CBG 的结合力降低引起的 (Westphal, 1971; Dallman 等, 1989)。

由于应激时动物的共同反应是血液中 GC 升高, 于是人们试图通过 GC 或 ACTH 的注射或口服来模拟动物的应激状态。本研究表明, 注射 DEX 和 ACTH 后, 与其它所有处理组相比, 血液 TAOC、GSH-Px 和 SOD 均降到了最低, 显著低于对照组 ($P<0.01$), 二者差异不显著 ($P>0.05$); CAT、MDA、CK 和 AST 则升到了最高, 显著高于对照组 ($P<0.01$), 两种处理差异不显著 ($P>0.05$)。同时相应注射 Ru486 后, 血液各生化指标均得到了恢复, 与相对应的不注射组均有显著变化 ($P<0.01$), 但数值高 (T-AOC、MDA、CK 和 AST) 或低于 (GSH-Px、SOD、CAT) 对照组 ($P<0.01$); 与对照组相比, 注射 PSS 也影响到了血液生化指标, 但达不到注射 DEX 和 ACTH 的剧烈程度。

与 29d 相比, 40d 的 TAOC、GSH-Px、SOD、CAT 和 CK 均有下降的趋势, MDA 和 AST 升高; 但只有 CAT 显著降低, MDA 显著升高 ($P<0.05$), 其余指标均差异不显著 ($P>0.05$)。血液生化指标对激素处理的敏感性基本不受日龄的影响。

处理后, 随着激素作用时间 (4h, 8h, 12h 和 24h) 的延长, TAOC 逐渐降低, 8~12h 无差异; GSH-Px 先降低再升高, 8~12h 最低, 无差异; SOD 逐渐降低, 4~8h 无差异; CAT、MDA、CK 先升高再降低, 8h 最高; AST 则先升高, 在 12~24h 达到最高。综合考虑血液生化指标, 可以认为 ACTH 或 DEX 注射后 8h 开展试验比较合适。

2.3.3 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉质生化指标的影响

GC 的作用机理可以分为几方面, 基因调节学说和通过膜受体快速激活细胞内促分裂源活化的蛋白激酶 (MAPK) 介导的信号通路等。皮质类固醇是控制凋亡水平的重要物质之一, 应激时动物分泌大量的 GC, 在 GC 作用下骨骼肌分解代谢加速, 引起组织消耗, 动员能量, 增强机体

对外部不良环境的适应能力。注射 DEX 提高了血液葡萄糖转运蛋白 (Glucosetransporters, GLUTs) 的表达 (钟琳等, 2007), 在治疗和免疫抑制方面 DEX 的研究报道较多。

GC 通过与靶组织细胞膜上的糖皮质激素受体 (GR) 结合, 而发挥其作用, 各类细胞均含有丰富的 GR, 因此阻断 GR 的功能, 改变 GR 的活性, 或减少 GR 的表达, 都有可能有效地阻止 GC 的作用。Ru486 (Mifepristone, 米非司酮, 17β -羟- 11β (4-二甲氨基苯) - 17α 丙炔基-1-雌甾-1, 9-烯-3-酮) 是一种能与 GC 竞争结合 GR 但无 GC 作用的甾类化合物, 其对 GR 的亲合力高, 与大鼠 GR 的亲合力约是 DEX 的 3 倍, 且解离速度慢, 因此是一种良好的 GR 功能阻断剂或 GC 拮抗剂, 可用于缓解过度应激时激素引起的对细胞的破坏作用。潘兴华等 (1999) 研究认为给予雏鸡 50mg/kg RU₄₈₆, 可使外周血淋巴细胞 GR 的结合容量下降 60% 左右。

本研究表明, 注射 DEX、ACTH 和 PSS 后组织 (胸肌、腿肌、肝脏和心肌) 匀浆中蛋白含量、MDA 显著或极显著增加, GSH-Px 和 SOD 显著或极显著降低; 同时注射 Ru486 后这种组织的不正常氧化还原状态得到改善, 显著好于仅注射 DEX、ACTH 和生理盐水组, 但仍差于对照组。

40d 的胸肌和腿肌的 MDA、SOD、GSH-Px、组织匀浆中 CP 含量均显著或极显著高于 29d, 心脏和肝脏除组织匀浆中 CP 含量差异不显著外, 其余 40d 测定的指标也显著或极显著高于 29d。

注射处理后 4h、8h、12h 和 24h 屠宰测定的有关氧化还原状态表明, 组织不同对同一指标的反应有别, 基本上以 8h~12h 为合适的作用时间。应激初期 (4~8h) SOD 活性急剧下降, 相对应的 MDA 含量正处于上升期, 随后各处理组 GSH-Px 活性均出现缓慢上升。在 GSH-Px 活性回升阶段, MDA 含量出现下降趋势, 说明机体肝脏组织由于超氧化处理的原因, 使得抗氧化与过氧化平衡体系产生剧烈的动荡, 动荡的前期似乎氧化作用占主导地位, 但随后则由抗氧化作用占主导地位。

2.4 小结

2.4.1 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉质的影响

注射 ACTH、DEX 和 PSS 均显著影响了肉品质 (pH 值降低、滴水损失和肉品剪切强度增加); 组织 (胸肌、腿肌、肝脏和心肌) 匀浆中蛋白含量、MDA 显著或极显著增加, GSH-Px 和 SOD 显著或极显著降低; 血液 TAOC、GSH-Px 和 SOD 均降到了最低, 显著低于对照组 ($P<0.01$), 二者差异不显著 ($P>0.05$); CAT、MDA、CK 和 AST 则升到了最高, 显著高于对照组 ($P<0.01$), 两种处理差异不显著 ($P>0.05$)。同时相应注射 Ru486 后, 血液各生化指标均得到了恢复, 与相对应的不注射组均有显著变化 ($P<0.01$), 但数值高 (TAOC、MDA、CK 和 AST) 或低于 (GSH-Px、SOD、CAT) 对照组 ($P<0.01$); 同时注射 Ru486 后这种肉品质的不正常得到了缓解, 但均未恢复到未注射状态。

2.4.2 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡肉品生化指标的影响

29d 的肉品 pH 值、滴水损失均显著高于 40d ($P<0.01$); 与 29d 相比, 40d 的血液 TAOC、GSH-Px、SOD、CAT 和 CK 均有下降的趋势, MDA 和 AST 升高; 但只有 CAT 显著降低, MDA 显著升高 ($P<0.05$), 其余指标均差异不显著 ($P>0.05$)。40d 屠宰鸡肌肉的剪切强度显著高于 29d ($P<0.01$); 40d 的胸肌和腿肌的 MDA、SOD、GSH-Px、组织匀浆中 CP 含量均显著或极显著高

于 29d, 心脏和肝脏除组织匀浆中 CP 含量两处理阶段差异不显著外, 其余 40d 测定的指标也显著或极显著高于 29d。

2.4.3 肌肉注射 DEX 和 ACTH 对肉仔鸡血液生化指标的影响

随着处理后屠宰时间的延长 (4h、8h、12h 和 24h), 肌肉 pH 值降低、滴水损失和剪切强度增加趋势明显。注射处理后屠宰测定的有关组织氧化还原状态表明, 组织不同对同一指标的反应有别, 基本上以 8h-12h 为合适的作用时间。综合考虑血液生化指标, 可以认为 ACTH 或 DEX 注射后 8h 开展试验比较合适。

2.4.4 结论

由本研究得出的氧化应激模型为: 40d 肉仔鸡肌肉注射 DEX (6mg/kg BW) 和 ACTH (8IU/kg BW) 8h 后屠宰, 可用于制造动物的急性组织、血液、肉质氧化应激状态。

第三章 慢性氧化应激动物试验模型的研究

近年来,人们对包括肉品在内的食品质量与健康的关系越来越关注,不仅要求肉品质安全卫生,能提供丰富的营养,少含不利于健康的成分,而且还要求肉品有良好的外观和良好的口感。然而当今肉鸡品种(品系)在生产性能提高的同时,对环境愈来愈敏感。加之在现代化养殖条件下,应激源不断增多,这些应激源强度小,作用持久,对动物的影响更加广泛和普遍,使得肉鸡经常处于不同应激中。应激对肉鸡造成的危害越来越大,不仅影响肉鸡生产性能的发挥,还影响了肉鸡的健康状态和肉品质。

为了研究应激的影响及其作用机制,人们常用动物来模拟实际生产中的应激环境,如捕捉、运输、恐慌、惊吓、气味、拥挤、温度和噪音等,来研究应激对动物及其产品的影响。近年来,随动物福利呼声的高涨,寻求更加温和、便捷的应激处理方法越来越受到关注。尽管应激源不同,但应激首先造成机体 GC 分泌量的增加。给肉鸡体内埋植微型泵释放 ACTH、饲喂或饮水皮质酮溶液,均对动物造成应激反应(Lin 等, 2006; 隋绍娟, 2006; Post 等, 2003; Puvadolpirod 等, 2000a,b,c; Siegel 等, 1995)。但这些方法存在不同程度的操作麻烦和价格昂贵等缺点。

本试验研究了饮水中添加可的松对肉仔鸡生产性能和消化代谢、肉质、血液和组织抗氧化状态、肉仔鸡组织器官发育、肉质等指标的影响,以便建立慢性氧化应激的动物试验模型,为进一步研究应激机理提供依据。

3.1 材料与方方法

表 3-1 日粮组成及营养水平(风干状态)

Table 3-1 Composition and nutrient level of diet (air-dried basis)

原料 Ingredients	组成, %	营养素 Nutrient	水平 Content
玉米 Corn	57.91	代谢能(MJ/kg) ME	12.48
大豆粕 Soybean meal	30.31	粗蛋白# (%) CP	20.48
棉籽粕 Cottonseed meal	3.0	钙# (%) Calcium	0.85
菜籽粕 Rapeseed meal	1.0	磷# (%) Phosphor	0.6
豆油 Soybean oil	2.85	有效磷 (%) AP	0.43
赖氨酸 Lysine	0.06	赖氨酸(%) Lysine	1.07
蛋氨酸 Met	0.14	蛋氨酸(%) Met	0.38
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	1.55	蛋+胱氨酸(%)Met+Cys	0.72
石粉 Limestone	1.18	苏氨酸 (%) Threonine	0.76
预混合饲料*Premix	1.0	色氨酸(%) Tryptophan	0.26
合计 Total	100		

*: 每 kg 日粮中提供, Provided per kg of diet: VA 12500 IU, VD₃ 4480 IU, VK₃ 3.0mg, VB₁ 1.5mg, VB₂ (核黄素, riboflavin) 6.0mg, VB₆ 3.0mg, 泛酸(VB₃)D-pantothenic acid 14.0mg, VB₁₂ 0.02mg, 生物素 biotin100μg, 维生素 E 30 IU,烟酸(尼克酸) nicotinic acid 80mg, 叶酸 1.5mg, Mn (as manganese sulfate) 88mg; Zn (as zinc oxide) 95mg; Fe (as ferrous sulfate) 100mg; Cu (as copper sulfate) 12.5mg; Se (as sodium selenite) 105μg; I (as calcium iodate) 900μg.

#: 表中数字指实测值, Determined value.

3.1.1 试验动物与试验设计

试验采用单因素完全随机设计。选择 21d 艾拔益加 (Arbor Acre, AA) 肉仔鸡公雏 320 只, 按体重随机分为 4 组, 每组设 8 个重复, 每重复 10 只鸡。各重复初始体重无统计差异 ($P>0.05$)。I、II、III 和 IV 四个处理分别在饮水中添加 0、10、20 和 30 mg/L 可的松 (K10A20050801, 河南利华制药有限公司)。试验自 2006 年 9 月 22 日开始到 2006 年 10 月 1 日结束, 为期 10 天。

3.1.2 试验日粮与饲养管理

3.1.2.1 试验日粮

日粮组成及营养水平见表 3-1。

3.1.2.2 饲养管理

试验前, 对整个鸡舍进行全面熏蒸消毒, 并对料槽和水槽进行二次消毒。免疫按常规免疫程序进行, 自由采食, 自由饮水。

3.1.3 测试指标及方法

3.1.3.1 生产性能数据记录和计算

分别于 21d 和 31d 下午 15:00 以重复为单位对鸡称重, 同时记录每重复的耗料量 (添加料重-剩余料重), 计算每重复平均日增重、耗料量和料重比。

3.1.3.2 血样的采集和分析

分别于试验开始后 0、1、2、3、6 和 10d 于早上 9:00 每重复随机取 1 只鸡, 空腹称重后, 立即心脏采血, 分离血清。快速将析出的血清分装, 于 -20°C 冰箱保存备用。

血常规 采用自动生化分析仪 (BS-200, 深圳迈瑞公司生产)。

3.1.3.3 饲料和粪样的采集和分析

采用全收粪法测定可的松饮水对饲料消化率的影响。给每个重复的粪盘铺上一次性塑料袋, 收集每天的粪样, 并称重, 混匀后, 取其中的 20% 量, 加入 10% 的盐酸混匀, 装入自封袋, -20°C 保存, 待测。

参照张丽英等 (2003) 的方法测定饲料和粪样中水分、粗蛋白质、粗脂肪、粗灰分含量。

3.1.3.4 肉鸡肉品质指标

分别于试验开始后第 0、1、2、3、6 和 10d 的早上 9:00 每个重复随机挑选 1 只试鸡, 剖解。

pH 值 于鸡右侧胸肌和腿肌分别取 20g, 用绞肉机绞碎后, 自封袋装袋, 测定屠宰后 45min 内 pH 值 (pH_1), 并将肉样放到 4°C 冰箱中, 测定 24h 后的 pH 值 (pH_{24})。

滴水损失 分别取鸡右侧的胸肌和腿肌 20g, 室温条件下, 胸肌沿肌纤维修剪成 $3\times 1\times 1\text{ cm}$ 的长方体肉块, 在玻璃纸上称重后, 顺着肌纤维将肉块放入充气的塑料袋中吊挂起来, 避免肌肉和塑料壁接触, 密封塑料袋口, 放到 $2\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 24h 后称重, 计算肌肉滴水损失。

滴水损失 $= (1 - a_2/a_1) \times 100\%$ 式中: a_1 为初始重; a_2 为滴水末重。

3.1.3.5 肉仔鸡肌肉组织发育与营养组成指标

分别于试验开始后第 0、1、2、3、6 和 10d 的早上 9:00 每个重复随机挑选 1 只试鸡, 剖解。取左侧的胸肌和腿肌 50g 左右放入自封袋, 于 -20°C 冰箱保存, 待实验室分析肌肉营养组成。

肌肉组织发育 分别取鸡右侧的整个胸肌和腿肌, 称重, 计算肌肉组织的相对重。

肌肉相对重 $= \text{肌肉重 (g)} / \text{活体重 (kg)}$ 。

肉营养组成 参照张丽英等 (2003) 的方法测定肌肉中水分、CP、EE。CP 用 Tecator 1030 自动定氮仪测定; EE 用经典的索氏抽提法进行测定。

3.1.3.6 皮质酮、甲状腺素和血糖的测定

分别于试验开始处理后第 0、1、2、3、6 和 10d 的早上 9:00 每个重复随机挑选 1 只试鸡, 心脏采血, 装入 5ml 离心管中, 呈 45 度倾斜放置 30min, 3000 转/分离心 15min, 吸取上清液, 分装到 1ml 离心管中, -20℃冰箱保存。

血清中的皮质酮激素和甲状腺激素 皮质酮、甲状腺素试剂盒 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA)。测定方法: 放射免疫分析法, 用中国科技大学实业总公司生产的 GC-911- γ 放射免疫计数器。

血糖 采用酶连续检测法, 在 CHEM-5 半自动生化分析仪 (北京生化分析仪器厂) 上测定。

3.1.3.6 血浆抗氧化指标的测定

分别于试验处理后第 0、1、2、3、6 和 10d 早上 9:00 每重复随机挑选 1 只试鸡, 心脏采血 3ml, 装入 5 ml 抗凝离心管中, 用低速离心机分离血浆后, 并分装到数个 1 ml 离心管中, -20℃冷冻保存待测。

血浆丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、还原性谷胱甘肽氧化酶 (GSH-Px)、总抗氧化能力 (T-AOC)、肌酸激酶 (CK)。采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 在 751 分光光度计上进行测定。

3.1.3.7 组织样品的采集和有关指标测定

分别于试验开始后第 0、1、2、3、6、10d 的早上 9:00 每个重复随机挑选 1 只试鸡, 称重, 剖解。取心脏、肝脏, 法氏囊、左侧胸腺第 3 窦、脾脏, 腹脂 (腹部脂肪和肌胃周围剥离的脂肪) 称重。并将心脏、左侧肝脏, 分别放入自封袋中, 液氮冷冻后, 于 -20℃冰箱保存。鸡右侧的肝脏, 放入自封袋中, 于 -20℃冰箱保存, 待测其水分和脂肪含量。

组织器官的相对重 组织器官相对重 = 组织器官重量 (g) / 活体重 (kg)。

组织抗氧化指标 将冷冻的心脏和肝脏取出, 解冻后, 取样 0.2g, 用冰冷的 PSS 漂洗, 除去血渍, 滤纸拭干, 称重, 放入玻璃匀浆管中, 按组织重量的 9 倍体积加 PSS, 先加 PSS 的 2/3 量, 用小剪刀尽快的剪碎后再将剩下的 1/3 量冲洗剪刀和玻璃匀浆管壁。将匀浆管下端插入盛有冰水的容器中, 打开玻璃匀浆机, 冰浴充分研磨匀浆。MDA、SOD、GSH-PX 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 测定按操作要求进行。

肝脏常规 参照张丽英等(2003)的方法测定肝脏中水分、粗脂肪。

3.1.4 数据处理与分析

数据用 Excel 处理后, 用 SAS 6.12 软件多样本平均数的 F 检验程序对数据进行差异显著性检验。试验数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示。

3.2 结果与分析

3.2.1 可的松饮水对肉仔鸡生产性能和消化代谢的影响

3.2.1.1 可的松对肉仔鸡的生产性能影响

可的松饮水对肉仔鸡生产性能的影响见表 3-2。可的松饮水期间日增重 (ADG, Average Daily Gain) 降低, 耗料量 (Feed Consumption, FC) 和饲料效率 (Feed/Gain, F/G) 增加, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。与对照组相比, II、III 和 IV 组 ADG 分别降低了 4.16%、0.64% 和 1.26%; FC

分别增加了 12.19%、0.91%和 8.37%；F/G 分别增加了 5.47%、13.28%和 10.16%。从生产性能看，各可的松饮水组均略影响了肉鸡生产性能，但试验期差异不显著 ($P>0.05$)。

表 3-2 可的松饮水对肉仔鸡生产性能的影响

Table 3-2 Effect of cortisone in drink water on broilers' performance

组别, Treatment	I	II	III	IV	P 值, P value
日增重, ADG, g/d	86.01±8.52	82.43±8.25	85.46±7.54	84.93±9.91	0.8452
日耗料量, FC, g/d	110.50±18.59	123.97±6.09	111.50±16.72	119.75±12.34	0.5011
饲料转化效率, F/G	1.28±0.57	1.35±0.61	1.45±0.85	1.41±0.42	0.2902

3.2.1.2 可的松饮水对肉鸡血液生理生化指标的影响

整个试验过程中的各时间点，可的松饮水对血液 CHOL、HDL、TG、CRE 均无显著影响 ($P>0.05$ ，表 3-3)。这表明可的松饮水对脂肪代谢的影响不显著。

可的松饮水对 LDL 在前期（处理 1d 后）有明显的影 响，三处理组的 LDL 浓度明显低于对照组，且第 IV 组含量显著 ($P<0.05$) 低于对照组，在试验的其它时间点，未见显著变化。

可的松饮水对血浆 TP 的影响仅在试验后期（处理 10d 后）比较显著，第 III 组含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，表明可的松饮水对蛋白代谢有明显影响。可的松饮水对血浆白蛋白浓度的影响同 TP 一致，应激后期（处理 10d 后），第 IV 组血浆白蛋白含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，表明可的松饮水对白蛋白的影响显著 ($P<0.05$)。

可的松饮水对谷草转氨酶 (AST) 的显著影响在应激前期就出现，处理 1 天后，第 IV 组血浆 AST 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)，在其它处理时间点未见显著差异，表明可的松饮水在该处理时间对 AST 活性有显著影响。

可的松饮水对血浆尿酸浓度有明显影响。试验处理 2d 后，第 II 组血浆中尿酸浓度显著高于对照组 ($P<0.05$)，处理 3d 后，第 III、IV 的尿酸含量明显低于对照组，其中第 III 组显著低于对照组 ($P<0.05$)，处理 6d 后，三个处理组血浆尿酸浓度均明显降低，以第 III 组最低。处理 10d 后，三个处理组血浆尿酸含量显著高于对照组，且第 III、IV 组极显著高于对照组 ($P<0.01$)。表明长时间可的松饮水可增加血浆尿素浓度。

可的松饮水对血浆肌酐浓度影响不显著，表明在本试验中肌酐含量未见明显影响。短期可的松饮水未见影响肉仔鸡脂肪代谢，但有降低 LDL、升高 TP、AST 活性和尿酸含量的趋势。

3.2.1.3 可的松饮水对肉鸡消化消化率的影响

可的松饮水在试验处理 3~4d 时显著降低日粮 CP 表观消化率 (表 3-4)。其中第 II、III 和 IV 组 CP 表观消化率分别比对照组降低了 11.21%、16.06% 和 22.54%，且第 III 和 IV 组极显著低于对照组 ($P<0.01$)，其它试验时间对 CP 表观消化率未见明显影响，该结果表明在可的松饮水在试验处理 3d 后，动物逐渐适应了可的松饮水，未见对 CP 表观消化率有明显影响。

可的松饮水在试验处理 3~4d 时显著降低日粮 EE 表观消化率。与对照组相比，第 II、III 和 IV 组 EE 表观消化率分别降低了 0.89%、8.7% 和 10.95%，第 III 和 IV 组极显著低于对照组 ($P<0.01$)。可的松饮水试验处理 3d 后，第 III 和 IV 组显著降低了 EE 表观消化率，与可的松饮水对 CP 表观消化率的规律相似，5d 以后不再影响 EE 表观消化率。

表 3-3 可的松饮水对肉鸡血浆生化指标的影响

Table 3-3 Effect of cortisone in drink water on physiological-biochemical parameters in broiler serum

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
总胆固醇 CHOL	I	3.04±0.30	2.99±0.21	2.55±0.29	3.13±0.31	2.94±0.26	3.07±0.39
	II	2.93±0.29	3.02±0.43	2.83±0.49	3.11±0.25	3.08±0.48	2.91±0.32
	III	2.91±0.36	2.92±0.19	2.63±0.47	3.16±2.45	2.89±0.44	3.15±0.28
	IV	2.81±0.36	3.08±0.38	2.84±0.27	3.34±0.32	2.68±0.58	3.25±0.43
	mmol/L P value	0.5103	0.7888	0.3758	0.3938	0.3759	0.3123
高密度脂 蛋白 HDL	I	3.12±0.16	2.76±0.19	2.61±0.26	3.01±0.25	3.01±0.25	2.84±0.27
	II	2.99±0.40	2.65±0.92	2.46±0.33	2.30±0.19	2.98±0.19	2.82±0.35
	III	2.92±0.37	2.48±0.70	2.47±0.51	3.04±0.29	3.04±0.29	2.72±0.20
	IV	2.66±0.42	2.90±0.37	2.79±0.26	3.20±0.33	3.20±0.33	2.97±0.49
	mmol/L P value	0.5745	0.4557	0.5745	0.2451	0.2473	0.5745
低密度脂 蛋白 LDL	I	0.61±0.22	0.34 ^b ±0.09	0.37±0.07	0.32±0.12	0.34±0.09	0.46±0.13
	II	0.55±0.09	0.43 ^{ab} ±0.15	0.38±0.09	0.37±0.09	0.41±0.13	0.45±0.12
	III	0.59±0.10	0.42 ^{ab} ±0.09	0.36±0.15	0.36±0.16	0.42±0.11	0.54±0.21
	IV	0.59±0.24	0.54 ^a ±0.17	0.36±0.13	0.38±0.08	0.44±0.14	0.42±0.09
	mmol/L P value	0.9301	0.0341	0.9669	0.7938	0.3521	0.3841
甘油三酯 TG	I	0.70±0.19	0.71±0.21	0.52±0.08	0.35±0.17	0.58±0.15	0.63±0.24
	II	0.60±0.13	0.86±0.85	0.51±0.10	0.26±0.05	0.49±0.08	0.51±0.11
	III	0.65±0.12	0.70±0.12	0.56±0.14	0.31±0.06	0.48±0.10	0.68±0.21
	IV	0.61±0.11	0.76±0.09	0.60±0.53	0.28±0.07	0.49±0.12	0.74±0.21
	mmol/L P value	0.2142	0.8863	0.9179	0.3142	0.3158	0.3158
总蛋白 TP	I	29.20±2.50	28.99±1.19	27.85±2.32	30.13±3.00	31.00±2.60	29.11±2.06 ^b
	II	29.29±1.85	29.32±1.10	29.73±5.56	28.93±3.28	30.40±1.51	28.81±2.59 ^b
	III	30.43±2.38	28.42±2.36	28.18±2.68	29.29±2.58	30.54±4.62	32.49±3.82 ^a
	IV	28.18±6.00	26.75±11.56	27.51±1.51	29.61±2.31	29.06±3.00	31.39±2.57 ^{ab}
	g/L P value	0.6674	0.8301	0.5771	0.8525	0.6441	0.0406
白蛋白 ALB	I	13.14±1.89	13.13±1.23	12.30±0.98	12.98±1.29	13.13±1.10	12.79±1.10 ^b
	II	13.46±1.22	13.02±1.16	12.17±0.82	12.51±1.43	12.89±0.85	12.75±0.98 ^b
	III	13.04±1.18	12.76±0.67	12.34±1.01	12.48±1.04	12.54±2.16	13.66±1.04 ^{ab}
	IV	13.09±1.74	14.12±1.42	12.18±0.97	13.25±1.04	12.83±1.81	13.98±0.61 ^a
	g/L P value	0.9418	0.1217	0.9773	0.5230	0.9028	0.0317
谷草转 氨酶 AST	I	240.13±39.61	225.96±45.41 ^b	231.08±26.89	235.50±46.12	251.50±19.59	287.57±38.93
	II	273.00±35.61	231.56±20.14 ^b	206.43±18.84	246.25±69.03	261.13±23.33	273.50±34.79
	III	267.38±52.73	222.40±22.21 ^b	230.46±46.40	236.88±25.87	248.75±57.61	264.13±37.44
	IV	279.25±63.27	275.09±45.07 ^a	225.75±26.99	232.87±25.13	264.25±54.14	258.00±38.44
	U/L P value	0.4125	0.0200	0.3721	0.9399	0.8625	0.4318
尿酸 UA	I	307.13±103.44	317.00±20.81 ^a	250.08±110.34 ^b	284.75±89.04 ^a	384.25±111.22	256.50±28.77 ^C
	II	350.50±028.39	248.41±74.12 ^b	388.29±94.06 ^a	289.88±106.02 ^a	378.00±102.16	294.75±57.87 ^{BC}
	III	371.75±41.12	272.63±115.43 ^{ab}	352.58±143.96 ^{ab}	172.50±64.70 ^b	271.00±72.83	326.75±65.69 ^{AB}
	IV	317.63±89.03	361.00±140.18 ^a	250.50±54.69 ^b	230.75±77.20 ^{ab}	324.38±103.68	361.38±67.59 ^A
	μmol/L P value	0.2808	0.0175	0.0258	0.0350	0.0982	0.0072
肌酐 CRE	I	39.88±5.50	38.70±3.66	37.38±2.86	41.98±4.46 ^{ab}	41.98±4.46	39.48±5.09
	II	37.70±4.31	38.52±4.11	37.66±7.51	45.63±1.77 ^a	45.63±1.77	38.78±4.20
	III	42.00±2.75	38.55±3.29	37.74±5.42	39.53±3.95 ^b	39.53±4.04	35.55±3.46
	IV	39.44±6.49	39.82±4.61	37.39±2.86	43.56±8.36 ^{ab}	43.56±8.35	38.00±5.70
	mg/L P value	0.4001	0.5829	0.9984	0.1448	0.1448	0.3803

注: 同列肩号无相同大写字母者, 差异极显著(P<0.01), 无相同小写字母者, 差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Values within a column with no common capital superscript letters differ very significantly (P<0.01); Values within a row with no common small superscript letters differ significantly (P<0.05).

表 3-4 可的松饮水对肉鸡营养素表观消化率的影响 (%)

Table 3-4 Effect of cortisone in drink water on apparent digestibility in broilers

指标 Item	组别 Treatment	排泄物收集时间, Days of excreta collection				
		1~2d	3~4d	5~6d	7~8d	9~10d
粗	I	69.68±2.27	68.98 ^A ±6.55	60.52±14.19	54.30±10.20	59.14±14.06
蛋	II	70.86±2.86	61.25 ^{AB} ±7.86	64.63±6.53	55.43±6.87	62.43±15.26
白	III	70.04±6.76	57.90 ^B ±3.72	60.82±4.42	54.09±12.75	60.30±7.91
CP	IV	70.11±3.47	53.43 ^B ±12.44	56.76±8.65	46.65±10.98	53.26±12.42
%	P value	0.1349	0.0064	0.417	0.3314	0.5248
粗	I	83.81±2.28	82.53 ^A ±1.03	86.83±5.18	85.32±8.72	84.42±4.20
脂	II	85.79±2.42	81.80 ^A ±4.82	90.66±4.27	89.79±4.75	84.37±4.99
肪	III	85.48±1.69	75.34 ^B ±4.08	89.99±5.04	85.59±10.57	82.71±7.21
EE	IV	84.94±2.59	73.49 ^B ±7.81	86.64±2.93	87.41±5.79	80.59±6.30
%	P value	0.3361	0.0018	0.1760	0.6474	0.5164
粗	I	56.85 ^a ±3.21	50.86 ^a ±13.77	45.01±4.56	34.61±12.11	51.20±13.51
灰	II	53.55 ^{ab} ±6.13	43.09 ^{ab} ±12.27	47.28±4.49	35.57±2.01	47.74±3.55
分	III	49.73 ^b ±10.52	39.50 ^b ±10.47	46.06±17.06	34.15±10.31	51.40±4.96
ASH	IV	47.26 ^b ±4.40	34.31 ^b ±1.44	37.87±9.38	36.62±9.37	44.11±9.84
%	P value	0.0385	0.0308	0.2751	0.0842	0.3300

A,B,C,a,b,c:同表 3-3, same as table 3-3.

由表 3-4 可以看出,可的松饮水在试验处理 1~2 和 3~4d 时显著降低了粗灰分的消化率。可的松饮水在代谢试验 1~2 和 3~4d 后,三处理组的粗灰分消化率均低于对照组,和对照组相比,第 II、III 和 IV 组粗灰分消化率在代谢试验 1~2 和 3~4d 后分别降低了 5.81%、12.52% 和 16.87%;以及 15.28%、22.34% 和 32.54%,第 III 和 IV 组的粗灰分消化率均显著低于对照组(P<0.05)。

试验第 3~4d 动物对日粮中 CP、EE 和粗灰分利用率的降低,与动物受到应激后,能量主要用于抵御应激带来的损伤,而用于消化的能量减少的原因。此后,动物对可的松饮水有了一定的适应能力后,营养素的消化利用率可能不受影响。

总之,可的松饮水对血液 HDL、LDL、CHOL、TG 的含量无显著影响(P>0.05),显著升高了 20 和 30mg/L 可的松饮水 10d 处理组的血浆 TP (P<0.05) 和尿酸 (P<0.01) 含量,显著升高了 IV 组 1d 血浆 AST 的活性,对肌酐含量无显著影响(P>0.05)。20 和 30mg/L 可的松饮水 3~4d 处理组的 CP、EE 表观代谢率显著降低,1~2 和 3~4d 粗灰分的表观代谢率显著降低 (P<0.05)。

3.2.2 可的松饮水对肉仔鸡肌肉发育及肉质的影响

3.2.2.1 可的松饮水对肉品质的影响

3.2.2.1.1 可的松饮水对滴水损失的影响

可的松饮水对肌肉滴水损失的影响明显(表 3-5)。处理 6d 后,与对照组相比,三个处理组胸肌滴水损失均明显升高,且 IV 组极显著高于对照组 (P<0.01);腿肌对照组滴水损失最小,极显著地低于第 III、IV 组 (P<0.01)。可的松饮水处理 10d 后,随剂量的增加,胸肌滴水损失逐渐增

加, 且第IV组的滴水损失极显著 ($P<0.01$) 高于对照组。随可的松剂量的增加, 而逐渐升高, 且第III、IV组显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-5 可的松饮水对肌肉滴水损失的影响

Table 3-5 Effect of drinking cortisone water on drop loss in broiler muscle

组别, Treatment		I	II	III	IV	P 值, P value
6d	胸肌 BM	2.93 ^B ±0.48	3.09 ^B ±0.76	3.55 ^B ±0.73	4.65 ^A ±0.58	0.0001
	腿肌 TM	1.78 ^C ±0.44	2.36 ^{BC} ±0.57	3.24 ^A ±0.58	2.76 ^{AB} ±0.80	0.0005
10d	胸肌 BM	1.46 ^B ±0.37	1.35 ^B ±0.45	1.52 ^B ±0.34	1.93 ^A ±0.42	0.0025
	腿肌 TM	1.33 ^b ±0.26	1.38 ^b ±0.48	1.86 ^a ±0.38	1.82 ^a ±0.37	0.0109

BM: Breast meat; LM: Thigh meat;

A,B,C,a,b,c:同行肩号无相同大写字母者, 差异极显著($P<0.01$), 无相同小写字母者, 差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Values within a row with no common capital superscript letters differ very significantly ($P<0.01$); Values within a row with no common small superscript letters differ significantly ($P<0.05$).

3.2.2.1.2 可的松饮水对肉品 pH 值的影响

可的松饮水显著增加了胸肌 pH₁ 值(表 3-6)。其中处理 1d 后, 第 I 组的 pH 值最低, 极显著低于其它三组 ($P<0.01$); 处理 2d 后, 对照组的 pH 值仍为最低, 显著地低于三个处理组 ($P<0.05$); 在试验处理的其它时间点, 处理组的 pH 值略有升高, 但变化不明显 ($P>0.05$)。可的松饮水对 pH₁ 值的影响不明显。在整个试验过程中, 对照组和处理组间差异不显著 ($P>0.05$), 表明在本试验中, 可的松饮水对 pH₁ 影响不明显。

表 3-6 可的松饮水对 pH 值的影响

Table 3-6 Effect of drinking cortisone water on pH value of broiler meat

项目 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
45 min pH ₁ 胸肌 Breast meat	I	6.65±0.17	6.23±0.18 ^B	6.26±0.30 ^b	6.60±0.21	6.00±0.13	5.98±0.08
	II	6.64±0.23	6.64±0.31 ^A	6.67±0.44 ^a	6.45±0.15	5.96±0.32	6.09±0.18
	III	6.64±0.09	6.63±0.27 ^A	6.67±0.26 ^a	6.64±0.23	6.00±0.17	6.01±0.13
	IV	6.62±0.19	6.60±0.20 ^A	6.68±0.30 ^a	6.63±0.14	6.01±0.11	6.10±0.10
	P 值,P value	0.2341	0.0055	0.0462	0.1642	0.9547	0.1857
45 min pH ₁ 腿肌 Thigh meat	I	6.64±0.31	6.65±0.24	6.91±0.09	6.83±0.08	6.16±0.13	6.17±0.56
	II	6.62±0.13	6.69±0.36	6.77±0.18	6.71±0.12	6.26±0.16	6.15±0.09
	III	6.63±0.24	6.49±0.22	6.72±0.12	6.80±0.20	6.23±0.34	6.06±0.07
	IV	6.64±0.34	6.50±0.21	6.87±0.25	6.75±0.08	6.41±0.37	6.21±0.11
	P 值,P value	0.1462	0.3223	0.1386	0.3491	0.3574	0.7848
24h pH ₂₄ 胸肌 Breast meat	I	6.19±0.13	6.21±0.34	6.21±0.42	6.06 ^b ±0.16	5.83±0.04	5.76±0.06
	II	6.20±0.12	6.23±0.21	5.97±0.15	6.28 ^a ±0.18	5.86±0.06	5.88±0.08
	III	6.22±0.09	6.10±0.23	6.15±0.29	6.04 ^b ±0.14	5.93±0.12	5.84±0.10
	IV	6.22±0.17	5.98±0.16	6.30±0.41	6.10 ^b ±0.09	5.85±0.14	5.87±0.18
	P 值,P value	0.1568	0.1024	0.2591	0.0116	0.1936	0.1701
24h pH ₂₄ 腿肌 Thigh meat	I	6.73±0.05	6.85±0.12	6.88 ^{AB} ±0.12	6.55±0.20	6.10±0.16	6.28±0.10
	II	6.76±0.21	6.88±0.21	6.81 ^{BC} ±0.23	6.74±0.12	6.32±0.12	6.24±0.20
	III	6.68±0.14	6.83±0.08	6.70 ^C ±0.07	6.54±0.21	6.24±0.13	6.23±0.26
	IV	6.69±0.09	6.88±0.11	6.96 ^A ±0.06	6.58±0.13	6.23±0.19	6.20±0.16
	P 值,P value	0.1478	0.3201	0.0068	0.0937	0.0506	0.8625

A,B,C,a,b,c:同表 3-3, same as table 3-3.

可的松饮水对胸肌 pH_{24} 的影响在应激前期呈下降的趋势, 应激中期变化波动较大, 应激后期呈上升的趋势。除处理 3d 后, 第 II 组的 pH_{24} 显著高于对照组 ($P<0.05$) 外, 其它试验时间未见显著差异。可的松饮水对腿肌 pH_{24} 有明显的升高趋势。试验处理 2d 后, 第 IV 组 pH 值最高, 但和对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 处理 3d 和 6d 后, 处理组 pH 较对照组有升高的趋势, 但未见显著差异 ($P>0.05$)。处理 10d 后, 处理组的 pH 值较对照组低, 但差异不显著 ($P>0.05$)。

肌肉 pH 值腿肌高于胸肌; pH_{24} 低于相应 pH_1 ; 随饮可的松水时间的延长, 肉品 pH 值有降低的趋势; 随着可的松浓度的升高, 肉品 pH 值有升高的趋势。

3.2.2.2 可的松饮水对肌肉组织的影响

3.2.2.2.1 可的松饮水对肌肉组织生长发育的影响

可的松饮水在应激的前期和中期对胸肌发育的影响不明显(表 3-7), 应激后期, 试验处理 10d 后, 胸肌相对重有下降的趋势 ($P=0.0597$), 表明可的松饮水有抑制肌肉组织生长发育的可能。在整个试验过程中, 可的松饮水对腿肌发育的影响不明显 ($P>0.05$)。

可的松饮水对胸肌含水率的影响不明显, 但有降低胸肌含水率的趋势(表 3-8)。在整个试验过程中, 胸肌含水率均无显著差异 ($P>0.05$)。可的松饮水对胸肌蛋白含量有降低的趋势。从试验过程的各个时间取样点来看, 三个处理组的 CP 含量均低于对照组, 表明可的松饮水有降低胸肌 CP 含量的可能。可的松饮水对胸肌脂肪含量有降低的趋势。试验处理 2d 后, 第 II 和 III 组中胸肌 EE 含量均极显著低于对照组 ($P<0.01$), 第 IV 组高于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$)。处理 6d 后, 三个处理组的 EE 含量均低于对照组, 且第 II、IV 组显著低于对照组 ($P<0.05$), 而第 III 组 EE 含量高于对照组。应激后期(处理 10d 后), 三处理组 EE 含量均低于对照组, 表明随应激时间的延长, 胸肌 EE 含量有降低的可能。

表 3-7 可的松饮水对胸肌和腿肌相对重量的影响

Table 3-7 Effect of drink cortisone water on relative weight in broilers

项目 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
胸肌相 对重 Relative breast weight	I	93.18±10.63	94.98±13.91	106.63±19.87	92.62±15.16	106.53±13.49	115.40±13.29
	II	90.84±11.47	91.72±12.49	92.08±14.71	97.71±20.71	100.42±12.39	101.99±11.26
	III	91.73±15.12	94.69±17.38	92.39±12.62	111.50±10.10	102.64±9.73	116.48±14.18
	IV	94.48±14.73	102.4±19.37	96.15±13.48	95.27±15.79	101.15±25.51	106.14±8.57
	P 值,P value	0.6124	0.5904	0.2225	0.1054	0.8818	0.0597
腿肌相 对重, Relative thigh weight	I	158.63±14.81	160.98±14.48	159.77±17.72	163.42±19.85	160.23±10.12	171.35±16.09
	II	152.01±18.13	150.71±20.20	156.80±9.39	183.23±15.75	164.62±10.30	165.58±20.60
	III	158.46±9.37	156.18±8.02	162.09±16.96	170.09±13.44	169.35±15.59	159.27±34.81
	IV	154.72±18.43	152.52±21.13	163.41±10.96	173.87±12.41	154.58±7.90	152.99±20.34
	P 值,P value	0.4621	0.6313	0.8027	0.1054	0.0826	0.4680

3.2.2.2.2 可的松饮水对肌肉营养组成的影响

可的松饮水对腿肌含水量有降低的趋势(表 3-9)。在整个试验过程中, 随可的松饮水时间的延长, 腿肌含水量呈下降趋势, 且在处理 6d 后, 第 III 组的含水量显著低于对照组 ($P<0.05$)。

可的松饮水明显降低了腿肌 CP 含量。在应激前期(试验处理 1d 和 2d 后), 腿肌 CP 含量呈波动变化, 无明显规律; 处理 3d 后, 腿肌 CP 含量降低比较明显, 第 II、III 和 IV 组分别比对照组

降低了 27.35%、72.68%和 98.18%，但差异不显著 ($P>0.05$)；处理 6d 后，与对照组相比，第 II、III 和 IV 组 CP 含量分别降低了 12.10%、3.6%和 2.65%，其中第 II 和 III 组极显著低于对照组 ($P<0.01$)，表明高剂量可的松饮水对腿肌蛋白含量有明显影响；应激后期（试验处理 10d 后），三处理组的蛋白含量均较对照组低，分别比对照组下降了 6.80%、7.28%和 4.33%，差异未达到统计显著，但降低趋势明显 ($P=0.0951$)。

表 3-8 可的松饮水对胸肌营养成分含量 (%) 的影响 (绝干基础)

Table 3-8 Effect of drink cortisone water on meat composition of breast meat in broilers (dry basis)

项目 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
水分 Moisture	I	93.62±6.32	93.68±5.26	93.03±7.61	89.73±4.66	81.87±3.31	78.32±3.21
	II	93.42±4.31	92.10±5.32	89.90±10.61	86.63±4.70	79.92±0.52	76.20±5.22
	III	92.04±2.76	91.69±6.21	90.49±10.70	87.66±2.79	80.42±0.67	77.32±6.32
	IV	91.87±6.51	89.26±4.35	86.11±12.07	87.00±4.21	80.83±1.03	76.38±5.68
	P 值,P value	0.1678	0.2014	0.6160	0.4605	0.1867	0.6051
蛋白质 CP	I	88.78±1.72	90.23±2.01	92.05±3.79	92.36±7.32	94.04±4.04	92.34±2.37
	II	89.02±1.07	91.32±1.55	88.95±5.27	84.37±7.72	91.64±1.00	91.24±1.56
	III	87.23±2.01	90.45±2.10	89.59±6.15	83.83±6.66	91.80±2.77	93.27±3.17
	IV	89.67±1.52	88.23±1.51	85.28±6.31	88.27±10.08	92.13±1.50	91.08±2.09
	P 值,P value	0.2314	0.1194	0.1245	0.1465	0.1083	0.3241
粗脂肪 EE	I	2.35±1.04	3.21±0.56	3.87 ^A ±0.70	6.25±2.12	2.86 ^a ±0.88	3.67±0.68
	II	2.10±0.89	3.02±1.08	2.43 ^B ±0.41	7.38±4.02	1.99 ^b ±0.50	3.19±0.89
	III	2.28±0.56	2.97±0.58	2.51 ^B ±0.24	6.32±1.47	2.97 ^a ±1.07	2.98±1.36
	IV	2.38±0.69	2.89±1.23	4.75 ^A ±2.48	8.49±4.40	1.97 ^b ±0.83	3.24±2.16
	P 值,P value	0.5013	0.5824	0.0031	0.5502	0.0337	0.1456

表 3-9 可的松饮水对腿肌营养成分的影响 (绝干基础)

Table 3-9 Effect of drink cortisone water on muscle composition of broilers (dry basis)

项目 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
水分 Moisture	I	88.12±2.01	86.68±2.35	85.03±3.66	79.99±2.47	78.27 ^a ±0.94	76.68±0.98
	II	87.17±1.69	86.86±3.04	86.07±3.727	82.54±4.43	74.45 ^{ab} ±4.08	73.58±2.14
	III	85.35±2.41	84.02±2.16	81.98±6.87	81.81±5.78	72.27 ^b ±6.08	75.21±3.21
	IV	86.36±1.39	85.03±3.01	84.62±5.25	84.06±2.46	77.45 ^a ±2.37	74.56±2.17
	P 值,P value	0.3847	0.4536	0.4307	0.2623	0.0161	0.1256
蛋白 CP	I	64.02±6.42	63.34±5.64	63.38±6.02	65.08±10.47	77.76 ^A ±4.08	79.68±3.64
	II	65.25±4.31	65.23±7.05	65.41±9.21	63.30±7.20	68.35 ^B ±7.08	74.26±6.34
	III	64.33±3.94	64.35±5.31	67.86±10.11	60.35±7.57	65.55 ^B ±9.84	73.88±7.03
	IV	65.63±7.36	63.26±5.39	68.05±10.39	58.69±5.96	75.70 ^A ±2.82	76.23±4.89
	P 值,P value	0.3824	0.6892	0.7011	0.3893	0.0021	0.0951
粗脂肪 EE	I	22.04±2.34	23.21±2.57	24.08 ^a ±2.10	25.61±6.35	23.00 ^a ±0.98	23.56±2.44
	II	23.01±3.42	24.06±2.67	24.07 ^a ±2.29	27.12±3.14	19.08 ^b ±0.52	22.21±1.68
	III	22.36±1.68	22.34±1.65	19.28 ^b ±3.35	27.40±4.93	23.11 ^a ±1.12	24.01±2.36
	IV	23.81±2.39	21.28±2.61	21.59 ^{ab} ±4.58	28.67±3.10	19.07 ^b ±0.87	23.09±1.67
	P 值,P value	0.4469	0.0933	0.0163	0.6193	0.0345	0.0842

A,B,C;a,b,c:同表 3-3, same as table 3-3.

可的松饮水对腿肌脂肪含量有降低的趋势。处理 1d 后, 处理剂量较大的第 III、IV 组脂肪含量明显降低, 分别比对照组降低了 3.75% 和 8.32%, 第 IV 组最低, 可的松饮水对腿肌脂肪含量降低趋势明显 ($P=0.0933$); 处理 2d 后, 第 III、IV 组脂肪含量降低更明显, 其中第 III 组显著低于对照组 ($P<0.05$); 应激中期 (处理 6d 后), 三处理组的脂肪含量分别比对照组高 5.90%、7.01% 和 28.67%, 但差异不显著 ($P>0.05$)。处理 6d 后, 第 II 和 IV 组脂肪含量显著低于对照组 ($P<0.05$); 处理 10d 后, 第 II 和 IV 组脂肪含量明显低于对照组, 但与对照组无显著差异, 表明可的松饮水有降低腿肌脂肪含量的趋势 ($P=0.0842$)。

总之, 可的松饮水极显著 ($P<0.01$) 增加了胸肌、腿肌 6d 和 10d 滴水损失; 显著增加了胸肌 pH_1 ($P<0.05$), 对腿肌无显著影响, 对 pH_{24} 胸肌除 3d 第 II 组显著增加外 ($P<0.05$), 均无显著差异 ($P>0.05$), 对腿肌 pH_{24} 有增加的趋势; 可的松饮水对胸肌、腿肌的相对重无显著影响 ($P>0.05$); 对胸肌含水量无显著影响 ($P>0.05$), 对胸肌蛋白有降低的趋势, 显著降低了 2 和 6d 胸肌脂肪含量 ($P<0.05$); 可的松饮水显著降低了腿肌 6d 第 III 组水分含量, 极显著降低了 6d 第 II、III 组蛋白的含量, 显著降低了 2d 第 III 组和 6d II 和 III 组脂肪含量。以上结果说明, 可的松饮水对肌肉组织发育影响不显著, 显著降低了肌肉的营养成分。

3.2.3 可的松饮水对肉仔鸡血液激素及过氧化状态的影响

3.2.3.1 可的松处理对血清皮质酮浓度的影响

可的松饮水对肉鸡血中皮质酮 (CORT) 浓度的影响如表 3-10 所示。各可的松处理组在处理第 3 和 6d 显著增加了鸡血中 CORT 浓度 ($P<0.05$), 随应激时间的延长, 机体开始适应应激反应, 体内 CORT 的合成和分泌不再增加, 处理第 10d 时, 处理组和对照组之间 CORT 浓度差异不显著 ($P>0.05$)。

表 3-10 可的松对肉鸡血清皮质酮 (mmol/L) 和血糖 (mmol/L) 浓度的影响

Table 3-10 Effect of drink cortisone water on corticosterone concentration in broiler serum

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
皮质酮 CORT Cortico-sterone	I	58.59±35.57	71.69±29.45	76.03±20.11	42.26 ^B ±10.53	49.22 ^b ±24.23	41.76±15.64
	II	48.06±30.48	55.65±13.99	92.28±58.45	43.19 ^B ±10.06	47.21 ^b ±15.02	49.19±17.72
	III	52.21±11.68	69.15±54.94	51.57±12.52	57.72 ^{AB} ±10.83	59.42 ^{ab} ±9.961	46.19±11.69
	IV	45.57±21.22	54.03±17.85	89.83±38.53	74.58 ^A ±30.93	79.32 ^a ±25.07	58.95±25.55
	P value	0.7780	0.6210	0.1309	0.0034	0.0109	0.3068
血糖 GLU Glucose	I	16.07±2.18	17.60±1.11	16.99 ^b ±0.82	14.99±1.23	17.97±1.23	18.69±1.16
	II	16.21±0.90	17.52±1.64	16.46 ^b ±0.79	14.86±1.03	18.44±1.46	17.26±0.85
	III	15.79±1.56	17.94±1.18	17.99 ^a ±1.21	15.49±0.97	16.73±1.48	17.52±1.54
	IV	15.24±1.42	18.56±1.14	17.11 ^{ab} ±0.75	14.95±1.04	17.98±1.17	18.09±0.89
	P value	0.625	0.054	0.024	0.643	0.216	0.086

A,B,C ;a,b,c:同表 3-3, Same as table 3-3.

3.2.3.2 可的松对血糖浓度的影响

试验处理后, 各处理组中血糖浓度 (由表 3-10) 的变化规律是: 处理的第 1d, 处理组和对

照组的血糖浓度没有显著差异 ($P>0.05$), 但与对照组相比, 处理III和IV组有增加 GLU 浓度的趋势 ($P=0.054$); 处理第 2d 的, 处理III组显著 ($P<0.05$) 增加了血糖浓度; 处理后第 3、6、10d, 各组血糖浓度均没有显著差异 ($P>0.05$)。

3.2.3.3 可的松对血清甲状腺激素浓度的影响

甲状腺激素是调节机体代谢和生长发育的重要激素之一, 它包括三碘甲腺原氨酸 (T_3) 和甲状腺素 (T_4) 两种。其主要功能是促进蛋白质的合成, 提高动物采食量。可的松饮水对肉仔鸡血液甲状腺激素的影响见表 3-11。三处理组在整个试验中, 血清 T_3 、 T_4 均呈现上升趋势, 但和同期对照相比, 均无明显差异 ($P>0.05$), 处理后第 1 和 2d 血清 T_3 含量较高, 可能与应激处理本身的影响有关, 第 3d 降到了最低。而后逐渐回升, 第IV恢复到了期初水平, 其它处理组均未回升到期初水平; T_4 含量和同期对照组相比较, 有增加的趋势, 到处理后第 3 和 6d 时, 血清中 T_4 含量显著高于对照组 ($P<0.05$), 处理第 10d 时, 处理组 T_4 浓度恢复到对照水平 ($P>0.05$); 血液中 T_3/T_4 含量均有下降的趋势, 并在试验处理后第 3d 时降到最低, 显著低于同期对照组 ($P<0.05$)。

表 3-11 可的松对肉鸡血清甲状腺激素浓度的影响

Table 3-11 Effect of drink cortisone water on thyroxin concentration in broiler serum

处理 Treat	组别 Treatment	I	II	III	IV	P 值, P value
0 days	T_3 (ng/ml)	1.713±0.289	1.845±0.1009	1.962±1.250	1.984±0.473	0.3381
	T_4 (ng/ml)	35.57±15.75	37.28±0.918	42.08±1.958	39.38±4.093	0.4362
	T_3/T_4	0.061±0.035	0.050±0.004	0.047±0.008	0.051±0.012	0.4582
1 days	T_3 (ng/ml)	2.054 ^a ±0.167	2.060 ^a ±0.144	1.891 ^a ±0.314	1.602 ^b ±0.299	0.0022
	T_4 (ng/ml)	31.08±11.39	32.91±10.33	27.68±11.83	40.87±14.27	0.1844
	T_3/T_4	0.074 ^a ±0.029	0.068 ^a ±0.021	0.077 ^a ±0.028	0.048 ^a ±0.033	0.1894
2 days	T_3 (ng/ml)	1.751 ^A ±0.325	1.960 ^A ±0.253	1.865 ^A ±0.374	1.258 ^B ±0.303	0.0006
	T_4 (ng/ml)	37.00±15.44	24.62±4.615	30.11±5.123	27.81±11.67	0.1242
	T_3/T_4	0.063±0.050	0.083±0.025	0.065±0.025	0.055±0.038	0.4836
3 days	T_3 (ng/ml)	1.365±0.173	1.207±0.260	1.201±0.3701	1.254±0.379	0.6938
	T_4 (ng/ml)	29.61 ^C ±9.447	40.82 ^B ±10.48	49.36 ^A ±1.739	42.55 ^{AB} ±6.114	0.0003
	T_3/T_4	0.051 ^A ±0.019	0.031 ^B ±0.009	0.024 ^B ±0.007	0.030 ^B ±0.010	0.0008
6 days	T_3 (ng/ml)	1.501±0.457	1.542±0.333	1.742±0.331	1.745±0.516	0.5202
	T_4 (ng/ml)	33.77 ^b ±12.21	47.52 ^a ±7.291	45.17 ^a ±9.722	40.23 ^{ab} ±11.16	0.0576
	T_3/T_4	0.048±0.016	0.033±0.006	0.041±0.012	0.046±0.017	0.1278
10 days	T_3 (ng/ml)	1.459±0.381	1.614±0.379	1.679±0.494	1.940±0.354	0.1487
	T_4 (ng/ml)	41.16±10.34	41.88±3.999	38.42±11.13	40.32±8.693	0.8803
	T_3/T_4	0.038±0.017	0.039±0.012	0.050±0.029	0.050±0.015	0.4656

A,B,C;a,b,c:同表 3-5, Same as table 3-5.

3.2.3.4 可的松对血浆中抗氧化酶浓度的影响

机体发生氧化应激时, 机体内的自由基生成增多, 为了消除过多的自由基, 体内消除自由基的抗氧化酶类合成量会增加, 通过体内抗氧化酶的变化可以间接反映体内氧化应激的发生过程。根据衰老的自由基学说, 机体内脂质过氧化作用不断加剧, 过氧化的终产物 MDA 等物质的含量不断增加, 而相应的自由基的清除剂 SOD 和 GSH-Px 等酶的活性逐渐下降, 进而导致细胞生理

功能的减退, 使生长机能下降。

3.2.3.4.1 对血浆总抗氧化能力(T-AOC)浓度的影响

试验处理第 1d, 各可的松处理组的 T-AOC 有下降的趋势 (表 3-12), 其中第 IV 组的 T-AOC 最低, 对照组的最高, 但无显著差异 ($P>0.05$); 试验处理后 2d, 第 IV 组的 T-AOC 显著低于其他 3 组 ($P<0.05$); 试验处理 3 和 6d 后, 第 III 组的 T-AOC 下降, 第 IV 组 T-AOC 逐渐恢复, 且处理 3 和 6d, 第 III 组的 T-AOC 下降为最低, 但与对照组间无显著差异 ($P>0.05$); 处理 10d 后, 第 III 组的 T-AOC 逐渐恢复, 试验处理组和对照组之间无显著差异 ($P>0.05$)。处理后各试验组的 T-AOC 有降低的趋势, III 和 IV 组差异不显著。处理两天后血液 T-AOC 有了反应, 而后由于动物对激素的适应, 而没有了影响。

表 3-12 可的松对血液抗氧化酶活性的影响

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
总抗氧化能力 T-AOC U/ml	I	19.36±4.76	19.56±3.46	21.14 ^a ±4.47	16.76±3.93	18.59±4.56	19.99±5.08
	II	18.34±5.84	19.01±4.10	19.23 ^a ±3.74	17.26±5.10	18.39±1.98	18.85±5.95
	III	18.64±1.57	18.76±2.13	18.32 ^{ab} ±1.77	14.62±3.07	15.86±3.53	18.85±3.66
	IV	18.06±1.93	16.58±1.35	15.63 ^b ±2.21	16.74±3.78	17.45±4.66	20.45±2.32
	P value	0.9220	0.0708	0.0168	0.2938	0.4834	0.8507
超氧化物歧化酶 SOD U/ml	I	94.79±13.81	119.89 ^A ±5.13	107.92±13.48	102.04 ^a ±9.67	71.65±21.09	72.90±30.96
	II	95.01±11.24	123.71 ^A ±9.66	121.13±21.24	85.57 ^b ±14.02	64.09±28.42	80.20±24.23
	III	96.82±6.93	83.54 ^B ±18.72	121.33±14.66	89.23 ^b ±9.25	74.97±16.45	84.23±26.15
	IV	98.97±10.41	88.00 ^B ±17.15	118.02±15.97	96.39 ^{ab} ±12.00	67.03±33.67	96.81±35.22
	P value	0.8573	0.0003	0.3464	0.0337	0.8392	0.4417
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px U/ml	I	688.41±39.39	804.45 ^a ±42.89	748.48 ^a ±57.56	707.09 ^a ±36.31	707.18±52.84	666.83 ^B ±54.65
	II	678.83±36.58	759.86 ^{ab} ±95.32	748.77 ^a ±58.76	684.93 ^a ±84.78	752.11±90.07	727.14 ^A ±66.05
	III	672.89±43.30	707.56 ^b ±85.83	712.04 ^{ab} ±41.53	617.87 ^b ±43.28	763.72±28.97	648.44 ^B ±60.18
	IV	673.86±41.30	701.22 ^b ±47.89	683.88 ^b ±39.19	655.46 ^{ab} ±62.30	733.24±18.09	630.38 ^B ±28.46
	P value	0.8542	0.0240	0.0403	0.0333	0.2080	0.0081
丙二醛 MDA U/ml	I	94.79±13.81	119.89 ^A ±5.13	107.92±13.48	102.04 ^a ±9.67	71.65±21.09	72.90±30.96
	II	95.01±11.24	123.71 ^A ±9.66	121.13±21.24	85.57 ^b ±14.02	64.09±28.42	80.20±24.23
	III	96.82±6.93	83.54 ^B ±18.72	121.33±14.66	89.23 ^b ±9.25	74.97±16.45	84.23±26.15
	IV	98.97±10.41	88.00 ^B ±17.15	118.02±15.97	96.39 ^{ab} ±12.00	67.03±33.67	96.81±35.22
	P value	0.8573	0.0003	0.3464	0.0337	0.8392	0.4417
肌酸激酶 CK U/ml	I	1.03±0.16	1.23±0.68	1.90±1.16	1.65±0.24	1.59 ^c ±0.86	1.13 ^B ±0.32
	II	1.14±0.31	1.17±0.64	2.00±1.52	1.57±0.32	1.54 ^c ±0.75	1.76 ^A ±0.66
	III	1.56±0.68	1.36±0.57	1.83±0.77	1.91±0.62	5.03 ^b ±1.50	1.04 ^B ±0.68
	IV	1.53±0.69	1.43±0.72	1.86±0.46	1.89±0.40	9.34 ^a ±3.03	0.97 ^B ±0.20
	P value	0.1058	0.1428	0.1577	0.3044	0.0039	0.0046

a,b,A,B:同表 3-3,same as table 3-3.

3.2.3.4.2 对血浆超氧化物歧化酶(SOD)浓度的影响

试验 1d 后, 处理Ⅲ和Ⅳ组的 SOD 的活性极显著的低于 ($P<0.01$) 处理 I 和 II 组, II 组的 SOD 最高 (表 3-12); 试验处理 2d 后, 三个可的松饮水组 SOD 的浓度均高于对照组, 但无显著性差异 ($P>0.05$); 处理第 3d 后, II、Ⅲ组的 SOD 的浓度显著低于 ($P<0.05$) 对照组, 第Ⅳ组低于对照组 ($P>0.05$); 试验处理 6d 后, 除了第Ⅲ组 SOD 的浓度高于对照组外, 处理 II 和Ⅲ组的 SOD 的浓度仍然低于对照组, 但各组间无显著差异 ($P>0.05$); 试验处理 10d 后, 三处理组的 SOD 的浓度均高于对照组, 差异不显著 ($P<0.05$)。

3.2.3.4.3 对血浆谷胱甘肽过氧化物还原酶 (GSH-Px) 活性的影响

试验处理 1d 后, 3 个可的松饮水处理组 GSH-Px 均呈下降趋势 (表 3-12), 其中第Ⅲ和Ⅳ组 GSH-Px 显著低于对照组 ($P<0.05$), 第 II 组 GSH-Px 明显低于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$); 试验处理 2d 后, 第Ⅳ组的 GSH-Px 显著低于对照组 ($P<0.05$), 但 II 组和对照组最高, 两者差异不显著 ($P>0.05$); 处理 3d 后, 第Ⅲ组 GSH-Px 浓度最低, 显著低于对照组和第 II 组 ($P<0.05$), 低于第Ⅲ组, 但差异不显著 ($P>0.05$); 处理 6d 后, 各组之间的 GSH-Px 浓度无显著差异 ($P>0.05$); 处理 10d 后, 第 II 组的 GSH-Px 浓度最高, 极显著高于对照组和第Ⅲ、Ⅳ组 ($P<0.01$)。

3.2.3.4.4 对血浆丙二醛浓度的影响

氧化应激产生的自由基过剩, 就会攻击生物膜上的 PUFA, 引发脂质过氧化, 其终产物 MDA 等能引起膜脂、膜蛋白交联, 使膜蛋白构象发生改变, 影响膜蛋白活性, 进而影响细胞的各种功能。各组血浆 MDA 浓度的变化见表 3-12。试验处理 1d 后, 第Ⅲ和Ⅳ组血浆 MDA 的浓度极显著低于对照组 ($P<0.01$); 试验处理 2d 后, 处理 II、Ⅲ和Ⅳ组血浆 MDA 浓度均高于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$); 试验 3d 后, 3 可的松处理组均低于对照组, 其中第 II、Ⅲ组血浆 MDA 浓度显著低于对照组 ($P<0.05$); 处理 6d 和 10d 后, 4 组之间差异不显著 ($P<0.05$)。

3.2.3.4.5 可的松对血浆肌酸激酶活力的影响

试验处理前 3d, 各试验处理组血浆 CK 活力水平无明显的变化趋势 (表 3-12); 处理 3d 后, 第Ⅲ、Ⅳ组血浆 CK 活力水平有上升的趋势, 但和对照组相比无显著差异 ($P>0.05$); 处理 6 天后, 第Ⅲ、Ⅳ组血浆 CK 活力迅速升高, 均极显著 ($P<0.01$) 高于对照组, 且第Ⅳ组极显著高于第Ⅲ组 ($P<0.01$); 处理 10d 后, 第Ⅲ和Ⅳ组血浆 CK 活力下降到正常水平, 与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 而第 II 组的快速上升为最高, 且极显著地高于对照组和第Ⅲ和Ⅳ组 ($P<0.01$)。

总之, 第Ⅳ皮质酮含量在试验处理 3d 左右显著高于对照组; 血糖浓度在处理 1~2d 明显升高, 处理 2d 显著 ($P<0.05$) 高于对照组; T_3 先降低后升高, 第 1~2d 均极显著高于 ($P<0.01$) 对照组, T_4 第 3d 极显著 ($P<0.01$) 高于对照组; 对应激氧化状态的影响为, MDA 在 1~3d、6d 时均显著 ($P<0.05$) 高于对照组, SOD 第 1、3d 活性降低, GSH-PX 活性处理后第 1~3d 均显著 ($P<0.05$) 低于对照组, 总抗氧化能力第 2d 显著降低 ($P<0.05$), CK 在第 6d 时显著升高 ($P<0.05$)。以上结果表明, 第Ⅳ组可的松饮水成功地在肉鸡体内诱发了慢性氧化应激。

3.2.4 可的松饮水对组织过氧化状态和免疫器官生长发育的影响

3.2.4.1 可的松饮水对组织器官生长发育和免疫指数的影响

3.2.4.1.1 可的松饮水对组织器官生长发育的影响

可的松饮水初期 (0~2d) 各处理组心脏相对重高于对照组 (表 3-13), 但无显著差异 ($P > 0.05$); 应激处理 6d 后, 第III、IV组心脏相对重量较对照组降低, 差异不显著 ($P > 0.05$); 应激处理 10d 后, 第III、IV组心脏相对重量仍较对照组低。从整个试验过程的变化来看, 第III、IV组心脏的相对重由应激处理初期高于对照组, 逐渐变化为试验处理后后期时低于对照组, 处理剂量较高的III、IV组心脏相对重量呈下降的趋势。可的松饮水对肝脏相对重量的影响较小, 各处理 (剂量和作用时间) 之间无显著差异 ($P > 0.05$)。本试验条件下, 可的松饮水未见影响肝脏相对重。

表 3-13 可的松饮水对组织器官相对重量的影响 (g/kg)

Table 3-13 Effect of drink cortisone water on relative weights of heart and liver

组织 Tissue	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
心 脏 Heart	I	6.21±0.83	6.11±0.70	5.27±0.62	5.73±0.97	4.96±1.12	4.32±0.26
	II	6.24±0.78	6.14±0.68	5.58±0.51	6.37±0.54	5.02±4.24	4.57±1.24
	III	6.32±1.14	6.29±1.17	5.66±1.17	5.76±0.73	4.82±0.69	4.30±0.83
	IV	6.35±1.41	6.27±1.36	5.88±0.76	6.26±1.01	4.81±0.44	3.93±0.29
	P value	0.86412	0.9788	0.6114	0.3085	0.9206	0.4340
肝 脏 Liver	I	66.28±9.35	64.18±8.45	31.31±3.72	26.56±2.93	28.84±4.03	31.45±6.55
	II	64.04±11.24	63.50±11.54	33.84±7.01	25.27±2.77	27.93±3.39	30.79±5.66
	III	65.16±6.38	65.63±6.08	34.32±3.98	27.12±4.56	29.66±5.97	29.11±4.23
	IV	66.46±11.75	66.82±14.91	30.80±2.12	26.39±2.35	28.29±3.22	32.20±5.56
	P value	0.5678	0.9277	0.3278	0.7182	0.8621	0.7196

表 3-14 可的松饮水对免疫器官生长发育和腹脂率的影响

Table 3-14 Effect drink cortisone water on relative weight of immune organs and abdomen fat in broilers

器官 Organ	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
法氏囊, Bursa of Fabricius	I	1.92±0.24	2.37±0.75	2.13±0.31	2.29±0.79	1.95±0.53	1.84±0.89
	II	1.99±0.22	1.90±0.48	2.54±0.55	2.00±0.48	2.08±0.49	2.45±0.22
	III	2.02±0.46	2.19±0.29	2.40±0.29	2.07±0.69	2.23±0.53	1.64±0.67
	IV	1.99±0.24	1.96±0.45	2.24±0.43	1.98±0.90	1.93±0.61	1.87±0.63
	P value	0.6179	0.7623	0.2193	0.8317	0.5622	0.0946
胸 腺 Thymus	I	0.33±0.13	0.75±0.40	0.33±0.06	0.44±0.11	0.39±0.13	0.49±0.22
	II	0.35±0.26	0.75±0.39	0.44±0.10	0.41±0.08	0.44±0.11	0.40±0.18
	III	0.37±0.25	0.69±0.47	0.33±0.08	0.34±0.09	0.41±0.12	0.32±0.11
	IV	0.33±0.25	0.75±0.49	0.41±0.19	0.53±0.51	0.42±0.10	0.33±0.13
	P value	0.5939	0.9782	0.2099	0.4362	0.7139	0.1690
脾 脏 Spleen	I	0.99±0.13	0.99±0.17	1.25 ^a ±0.22	1.03±0.21	1.18±0.33	1.24±0.33
	II	0.98±0.46	1.02±0.28	0.95 ^b ±0.14	0.99±0.13	1.07±0.27	1.37±0.21
	III	0.98±0.46	0.98±0.34	1.05 ^b ±0.10	1.26±0.49	1.15±0.28	1.15±0.33
	IV	1.00±0.12	1.15±0.31	1.04 ^b ±0.26	1.17±0.33	1.00±0.27	1.33±0.47
	P value	0.7177	0.6179	0.0148	0.3078	0.7177	0.5939
腹脂率 Abdomen fat	I	0.92±0.21	1.06±0.32	1.12±0.27	1.34±0.29	1.33±0.25	1.35±0.25
	II	0.98±0.42	0.98±0.36	1.04±0.42	1.52±0.46	1.37±0.26	1.53±0.24
	III	1.01±0.31	1.09±0.31	1.21±0.48	1.10±0.23	1.24±0.33	1.37±0.35
	IV	0.90±0.21	1.18±0.28	1.11±0.19	1.20±0.36	1.45±0.31	1.49±0.32
	P value	0.6021	0.6547	0.8154	0.1108	0.5659	0.5436

a,b,A,B:同表 3-6, Same as table 3-6.

3.2.4.1.2 可的松饮水对免疫器官相对重的影响

可的松饮水对免疫器官相对重的影响如表 3-14 所示。试验过程中,可的松饮水对法氏囊相对重量变化影响无明显趋势。

在应激处理 10d 之前,可的松饮水对胸腺相对重均无显著差异 ($P>0.05$)。应激处理 10d 后,可的松饮水组的胸腺相对重均明显低于对照组,分别比对照组降低了 18.37%、34.69%、32.65%,该结果表明,可的松饮水对胸腺相对重影响较晚。由以上的分析提示我们,可的松饮水有降低胸腺相对重量指数的可能。

在应激处理 2d 后,处理组脾脏相对重量显著低于对照组 ($P<0.05$),而在应激处理的其它时间未见明显差异 ($P>0.05$)。该结果表明,可的松饮水对脾脏指数的影响时间较胸腺早。

可的松饮水对肉鸡腹脂沉积的影响如表 3-14 所示。试验过程中,对照组和处理组的腹脂率均无显著性差异 ($P>0.05$),表明在本试验中,可的松处理对肉鸡腹脂率未见明显影响。

3.2.4.2 可的松饮水对肝脏成分的影响

可的松饮水对肝脏成分的影响如表 3-15 所示,试验过程中,对照组和处理组之间肝脏水分含量均无显著性差异 ($P>0.05$),表明在本试验中,可的松饮水对肉鸡肝脏含水率未见明显影响。

表 3-15 可的松饮水对肝脏水分和脂肪含量的影响

Table 3-15 Effect of drink cortisone water on moisture and lipid in liver of broilers

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
水分 Moisture	I	74.52±1.76	73.32±1.71	76.25±1.21	76.62±1.74	73.82±2.58	76.11±2.57
	II	75.32±3.02	74.99±2.20	75.88±2.49	76.17±0.69	74.38±1.81	77.36±1.97
	III	74.52±1.85	73.95±2.16	76.88±2.18	76.02±1.14	74.38±3.42	74.95±2.39
	IV	73.86±2.01	75.57±2.98	76.87±1.71	76.40±0.51	74.23±2.73	74.38±3.46
	P value	0.2456	0.2262	0.6782	0.8048	0.9720	0.1395
脂肪 Lipid	I	16.60±4.45	15.22±3.02	16.35±3.59	12.82±1.53	17.91±2.38	15.32 ^C ±2.82
	II	15.86±2.65	15.62±3.17	17.12±1.73	12.47±1.10	17.92±1.92	15.98 ^{BC} ±3.73
	III	16.49±4.69	16.49±4.69	19.30±2.10	12.26±2.13	19.88±2.99	18.64 ^{AB} ±2.32
	IV	16.74±2.42	16.74±2.42	16.35±3.59	12.07±1.08	20.49±2.19	20.78 ^A ±3.50
	P value	0.2292	0.2654	0.1110	0.7762	0.0842	0.0059

3.2.4.3 可的松饮水对组织器官过氧化状态的影响

3.2.4.3.1 可的松饮水对心脏过氧化状态的影响

可的松饮水处理后,心脏 MDA 的含量有明显的变化(表 3-16)。试验处理 2d 后,III、IV 的 MDA 含量明显升高,其中 IV 的 MDA 含量显著的高于对照组(I 组)。处理 3d 后,III、IV 的 MDA 含量升高更明显,且均显著高于对照组($P=0.0149$)。处理 6d 后,心脏中的 MDA 含量显著降低,三处理组均极显著($P<0.01$)低于对照组,以第 III 的含量最低,不足对照组 MDA 含量的一半,II 和 IV 组分别低于对照组 31.94%和 44.44%。处理 10d 后,II 和 III 心脏 MDA 含量显著($P<0.05$)低于对照组,IV 组和 I 组差异不显著。

可的松饮水对心脏 GSH-Px 活性的影响较小。仅处理 IV 组在试验处理 2d 时极显著($P<0.01$)高于对照组。随着处理时间的延长,处理剂量的增加,心脏中的 GSH-Px 有下降的趋势。以处理

IV组的降低程度最大。

可的松饮水对心脏 SOD 活性的影响较小。处理III、IV组在试验处理 2d 时心脏 SOD 活性明显降低，其中第III组 SOD 活性极显著低于对照组。处理 6、10d 时，三个处理组的 SOD 活性均低于对照组，但未有统计差异 ($P>0.05$)。

表 3-16 可的松饮水对心脏过氧化状态的影响

Table 3-16 Effect of drink cortisone water on preoxidation status in heart of broilers

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
丙二醛 MDA U/mg 蛋白	I	0.68±0.31	0.78±0.43	0.65 ^b ±0.38	0.25 ^b ±0.11	0.72 ^A ±0.48	0.73 ^a ±0.24
	II	0.70±0.34	0.76±0.22	0.65 ^b ±0.28	0.24 ^b ±0.14	0.49 ^B ±0.24	0.54 ^{ab} ±0.15
	III	0.66±0.22	0.75±0.52	0.74 ^b ±0.22	0.46 ^a ±0.25	0.35 ^C ±0.14	0.41 ^b ±0.17
	IV	0.71±0.19	0.73±0.42	0.96 ^a ±0.87	0.52 ^a ±0.25	0.40 ^{BC} ±0.44	0.68 ^a ±0.20
	P value	0.1035	0.1822	0.0157	0.0149	0.0001	0.0114
超氧化物 歧化酶 SOD U/mg 蛋白	I	113.56±32.14	210.00 ^A ±24.93	131.54±50.39	89.72±23.04	207.14±72.76	106.98±46.56
	II	123.04±53.14	227.22 ^A ±52.51	120.86±34.40	108.96±34.39	201.84±53.01	94.18±42.97
	III	112.42±34.12	159.82 ^B ±6.61	128.76±40.94	118.92±63.43	168.58±34.55	74.30±35.56
	IV	120.45±34.24	190.77 ^{AB} ±36.38	122.83±41.05	96.13±49.48	180.44±39.01	106.59±33.27
	P value	0.5621	0.0088	0.9520	0.5794	0.4210	0.3355
谷胱甘肽 过氧化物 酶 GSH-Px U/mg 蛋白	I	4.32±0.31	4.81 ^B ±0.49	5.01±0.94	5.29±0.54	6.07±0.38	4.34±2.20
	II	4.86±0.36	4.77 ^B ±0.26	4.68±0.82	5.26±0.39	5.73±0.37	3.94±1.04
	III	4.61±0.54	4.99 ^B ±0.48	3.86±1.40	5.47±0.54	6.00±0.54	3.81±0.93
	IV	4.80±0.21	5.94 ^A ±0.89	3.87±0.50	5.02±0.71	5.06±0.36	3.99±0.79
	P value	0.8921	0.0010	0.0538	0.4628	0.0987	0.8805

A,B,C,a,b,c, 同表 3-3, same as table 3-3.

3.2.4.3.2 可的松饮水对肝脏过氧化状态的影响

心脏 MDA 含量变化明显 (表 3-16)。试验处理 2d 时，三个处理组 MDA 含量均极显著高于对照组 ($P<0.01$)，且 MDA 含量增加的顺序和试验处理中可的松剂量的增加顺序一致；处理 3d 时，三个处理组的 MDA 含量分别高于对照组 1.11%、28.57%、48.35%，其中第IV组显著高于对照组 ($P<0.05$)；处理 6d 时，处理 I、II 组的 MDA 含量仍低于对照组，第IV组高于对照组，但差异不显著 ($P>0.05$)；处理 10d 时，处理剂量较低的第 II、III MDA 含量高于对照组，处理 IV 组低于对照组。

可的松饮水对肝脏 GSH-PX 活性有明显影响。除第 6d 外，其余处理时间对照组的 GSH-PX 活性均极显著 ($P<0.01$) 高于其它三个组。处理 6d 时，第III组 GSH-PX 活性最高，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

可的松饮水对肝脏 SOD 活性影响明显。处理第 1d 时，三个处理组的 SOD 活性明显下降，第III、IV组 SOD 活性极显著 ($P<0.01$) 低于对照组；第 2d 时，II、IV组 SOD 活性明显低于对照组，差异极显著 ($P<0.01$)，第IV组 SOD 活性高于对照组，但差异不显著 ($P>0.05$)；处理 3 天时，三个处理组的 SOD 活性均明显低于对照组，第 II 组和处理组无显著性差异 ($P>0.05$)，第 III、IV 组 SOD 活性显著 ($P<0.05$) 低于对照组；处理 6 天时，和其它时间的结果相反，处理组

SOD 活性均高于对照组, 第 II 组和处理组无显著性差异 ($P>0.05$), 第 III、IV 组 SOD 活性显著 ($P<0.05$) 高于对照组; 处理 10 天时, 对照组的 SOD 活性极显著 ($P<0.01$) 高于三个处理组。

表 3-17 可的松饮水对肝脏过氧化状态的影响

Table 3-17 Effect of drink cortisone water on preoxidation status in broiler liver

指标 Item	组别 Treatment	饮水处理天数, Days of drink cortisone water					
		0d	1d	2d	3d	6d	10d
丙二醛 MDA U/mg 蛋白	I	0.29±0.17	0.11±0.06	0.16 ^C ±0.08	0.91 ^b ±0.35	0.13±0.06	0.70 ^b ±0.25
	II	0.15±0.09	0.14±0.05	0.40 ^B ±0.16	0.92 ^b ±0.08	0.11±0.04	1.27 ^a ±0.74
	III	0.21±0.16	0.14±0.07	0.46 ^B ±0.35	1.17 ^{ab} ±0.51	0.12±0.06	0.85 ^{ab} ±0.23
	IV	0.16±0.07	0.19±0.08	0.75 ^A ±0.22	1.35 ^a ±0.12	0.17±0.09	0.56 ^b ±0.23
	P value	0.1023	0.1494	0.0002	0.0269	0.3006	0.0132
超氧化物 歧化酶 SOD U/mg 蛋白	I	45.93±3.20	97.85 ^A ±36.45	275.45 ^A ±73.33	185.70 ^a ±42.35	71.88 ^B ±12.92	617.13 ^A ±90.19
	II	52.55±6.79	82.76 ^A ±33.11	152.94 ^B ±30.67	159.41 ^{ab} ±22.55	78.52 ^B ±15.09	484.19 ^B ±208.73
	III	51.53±8.25	54.09 ^B ±21.89	290.35 ^A ±37.34	140.21 ^b ±26.75	101.48 ^A ±24.57	403.10 ^B ±77.08
	IV	47.80±3.49	49.17 ^B ±3.94	169.11 ^B ±34.95	138.38 ^b ±33.93	110.34 ^A ±19.70	354.80 ^B ±82.87
	P value	0.1031	0.0029	0.0001	0.0228	0.0007	0.0017
谷胱甘肽 过氧化物 酶 GSH-Px U/mg 蛋白	I	3.67±0.46	2.76 ^A ±0.42	12.38 ^A ±2.55	20.48 ^A ±3.34	3.88 ^{bc} ±1.48	11.18 ^A ±2.43
	II	3.77±0.52	2.19 ^B ±0.53	4.66 ^B ±0.85	11.62 ^B ±1.91	3.66 ^c ±0.68	7.97 ^B ±1.93
	III	3.71±0.39	2.11 ^B ±0.29	5.39 ^B ±1.22	10.49 ^B ±1.36	5.01 ^a ±0.91	5.60 ^{BC} ±2.16
	IV	3.26±0.47	1.99 ^B ±0.41	5.18 ^B ±1.06	9.47 ^B ±1.91	4.80 ^{ab} ±0.61	6.27 ^C ±1.70
	P value	0.2314	0.0053	0.0001	0.0001	0.0232	0.0001

A,B,C,a,b,c, 同表 3-3, Same as table 3-3.

总之, 在整个试验期内, 可的松饮水对心脏和肝脏的相对重均无明显差异 ($P>0.05$); 对免疫器官胸腺、法氏囊的相对重均无显著差异 ($P>0.05$), 而对脾脏相对重的影响, 除第 2d 显著差异外 ($P<0.05$), 均无显著影响 ($P>0.05$); 对腹脂沉积无显著影响 ($P<0.05$); 对肝脏含水量无显著影响 ($P>0.05$), 但对肝脏脂肪含量在试验处理 10d 左右极显著增加 ($P<0.01$); 可的松饮水显著增加了试验处理 2-3d 心脏 MDA 的含量, 显著降低第 10d MDA 含量 ($P<0.05$), 极显著增加了 ($P<0.01$) 处理第 1d 后 GSH-Px 的含量, 极显著降低了处理 1d 后 SOD 的含量 ($P<0.05$); 可的松饮水显著增加了试验处理 2-3d 肝脏 MDA 含量, 处理 10d 时处理剂量最小的第 II 组 MDA 含量显著高于对照组, 对 GSH-Px、SOD 的含量的影响明显, 除处理第 6d 时显著高于对照组外, 在整个试验期内均显著低于对照组。以上结果说明, 慢性氧化应激对组织器官发育的影响较小, 而 1-3d 对心、肝脏的过氧化状态影响显著。

3.3 讨论

3.3.1 可的松饮水对肉仔鸡生产性能和消化代谢的影响

3.3.1.2 可的松饮水对肉鸡生产性能的影响

应激时, 肉鸡肌肉、血浆中不稳定蛋白质贮存组织分解加强, 血浆尿酸和尿酸氮含量增加 (刘铀等, 1999a), 分解的氨基酸通过糖原异生作用生成葡萄糖, 从而使氮存留受到损害, 蛋白质合

成的降低伴随着肉鸡生长率的降低（汪尧春等，1998）。Charles 等（1981）研究表明 7w 以前，气温 19-26℃，随气温升高，肉仔鸡 ADG 和 FC 直线下降。多数研究认为热应激会影响动物的生产性能（Teeter, 1985；吕于明等，1998。ACTH 处理后，处理组在试验处理后 4d 和 7d 的增重均低于对照组（Puvadolpirod, 2000c）。

本试验结果表明，可的松处理未显著影响肉鸡 FC，该结果与 Puvadolpirod 等（2000c）报道相同，一般认为，热应激时鸡只 FC 极显著下降（顾宪红等，1995；王启军，2006a；James, 1989）。可能原因是热应激状态下，高温抑制了采食中枢的部分兴奋性，使得 FC 下降。可的松处理对 ADG 的影响不显著，和王启军(2006a)报道的高温应激对北京油鸡 ADG 无影响的结果相同，但和隋绍娟（2006）报道的皮质酮处理极显著地降低了 ADG 不一致。模拟应激下对生产性能的影响不太明显。可的松处理虽有降低 ADG 和升高 F/G 的作用，但差异不显著（ $P>0.05$ ），姜礼胜（1999）35 日龄 AA 龄肉鸡进行 1W 高温处理，极显著降低饲料转化率（ $P<0.01$ ）的结果不一致；与王启军（2006）报道，高温处理显著提高饲料转换率的结果也不一致，这可能的是由于应激的处理方式差异和肉鸡品种不同造成的。

3.3.1.3 可的松饮水对肉鸡消化代谢的影响

肉鸡代谢试验能全面反映肉鸡在可的松饮水状态下机体的消化代谢情况。Puvadolpirod（2000d）报道，ACTH 处理组降低了机体对 CP、EE、碳水化合物的吸收。本试验的结果显示，可的松饮水显著降低了肉鸡对 CP、EE 和碳水化合物的消化吸收率。该结果再次证明，应激反应抑制了机体对营养成分的消化利用。本试验也表明，应激处理后血浆中尿酸浓度显著高于同期对照组。

3.3.2 可的松饮水对肉仔鸡肌肉发育及肉质的影响

3.3.2.1 可的松饮水对肉品质的影响

pH 值对肉的嫩度、滴水损失、肉色等有直接影响。宰后肌肉 pH 的下降是因肉中的糖原酵解成乳酸积累而致（Lawrie, 1998）。宰前应激会引起肌糖原的耗竭，这是非正常屠体及肉质性状产生的原因（Lawrie, 1966）。在正常动物肌肉组织中，通常会有足够的糖原用于屠后的糖酵解，使肌肉的 pH 值降低（Kannan 等，1998），肉品成熟。Wood（1975）等研究发现，宰前急性应激会使肌肉 pH 值略微降低，但与对照组差异不显著；Kannan(1998)报道，短期饲喂皮质酮的肉鸡宰后 pH 值略高于对照组；Owens(2000b) 等研究发现宰前经过 3h 运输，宰后 pH 显著高于对照组，认为是 3h 运输导致肌糖原耗竭，引起肌肉 pH 值升高；Yong 等(2004)研究表明，宰前运输及驱赶，引起肌糖原大量消耗，宰后乳酸等产生受阻，从而延缓了宰后 pH 的下降。本研究表明，试验处理 1 和 2d 后，可的松饮水组 pH_1 显著高于对照组，表明宰前可的松饮水已引起了胸肌中糖原的消耗，从而延缓了宰后 pH 的下降。

滴水损失是肌肉持水性能的指标，滴水损失小，则肌肉系水力大。系水力直接关系到肉及其制品的质地、风味及组织状态，与肌肉 pH 有关。宰后糖原酵解致肌肉 pH 下降从而使肌肉蛋白的静电吸引减弱，肌球蛋白和肌动蛋白纤丝之间的间隙缩小，水分从肌原纤维渗到肌浆中，肌浆稀释，渗透压降低，水分进一步渗到肌细胞外的间隙。此外，肌纤维膜结构变化，如由于氧化而流动性改变、破裂等均会影响肌肉的持水力。应激降低肌肉的持水性，增加滴水损失(Northcutt

等, 1994; Kunst 等, 1996)。本试验表明, 可的松饮水处理后, 极显著增加了处理 6d 后的胸肌、腿肌滴水损失 ($P<0.01$), 极显著、显著增加了处理 10d 的胸肌和腿肌的滴水损失, 此结果与前人的报道一致。

3.3.2.2 可的松饮水对肌肉组织发育和肌肉成分的影响

应激时, 血液皮质酮浓度的升高, 体内分解代谢加强。机体为了应对应激原, 动用体储 (体脂、体蛋白), 经糖异生作用增加血糖浓度, 因此, 体组织的生长发育就会受到影响。本试验结果发现, 整个可的松饮水中, 对胸肌、腿肌相对重的影响不显著, 但在试验的后期有降低肌肉组织相对重的趋势。而对肌肉中营养成分的分析结果看出, 可的松饮水对胸肌中水分、蛋白、脂肪含量均有略微降低作用, 显著降低腿肌脂肪含量的结果与肌肉相对重下降的趋势一致。

3.3.3 可的松饮水对肉鸡血清激素和血浆过氧化状态的影响

3.3.3.1 对血液生理生化指标的影响

应激反应中, 机体通过神经-内分泌途径几乎动员了所有组织和器官对付应激。应激肉鸡肾上腺髓质的儿茶酚胺类及肾上腺皮质的皮质酮分泌增加, 儿茶酚胺能促进肝脏中的糖元分解, 从而使血糖浓度升高, 同时, 对肌肉中的糖元分解也有强烈的促进作用, 也加速脂肪的分解氧化; 皮质酮的作用同样是动员能量, 促进肌肉中蛋白质和体脂分解, 为糖元异生提供原料。因此, 应激反应中血糖、血脂、总蛋白浓度会明显升高。

血中酶多来自各种组织器官, 其活性与相应组织器官的代谢水平和功能状态有关, 机体的调节和适应能力在很大程度上取决于各组织器官的技能水平。

本试验可的松处理后, 血浆 CHOL 含量未见明显升高, 而 Siegel(1995)和 Puvadolpirod(2000a)的报道 ACTH 处理后, 使血浆 CHOL 升高。本试验中, 血浆中 TG、HDL、LDL 含量未见升高的结果与 Puvadolpirod(2000a)报道 ACTH 处理使血浆中 TG、HDL 浓度升高的结果不一致, 但与 Siegel(1985)报道 ACTH 处理后 12~18h 未影响血浆 HDL、LDL 含量结果一致。

尿酸是禽类蛋白质代谢的终产物。应激时血液皮质酮升高, 促进体内分解代谢。为满足机体对血糖的需求, 机体大量动用体蛋白, 经糖异生, 生成葡萄糖使得排泄物中的尿酸含量升高 (Brown, 1958; Siegel 和 Van Kampen, 1984; Davison, 1985)。本研究人为制造应激也增加了血中尿酸的含量。

应激时细胞线粒体受损, AST 逸出细胞进入血液, 使得血中 AST 活性升高。AST 含量最多的组织是心肌, 其次为肝脏和骨骼肌。长期高温应激造成鸡心肌的 AST 活性显著升高, 热应激死亡鸡心肌细胞质内少量线粒体崩解 (Bogin 等, 1997)。随环境温度的升高及应激时间的延长, 血 AST、谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶、CK 均显著升高 (刘凤华, 1997)。本试验结果显示, 在试验处理第 2d 后, 第IV组的 AST 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。表明第IV处理使机体主要组织器官受损。

3.3.3.2 对血浆激素和血糖浓度的影响

尽管众多应激原作用于机体后会引引起诸多指标的变化, 但至今国际上尚无统一的应激评判标准。现行的各种判断应激的指征也多停留在应激时机体所呈现出的心跳、呼吸次数等指标上, 除此以外, 还有某些激素(如肾上腺素等)。由于应激所产生的非特异性全身反应主要表现之一是下

丘脑-垂体-肾上腺皮质轴兴奋。应激信号可引起下丘脑室旁核(PVN)分泌的促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)增多,垂体前叶分泌的促肾上腺皮质激素(ACTH)增加,进而促进肾上腺皮质分泌糖皮质激素(GC)。Siegel(1995)认为家禽血液皮质酮含量升高可作为应激反应的主要标志。为了说明本试验中可的松对试验鸡所造成的有效应激,我们分别采用血液中反映应激的主要指标皮质酮、甲状腺素等激素和血糖浓度的改变,作为综合判定应激的指征。

有些关于激素的研究,忽略了不同动物分泌的GC不同。人、猪、羊、牛、马等以分泌皮质醇为主,皮质酮分泌量很低;而大鼠、小鼠、兔和禽类以皮质酮为主,皮质醇很低。犬与猫,两者分泌量接近。因此,研究禽类的应激时,一般不推荐测定皮质醇,研究家猪的应激,一般不测皮质酮(朱明霞等,2005)。

本试验中,试验处理初期1~2d,由于试验处理时间比较短,未达到机体应激反应的阈值,第IV组血浆皮质酮的浓度虽有升高的趋势,但仍未达到差异显著水平。试验处理3d后,由于较长时间的持续应激处理,应激原强度超过了应激阈值,机体发生应激反应,肾上腺素皮质快速释放皮质酮,使得第IV组血浆浓度快速升高,极显著的高于对照组($P<0.01$),表明机体出现了明显的应激反应。处理6d后,血浆皮质酮的浓度仍然以第IV组为最高,显著高于对照组($P<0.05$)。随着应激的延长,在应激原强度不增加的情况下,不会引起新的神经冲动,肾上腺髓质的分泌功能逐渐稳定,下丘脑分泌CRH不再增加,机体逐渐开始适应应激原,皮质酮的分泌量逐渐恢复到正常。本试验处理10d左右的结果似乎说明了这点。本试验采用可的松饮水处理后,血清皮质酮浓度升高和Spuvadolpirod(2000a,b,c)报道埋植微型泵释放ACTH,血液皮质酮浓度升高,以及隋绍娟(2006)报道饲喂皮质酮,血液皮质酮浓度升高的结果一致。

血浆GLU含量的变化是应激发生的早期指示剂之一(Spuvadolpirod等,2000a)。GLU浓度的变化与营养水平和激素水平的变化有关(Smith,1972,1974;Simon等,1979;Chamblee等,1989)。动物处于应激状态时,肾上腺髓质部大量分泌儿茶酚胺类激素,促进糖原和脂肪组织的分解代谢,使血糖升高,为“战斗或逃跑”做好能量准备(Siegel,1982)。应激后机体进入恢复期,应激反应时分泌量增加的各种激素开始恢复,血糖浓度会出现先升高后降低的变化过程。由血糖浓度的变化可以反应应激的发生过程。本试验结果显示,随饮水中可的松浓度的增加,血糖浓度出现最大值的时间提前。试验处理1d后,III和IV组的血糖浓度迅速上升,第IV组血糖浓度上升最快,最早出现最大值;处理2d后,第III组血糖浓度迅速升高为最大值,显著高于对照组,而第IV组的血糖浓度仍然很高,与对照组相比,无显著差异;处理3d后,第III和IV组的血糖浓度逐渐回落,第II组的血糖浓度升高,和对照组相比,差异不显著;处理6d后,第II组的血糖浓度继续上升,但由于第II组饮水中可的松剂量小,与对照组相比血糖浓度未上升到显著水平;处理10d后,第IV、III和II组相继进入恢复期,故血糖浓度以第I组为最高,血糖浓度有高到低的顺序依次为 $I>IV>III>II$ 。该结果和理论上应激反应发生时血糖浓度的变化过程相一致。且血糖浓度升高的时间早于皮质酮浓度升高的时间,和应激发生时的典型阶段模型一致。故可以认为可的松在肉鸡体内引起了应激反应。

3.3.3.3 对甲状腺激素分泌的影响

甲状腺激素是由动物甲状腺分泌,它刺激糖、蛋白质、脂肪和盐的代谢。研究表明甲状腺素和胰岛素均参与家禽的生长调控。甲状腺激素广泛参与营养代谢,促进机体生长和组织发育,其中三碘甲腺原氨酸(T_3)的活性为 T_4 活性的几倍到几十倍,起到50%~70%的生理作用,促进

RNA 聚合酶活性升高, 进而蛋白质合成增加而产生正氮平衡 (李维新等, 1986)。T₃ 是调节戊糖磷酸循环酶的因素之一, 促进脂肪合成及其关键酶的转录, 增加胰岛素 RNA 含量及胰岛素水平, 促进肌肉蛋白的合成与周转, 还控制着垂体中生长激素 (GH) 基因的表达和 GH 的合成。血液 T₃ 水平与禽类生长呈正相关, 甲状腺功能低下时, 生长明显受阻 (Decuyper 等, 1995)。甲状腺激素活性下降会导致动物生长缓慢。关于高温应激对血浆 T₃、T₄ 的浓度及其比值变化的报道不一, 有研究认为 T₃ 升高, T₄ 下降 (Andrate 等, 1997), T₃/T₄ 比值增大; 而有报道正好相反。从鸡血液甲状腺激素含量的变化情况看, 可的松处理后血浆中 T₃ 含量呈先降后升的变化趋势。试验初期 (处理 1、2d 后), 机体一方面分解体内的能源储备 (糖原), 增加血糖, 使得血糖浓度快速上升, 该结果与前面早期血糖浓度升高是一致的; 另一方面, 机体的内分泌功能紊乱, 甲状腺功能受到抑制, 可的松剂量最大的第 IV 组, T₃ 分泌量明显低于对照组 (P<0.01)。随应激时间的延长, 机体从应对到适应, 动用体内的营养储备, 体内的分解代谢增强, 表现为可的松处理剂量高的 III 和 IV 组 T₃ 浓度逐渐上升, 处理 10d 左右时, 第 IV 组 T₃ 浓度上升为最高。与 T₃ 含量变化不同, 自处理开始到处理结束, T₄ 的含量无明显变化趋势。T₃/T₄ 比值的大小反映 T₄ 向 T₃ 转化的能力, 该比值越高表明甲状腺功能越强。研究表明, T₃/T₄ 比值呈先降后升的变化趋势, 在应激早期表明甲状腺功能受到抑制, 后又恢复, 但在整个处理期间和对照组相比, 无显著差异。

3.3.3.4 可的松对抗氧化酶的影响

3.3.3.4.1 对丙二醛 (MDA) 含量的影响

MDA 是脂质过氧化反应的最终产物, 测试 MDA 的含量可以反映脂质过氧化程度, 间接反映出细胞损伤程度; SOD 是自由基损害的主要防御酶, 其重要意义在于清除 H₂O₂ 和 OH⁻ 的前身 O₂⁻, 从而保护细胞免遭毒性 O₂⁻ 的损伤。其活力可以反映机体清除 O₂⁻ 的能力 (张宝等, 2000)。SOD 的测定可反映组织内自由基水平及脂质过氧化程度; GSH-PX 是细胞内 H₂O₂ 和脂质自由基的清除剂。范石军 (2001) 研究表明, 肉鸡热应激状态下自由基产生量增加, SOD 和 GSH-PX 的活力降低, MDA 含量增加。MDA 和 SOD 是反映脂质过氧化程度的一对指标。SOD 和 GSH-PX 两个酶不但协同防止自由基的损伤效应, 而且相互间还起着保护作用。

本试验通过检测血清中 MDA 含量, 间接反应细胞脂质过氧化损伤程度, 结果表明, 同期随着饮水中可的松浓度的增加, 血清 MDA 含量明显增高, 而 SOD 活性明显降低, 表明随着可的松浓度的增加, 机体发生脂质过氧化反应增强, 产生的 O₂⁻ 引起机体进一步的损伤更大。从整个试验过程看, 随着处理时间的延长, 可的松含量由高到低依次出现 MDA 含量增加, SOD 活性降低的变化规律, 表明可的松的添加剂量同发生脂质过氧化反应的时间呈负相关。同样的规律也反映在血清中 GSH-PX 含量的变化方面。

3.3.3.4.2 对总抗氧化能力的影响

总抗氧化能力 (T-AOC) 是近几年研究发现的用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, T-AOC 的大小代表和反映机体抗氧化物酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基的代谢状态 (胡秀芳, 2000)。研究表明, 试验初期随可的松处理剂量的增加, 血清中 T-AOC 的含量有下降趋势, 第 IV 组在处理 2d 后, T-AOC 的含量下降到最低点, 显著低于对照组。随着处理时间的延长, 接着是第 III 组、第 II 组的 T-AOC 的含量下降到最低, 表明随着处理剂量的增加, 机体的总抗氧化能力下降, 随着处理时间的延长, 机体逐渐适应试验处理, T-AOC 逐渐恢复。该结果和前面 MDA、SOD、GSH-PX 的结果是一致的。

3.3.3.4.3 对肌酸激酶 (CK) 的影响

CK 是反应热应激水平的一个重要指标, 其活性随应激时间的延长而升高 (龚群, 1996), 这说明热应激破坏了细胞膜的屏障作用, 细胞膜的通透性升高释放出更多的细胞内酶, 从而使它们在血清中的活性升高 (范石军, 2001)。

血液中 CK 含量的升高暗示肌组织的损伤以及向血液中的释放增加。本试验结果表明, 随应激时间的延长, CK 含量逐步增加。处理 6d 后, 该趋势最明显, 第 IV 和 III 组血清中 CK 活性极显著地高于对照组, 且第 IV 组 CK 活性极显著高于第 III 组, 表明 III 和 IV 组的细胞膜的屏障作用受到极大的破坏, 并且可的松对第 IV 组细胞膜的破坏程度大于对第 III 组的破坏。随着应激时间的延长, 处理剂量最小的第 II 组在持续处理 10d 左右, 血液中 CK 的含量迅速升高, 显著的高于对照组, 第 III 和 IV 组由于机体对应激损伤耐受性的增加, CK 的含量明显下降, 显著低于第 II 组, 但和对照组无显著差异。该结果和热应激增加血清 CK 活性的结果一致。

3.3.4 可的松饮水组织过氧化状态和免疫器官生长发育的影响

3.3.4.1 关于可的松饮水对免疫器官指数影响的讨论

热应激不仅导致免疫抑制, 降低疫苗保护作用, 且还严重影响免疫器官发育, 造成动物发病率和死亡率增加 (刘瑞生, 2001)。家禽的胸腺分成串珠状的叶, 每叶由许多胸腺小叶组成, 具有培育 T 淋巴细胞、分泌胸腺激素的功能, 性成熟后退化; 法氏囊是鸟类特有的中枢免疫器官, 培育 B 淋巴细胞; 脾脏是重要的外周免疫器官, 是机体免疫应答的重要场所。

家禽应激的明显生理反应之一就是血液皮质酮 (CORT) 的升高。CORT 在抑制生长的同时, 也抑制免疫系统。它使整合到淋巴组织 (胸腺、法氏囊) 胞浆和胞核中的细胞毒性作用也相应提高 (Siegel 和 Could, 1982), CORT 和胞浆内的受体结合形成激素-受体复合物进入胞核而改变某些酶活性并影响核酸活性 (Sullivan 和 Vira, 1979); 抑制自然杀伤细胞的活性、抗体、淋巴细胞、激活因子和 T 细胞生长因子的产生 (Munk 等, 1984; Khansari 等, 1990); 细胞葡萄糖摄入和蛋白质合成被抑制而引起胸腺、法氏囊等器官的萎缩 (Cillis 等, 1979; Lillehoj 等, 1992), 降低了胸腺、法氏囊和脾脏的相对重量。ACTH 处理降低了处理 4、7d 后的免疫器官指数 (Siegel, 1962a; Glick, 1967; Davision 等, 1985; Puvadolpirod, 2000a)。本试验中可的松饮水处理 2d 后, 脾脏指数明显低于对照组, 而在处理 10d 后, 胸腺指数才有降低的趋势。表明应激对外周免疫器官的影响早于中枢免疫器官。

3.3.4.2 可的松饮水对腹脂率和肝脏的影响

ACTH 处理肉鸡显著增加了肝脏绝对重和相对重, Puvadolpirod(2000a)认为, 肝脏乃幼鸡脂肪酸合成的主要场所。ACTH 影响了肝脏脂肪的代谢, 故肝脏重量增加是脂肪含量增加的结果。本试验中, 肝脏相对重在试验期间未见明显增重。但肝脏中脂肪的含量在试验后期 (应激处理 10d 左右) 含量极显著 ($P < 0.01$) 高于对照组, 而水分含量却与同期对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

研究表明, 每升高 1°C ($21 \sim 29^{\circ}\text{C}$), 体脂增加 0.8%, 腹脂增加 1.6% (Hacina 等, 1996), 35°C 高温能显著增加 AA 肉鸡腹脂重和腹脂率 (王启军等, 2006; 隋绍娟, 2006)。本试验中, 可的松饮水对整个试验期内肉仔鸡腹脂沉积率未见显著影响, 可能与本试验研究时间较长, 动物

已经适应应激处理有关。血浆 TG 浓度与鸡体脂及腹脂量呈正相关 (Griffin, 1988; Griffin 等, 1982), 本研究中血浆 TG 浓度 (试验 4.1) 未随应激处理而变化, 因此这里腹脂也未见变化。

3.3.4.3 可的松饮水对组织过氧化状态的影响

试验性应激 (束缚) 导致交感-肾上腺系统的反应, 大量释放儿茶酚胺类激素 (Haggendal 等, 1987), 特别是肾上腺素能神经末梢释放的去甲肾上腺素可导致自由基产量增加而造成心肌损伤。自由基产生的增加会导致组织细胞内的脂质发生过氧化现象, 使得组织 MDA 含量增加。辐射、冷应激、急性热应激处理引起组织中脂质过氧化现象 (丛杰, 1993; 宋志宏, 1995; 林海, 1995)。本试验也发现, 可的松饮水引起了组织过氧化现象。体内自由基的清除主要依赖于酶系统和自由基清除剂, 其中 SOD、GSH-Px 起重要作用。分析本试验的研究结果可知, 心脏、肝脏中 MDA 含量与 SOD 和 (或) GSH-Px 之间存在着负相关关系, 且二者活性的变化早于 MDA。随应激时间的延长, 肝脏比心脏 GSH-Px 活性变化得更明显。从整个试验过程来看, 肝脏和心脏 MDA 含量呈先升高后降低, SOD 和 (或) GSH-Px 活性的变化相反, 肝脏的这种变化过程较心脏更明显, 相同的是, 心脏和肝脏在处理的最后出现的结果一致, MDA、SOD 和 GSH-Px 活性均下降, 说明应激处理的后期, 机体适应了应激过程, 自由基的产生不再增加, SOD 和 GSH-Px 活性逐渐恢复, 而体内的脂质过氧化减少, MDA 含量降低。

3.4 小结

3.4.1 20~30mg/L 可的松饮水, 在处理的 3~4d 即显著影响到了日粮 CP、EE 和 Ash 的消化率、10d 血液 TP 和尿酸增加;

3.4.2 可的松饮水 (10~30mg/L) 第 6 天显著影响了肉品质, 未见影响肌肉组织相对重量, 10-20mg/L 可的松饮水 6d 显著降低了肌肉组织蛋白、脂肪含量;

3.4.3 20~30mg/L 可的松饮水在 2~3d 即引起血液皮质酮、T₃、T₄ 激素, TAOC、SOD、GSH-Px、MDA 等的变化; 肝脏和心脏 2~3d MDA 显著升高, SOD 和 GSH-Px 降低, 10d 后开始恢复。

3.4.4 20~30 mg/L 可的松饮水, 2~4d 即可引起肉仔鸡的氧化应激, 10d 则有所恢复。

第四章 肌肉细胞氧化应激试验模型的研究

动物应激时血清皮质酮激素会明显升高 (Ben Nathan 等, 1976; Marshaly 等, 1984; Gould 和 Siegel, 1985; Davis 和 Siopes, 1987; Smith RF 和 Dobson H, 1990; Devhim 和 Teeter, 1991; 杜荣和顾宪红, 1995; Geraert 等, 1996; Mitchell 等, 1997; Kannan 等, 1997a, b; Hocking 等, 1999; 刘铀等, 1999; Littin 和 Cockrem, 2001), 医学上认为皮质醇属于分解代谢类异化激素 (谢敏豪, 1993), 其主要作用是抑制肌肉和脂肪组织从血液中摄取葡萄糖, 使肌肉蛋白质的合成减少, 分解增加, 此反应还可能造成肌肉细胞损伤或凋亡, 蛋白质分解增加即可作为底物氧化供能, 也可终由葡萄糖-丙氨酸循环糖异生维持血糖恒定。皮质醇激素不仅可促进蛋白质分解, 同时也影响水在体内的分布, 可减少水分进入细胞并促进细胞内水分排出, 从而增加细胞外液的含量, 直接影响肌肉细胞的功能及肉质 (蛋白含量、滴水损失等)。

维生素 C 作为一种具有强还原性抗氧化剂, 在细胞外液中通过中和机体代谢过程中产生的 $O_2^{\cdot-}$, OH 和 H_2O_2 等自由基及其氧化物, 降低了过氧化自由基在水相中引发的过氧化反应, 保护生物膜免受脂质过氧化的破坏, 从而间接对肉质起到保护作用 (Barja 等, 1996)。Realini 和 Duchkett 等 (2004) 研究发现, 饲料中添加 VC, 可明显降低不饱和脂肪酸的含量, 使牛肉色明显变红并且在贮藏过程中延缓了色素的氧化。

糖皮质激素具有广泛的生物学活性, 但其对肌肉卫星细胞增殖的影响以及能否用 DEX 处理来模拟动物应激条件下肉质的变化等问题尚不清楚, 本试验拟通过体外细胞培养, 以不同浓度地塞米松 (DEX) 处理肌肉卫星细胞, 建立肌肉卫星细胞的应激模型, 在此基础上以维生素 C 为营养补剂, 探讨糖皮质激素对肌肉细胞的生长的影响及营养补剂对手受应激肌肉细胞的保护作用, 验证肌肉细胞应激模型的可行性。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

4.1.1.1 试剂

① 地塞米松 (06022011, DEX, Dexamethasone sodium phosphate injection, 天津药业焦作有限公司, 5mg/ml; 0.25mg/ml DEX: 60ul 5mg/ml DEX+12ul血清+1128ul标准培养基); 标准培养基: 200ml 高糖DMEM培养基 (Gibco, 德国)+40ml 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青公司, 中国)。
② 噻唑蓝 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT, Sigma, LOT 10250195), 50mg MTT溶于10ml PBS中贮备液。-20℃保存, 使用时用培养基稀释成0.5mg/ml。
③ D-hanks液 (g/L): NaCl, 8.01 g; KCl, 0.40g; $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0.06g; KH_2PO_4 0.06g; $NaHCO_3$ 0.35g; 酚红 0.02g。
④ NBT (Nitroblue Tetrazolium, Sigma); VC (抗坏血酸, 北京化学试剂公司); 酸化异丙醇 (1mol/L HCl 2ml和48ml 异丙醇混匀);
⑤ TBA-TCA-HCl溶液 用0.125mol/L HCl配制 16.8%TCA (三氯乙酸, Trichloroacetic acid, 北京化学试剂公司) 溶液, 即为TCA-HCl溶液, 将41.6mg 硫代巴比妥酸 (30178034, TBA, 国药集团化学试剂公司, LOT YF20060307) 溶于10ml TCA-HCl 溶液中。
⑥ AA肉仔鸡 (北京华都集团公司提供) 胸肌和腿肌卫星细胞的培养。

4.1.1.2 仪器

酶标仪 (Bio-rad550型, 美国); 超净工作台 (SW -CJ-1F型, 苏州净化设备厂), CO₂培养箱 (2300型SH E I-LAB, 美国Sheldon Manufacturing Inc.), 倒置显微镜 (XSJ-D2, 重庆光学仪器厂), 显微摄影系统 (Olympus BH-2型, 日本Olympus公司), 紫外可见光分光光度计 (752型, 上海光学仪器厂)。

4.1.2 方法

4.1.2.1 细胞培养

1日龄Arbor Acres商品肉仔鸡 (北京华都肉鸡公司提供), 按试验5.1的方法取胸肌和腿肌卫星细胞 (台盼兰吞噬实验显示99%为卫星细胞), 用含20%小牛血清的DMEM培养于37℃, 含5% CO₂ 孵箱内, 3 d后换液, 第4d分瓶, 第5d即可进行实验。以1×10⁶个/ml接种于24孔或者96孔培养板 (Costar)。

4.1.2.2 肌细胞应激模型的建立

模拟应激状态下机体细胞所处外环境中 DEX 量, 建立肌肉细胞应激模型 (DEX 2.273, 1.136, 0.568, 0.284, 0.142, 0.0710、0.0355 和 0 g/L)。24 孔板用 1%明胶包被后, 以 1×10⁶ 个细胞/ml 分别接种 2-3 代的胸肌和腿肌卫星细胞, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 1-2 天后, 细胞 80%贴壁后, 超净台中分别向培养板中滴加相应浓度的 DEX、注射用水、标准培养基和血清 (表 4-1), 培养 24h, 每个处理重复 3 个孔。倾去培养基, 用 D-hanks 清洗, 再用 20ul 0.25%胰蛋白酶消化细胞约 5min, 待细胞变圆, 未完全脱离贴壁, 以标准培养基终止消化, 调整体积到 440ul, 用吹打管吹打使细胞分布均匀, 吸取细胞悬液到血球计数板 (XB-K-2, 上海) 上, 显微镜下计细胞个数; 另取 50ul 细胞悬液与 50ul 0.4%台盼兰溶液混匀, 吸取此细胞悬液到血球计数板上, 显微镜下计数蓝染和未蓝染细胞数, 细胞蓝染率 (%) = 100%×蓝染细胞数 / (蓝染细胞数+未蓝染细胞数)、细胞存活率 (%) = 1-细胞蓝染率 (%), 计算半抑制浓度 (IC₅₀) 可用于比较各添加剂的毒性大小。

4.1.2.3 细胞脂质过氧化产物生成量的测定

细胞受到氧化损伤时, 脂质过氧化物 (丙二醛, MDA) 生成量增多, 藉此可反映 DEX 对细胞的损伤程度。24 孔板用 1%明胶包被后, 以 1×10⁶ 个细胞/ml 分别接种 2~3 代的胸肌和腿肌卫星细胞, 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 1~2d 后, 细胞 80%贴壁后, 超净台中分别向培养板中滴加相应浓度的 DEX、注射用水、标准培养基和血清 (表 4-1), 培养 24h, 每个处理重复 3 个孔。将细胞刮下, 连同培养基一起经反复冻融 (-20℃ 1h; 36℃ 10min; -20℃ 1h; 36℃ 10min; -20℃ 1h; 36℃ 10min) 使细胞破碎, 混匀后取 0.3ml, 加入 2ml TBA-TCA-HCl 溶液, 80℃水浴 15min, 3000r/min 离心 10min, 取上清液在 535nm 处比色。细胞脂质过氧化物相对生成量 (%) = 100%×试验组吸光度值/对照组吸光度值。

表 4-1 细胞脂质过氧化产物生成量测定的 DEX 浓度处理设置

Table 4-1 Arrangements of DEX effect on lipid peroxides level

DEX 浓度, DEX content, g/L	2.273	1.136	0.568	0.284	0.142	0.0710	0.0355	0
DEX (5mg/ml), ul	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	0
注射用水, Sterile water for injection, ul	0	100	150	175	187.5	193.75	196.875	200
标准培养基, Standard culture medium, ul	200	200	200	200	200	200	200	200
血清, Serum, ul	40	40	40	40	40	40	40	40

表 4-2 GC 对肌细胞增殖的影响的细胞 DEX 浓度处理设置

Table 4-2 Arrangements of DEX effect on proliferation of SCs

DEX 浓度, DEX content, g/L	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.0390625	0
DEX (5mg/ml), ul	50	25	12.5	6.25				
DEX (0.25mg/ml), ul					62.5	31.25	15.625	
标准培养基, Standard culture medium, ul	40	70	85	92.5	37.5	68.75	84.375	100
血清, Serum, ul	10	5	2.5	1.25				

4.1.2.4 MTT 法测定 GC 对肌细胞增殖的影响

参照陈志阳等(2000)和林忠宁等(2000)的方法, 96 孔板用 1%明胶包被后, 以 1×10^6 个细胞/ml 分别接种 2~3 代的胸肌和腿肌卫星细胞, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 1~2d 后, 细胞 80%贴壁后, 超净台中分别向培养板中滴加相应浓度的 DEX (表 4-2), 加 VC 组 (10mg/ml, 2ul/孔) 减去相应体积的标准培养基, 每个处理重复 3 个孔, 培养 24h; 培养板倒置, 弃去培养基, 加入 MTT 使用液 (100 uL/孔), 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 1h; 培养板倒置, 弃去 MTT 使用液, 加入酸化异丙醇 (100 uL/孔) 并振荡。待颗粒完全溶解后, 用酶标仪在波长 545nm、参考波长 630nm 处测定吸光度值。细胞存活率 (%) = $(\text{OD}_{545} - \text{OD}_{630})_{\text{药物添加组}} / (\text{OD}_{545} - \text{OD}_{630})_{\text{对照组}}$ 。

4.1.2.4 VC 对肌肉细胞影响的研究

先将 VC 用标准培养基配制成 10mg/ml 和 1mg/ml 的溶液, 备用, 现配现用。96 孔板, 每孔添加细胞悬液 (含卫星细胞 1×10^6) 10ul, VC、培养基的添加见表 4-3, 每处理 3 孔重复, 配制不同浓度的 VC (1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 和 0.015625 g/L) 和 VE (0.5、0.25、0.125、0.0625 和 0.03125 g/L) 的培养基, 添加或不添加 DEX (0.15625 g/L)。 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 1~2d 后, 细胞 80%贴壁后; 培养板倒置, 弃去培养基, 加入 MTT 使用液 (100 uL/孔), 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 1h; 培养板倒置, 弃去 MTT 使用液, 加入酸化异丙醇 (100 uL/孔) 并振荡。待颗粒完全溶解后, 用酶标仪在波长 545nm、参考波长 630nm 处测定吸光度值。细胞存活率 = $(\text{OD}_{545} - \text{OD}_{630})_{\text{药物添加组}} / (\text{OD}_{545} - \text{OD}_{630})_{\text{对照组}}$ 。研究维生素 C 对肌肉卫星细胞的生长的促进作用, 同时添加 DEX, 观察 VC 对因 DEX 而造成的细胞损伤的缓解作用。

表 4-3 肌肉卫星细胞 VC 浓度处理设置 Table 4-3 Arrangements of vitamin C(VC) effect on SCs

VC 浓度, VC content, g/L	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0
VC (10mg/ml), ul	10	5	2.5					
VC (1mg/ml), ul				12.5	6.25	3.125	1.5625	
标准培养基, Standard culture medium, ul	80	85	87.5	77.5	83.75	86.875	88.4375	90

4.1.2.4 NBT 法测定 GC 对肌细胞活性氧产生的影响

用 NBT 受氧自由基攻击变成不可溶的蓝色甲瓩, 而导致的 NBT 减少作为超氧化物产生的指示。参考 Munoz 等(2000)的方法, 略有更该, 将培养在 96 孔板上以贴壁的肌肉细胞 (1×10^6 个/ml) 于无菌条件下, 加入相应浓度的 DEX (处理设置同 4-3, 每处理 3 孔重复), 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24h, 倾去培养基, 每孔加入 50 uL 0.3% NBT, 37°C 、5% CO_2 培养 2h, 倾去 NBT,

加入 300 μ L 甲醇固定，静置 10 min，弃上清液，沉淀用 70% 甲醇清洗 2 次，烘箱中烘干过夜，用 700 μ L 2 mol/L KOH 和 800 μ L DMSO 溶解沉淀的甲瓩，于 620 nm 比色测定其光吸光度值。

4.2 结果与分析

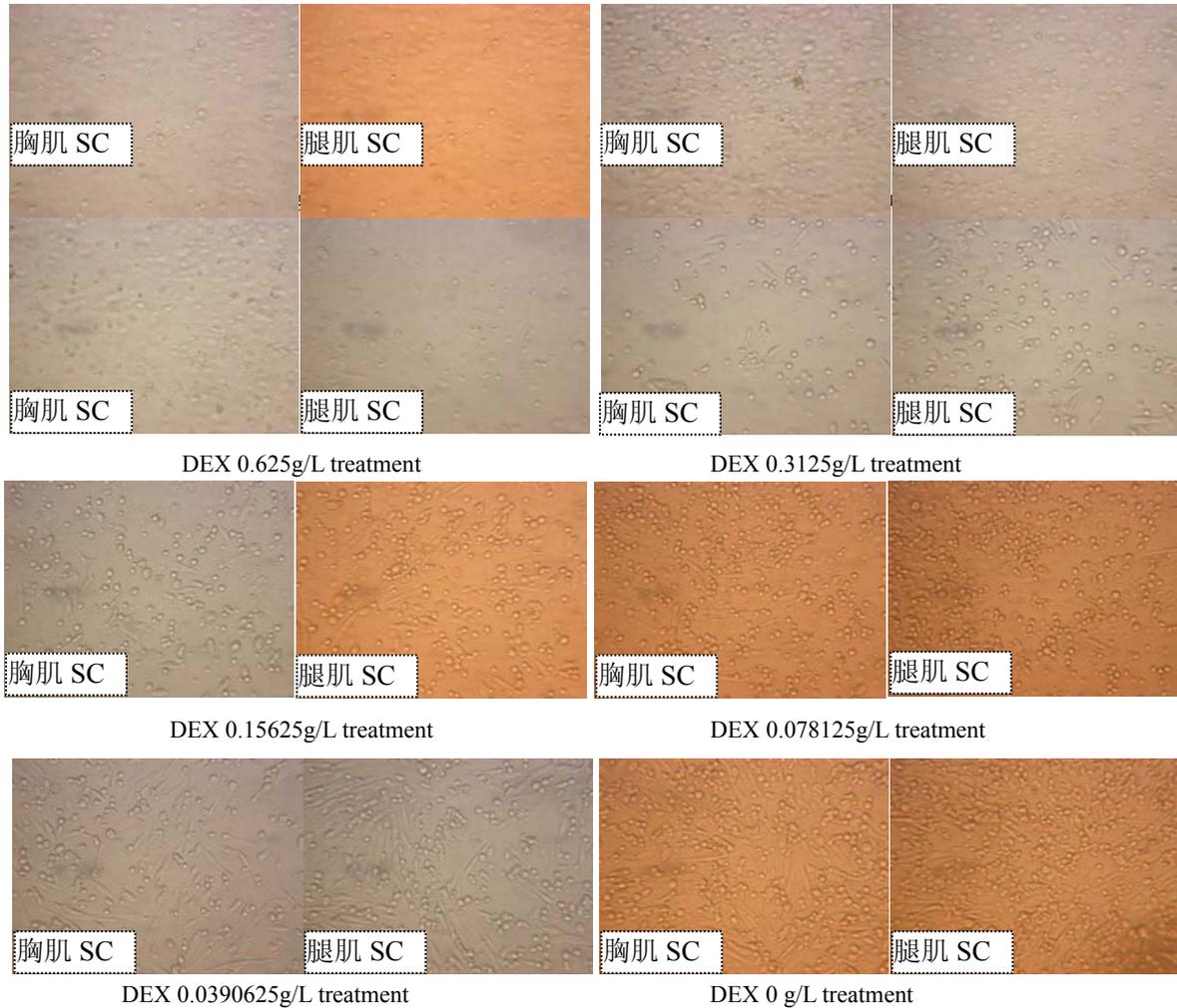


图 4-1 不同浓度DEX对胸肌和腿肌卫星细胞形态的影响

Fig 4-6 Effect different concentration of DEX on the shape of SCs

4.2.1 DEX对骨骼肌细胞形态的影响

由图4-1可以看出，DEX浓度大于0.625 g/L的3个处理，几乎均不见成型的胸肌和腿肌SCs，仅能看到一些细胞碎片，显微镜下不能进一步分辨这3种剂量DEX之间对SCs的影响程度，需要进一步采用更加精确的方法来分辨；随DEX浓度的降低，SCs数量逐渐增多，0.3125 g/L处理可明显看到生长的细胞，0.15625 g/L处理的细胞进一步增多，贴壁生长，细胞分布规则，细胞形态呈梭形或星型。显微镜下似乎可以看出腿肌SCs比胸肌SCs数量多，但无法定量。显微镜下可以明显看出，活性SCs随DEX浓度的增加而减少明显，DEX浓度大于0.625 g/L，几乎没有活的SCs存在；DEX浓度小于0.15625 g/L则对SCs的影响较小，腿肌SCs的抗DEX的能力较大，需要进一步采用更加精确的方法来分辨各DEX浓度对SCs的影响。

4.2.2 地塞米松对胸肌卫星细胞活性的影响

在观察了DEX对肌肉卫星细胞的形态学影响后,确定DEX对肌肉细胞有一定的杀伤作用;细胞个数是一项能直接反映DEX对肌肉细胞的毒性作用,试验表明(表4-4)培养板孔中的活细胞个数随培养基中的DEX浓度的增加而显著减少($P<0.01$)。DEX 0.0355 g/L处理组与对照组差异不显著($P>0.05$),随着浓度的进一步增加,细胞个数显著降低,细胞个数($Y, \times 10^4$)与DEX浓度($X, \text{g/L}$)的相互关系呈指数曲线关系($y=35.186e^{-0.7821X}$, $R^2=0.9322$)。细胞死亡率(蓝染率,表5.2-4)也随DEX浓度的增加而显著降低($P<0.01$),DEX浓度小于0.284g/L的各处理之间,虽然死亡率有下降的趋势,但差异不显著($P>0.05$);浓度在0.283~2.5g/L之间,各处理之间细胞死亡率差异极显著($P<0.01$),细胞蓝染率(死亡率, $Y, \%$)与DEX浓度($X, \text{g/L}$)的相互关系呈幂曲线关系($y=44.039X^{-0.3492}$, $R^2=0.9121$),从细胞的蓝染率,可看出DEX的 $IC_{50}=1.136\text{g/L}$ 。

随DEX浓度增加培养基中的活细胞个数显著降低,台盼蓝蓝染率显著增加,且两项指标均与DEX浓度成一定的函数关系,可以用不同浓度DEX处理肌肉卫星细胞来建立模型,研究有关问题。

表4-4 地塞米松对肉仔鸡胸肌卫星细胞个数和死亡率(%)

Table 4-4 Effect of DEX treatment on SCs number and Mortality (%)

DEX 浓度, DEX content, g/L	2.273	1.136	0.568	0.284	0.142	0.0710	0.0355	0	P value
细胞个数($\times 10^4$) Number ($\times 10^4$)	6.94 $\pm 0.99^{\text{D}}$	10.17 $\pm 0.72^{\text{eD}}$	24.14 $\pm 1.74^{\text{dC}}$	30.57 $\pm 1.14^{\text{bcB}}$	28.68 $\pm 0.16^{\text{cB}}$	31.45 $\pm 2.80^{\text{bB}}$	39.00 $\pm 0.25^{\text{aA}}$	37.67 $\pm 1.66^{\text{aA}}$	0.0001
细胞蓝染率(%) Mortality (%)	67.48 $\pm 10.10^{\text{A}}$	50.48 $\pm 0.82^{\text{B}}$	33.07 $\pm 2.67^{\text{C}}$	21.58 $\pm 4.05^{\text{D}}$	19.70 $\pm 3.24^{\text{D}}$	19.79 $\pm 5.09^{\text{D}}$	15.63 $\pm 1.19^{\text{D}}$	15.15 $\pm 2.19^{\text{D}}$	0.0001

A,B,C,D: 同行肩注大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$); a,b,c,d,e,f: 同行肩注小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

A, B, C, D, E: Values within a row with different capital superscript letters differ very significantly ($P<0.01$); a, b, c, d, e, f: Values within a row with different small superscript letters differ significantly ($P<0.05$).

4.2.3 DEX对胸肌和腿肌细胞存活率(%)的影响

四唑盐比色试验是一种检测细胞存活和生长的方法,或细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四唑盐还原为难溶的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中,而死亡细胞无此功能。用酶联免疫检测仪在490nm波长处检测其吸光度值,可间接反映活细胞数量。不同剂量地塞米松对骨骼肌细胞增殖的影响见表4-5。

随DEX浓度的提高,胸肌SCs的相对存活率降低明显,培养液中的DEX浓度大于0.625 g/L后,细胞的存活率均较低且相互差异不显著($P>0.05$),浓度进一步降低则各浓度之间差异极显著($P<0.01$);小于0.078125 g/L的两个处理的细胞相对存活率差异不显著($P>0.05$)。同样的浓度,添加VC后,各DEX处理组细胞的存活率均有所提高,各处理之间的差异显著性与未加VC一致;DEX浓度越高,VC改善细胞存活率的幅度越大,DEX浓度小于0.3125 g/L的处理,VC的改善作用不太明显;DEX浓度大于0.625 g/L后,VC对细胞存活率的改善作用非常明显,DEX 1.25 g/L处理,加VC后细胞存活率显著提高($P<0.05$),DEX 2.5 g/L+VC处理后细胞存活率极显著提高($P<0.01$),改善了60.37%。

表4-5 MTT法测定DEX对胸肌和腿肌细胞存活率(%)的影响

Dosage g/L	胸肌卫星细胞 SC from breast muscle			腿肌卫星细胞 SC from thigh muscle			P值
	DEX	DEX +VC	改善, % enhancement	DEX	DEX +VC	改善, % Enhancement	P Value
0	100	100		100	100		
0.0390625	75.57±4.62 ^A	77.33±3.48 ^A	2.33	76.03±4.47 ^A	80.58±3.01 ^A	5.98	0.2491
0.078125	72.49±7.42 ^A	73.17±10.37 ^A	0.94	73.73±3.20 ^A	76.70±2.39 ^B	4.03	0.7489
0.15625	59.56±6.65 ^B	61.75±5.96 ^B	3.67	60.27±12.00 ^B	67.72±5.77 ^{BC}	12.36	0.3732
0.3125	30.88±6.67 ^{C1}	31.26±2.61 ^{C1}	1.23	31.14±3.07 ^{C1}	63.54±10.07 ^{CH}	104.05	0.0001
0.625	15.27±3.74 ^{D1}	18.23±1.17 ^{D1}	19.38	15.96±5.00 ^{D1}	48.47±9.67 ^{DH}	203.70	0.0001
1.25	11.43±2.61 ^{DHc}	16.32±2.22 ^{DHb}	42.78	13.92±0.57 ^{DHbc}	41.57±6.61 ^{DGa}	198.64	0.0001
2.5	9.64±1.92 ^{D1}	15.46±2.00 ^{DH}	60.37	12.50±1.04 ^{DHI}	26.10±4.40 ^{EG}	108.80	0.0001
P值 P Value	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001		

A,B,C,D,E: 同列肩注大写字母不同表示差异极显著(P<0.01); G,H,I: 同行肩注大写字母不同表示差异极显著(P<0.01); a,b,c: 同行肩注小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

A,B,C,D,E: Values within a column with different capital superscript letters differ significantly (P<0.01); G,H,I: Values within a row with different capital superscript letters differ very significantly (P<0.01); a, b, c: Values within a row with different small superscript letters differ significantly (P<0.05).

随DEX浓度的提高,腿肌SCs相对存活率降低明显,培养液中的DEX浓度大于0.625 g/L后,细胞的存活率均较低且相互差异不显著(P>0.05),浓度进一步降低则各浓度之间差异极显著(P<0.01);小于0.078125 g/L的两个处理的细胞相对存活率差异不显著(P>0.05)。同样的浓度,添加VC后,各DEX处理组细胞的存活率均有所提高,各处理之间的差异显著性与未加VC一致;DEX浓度越高,VC改善细胞存活率的幅度越大,DEX浓度小于0.15625 g/L的处理,VC的改善作用不太明显;DEX浓度大于0.3125 g/L的处理,VC对细胞存活率的改善作用非常明显(P<0.001),改善率均在100%以上;甚至DEX 0.625 g/L处理,加VC后细胞存活率显著提高(P<0.01),改善了203.7%。

腿肌SCs对DEX的耐受力较大,同样浓度的DEX处理,腿肌SCs的存活率均大于胸肌,浓度大的DEX处理更为明显,如DEX 1.25和2.5 g/L处理腿肌SCs存活率比胸肌分别大了21.78%和29.67%;VC对腿肌细胞因DEX而造成的细胞存活降低的改善作用,比胸肌细胞更加明显;尤其是当DEX浓度大于0.3125 g/L后,VC对腿肌细胞存活率的改善更加明显,存活率大大高于胸肌SCs。

不同浓度DEX处理后胸肌细胞存活率曲线:为乘幂曲线: $y=14.944X^{-0.6082}$ ($R^2=0.9562$);腿肌细胞的曲线为: $y=17.091X^{-0.5193}$ ($R^2=0.9294$);其中X为DEX剂量(g/L)、y为SCs成活率(%), R^2 为方程的相关系数值。加VC后胸肌和腿肌细胞存活率(y,%)随DEX浓度(X,g/L)的变化曲线分别变为: $y=19.642X^{-0.4663}$ ($R^2=0.9216$);和 $y=40.418X^{-0.2536}$ ($R^2=0.8971$)。可见细胞存活率与DEX浓度之间有一定乘幂关系,相关性较高,可以用于建立细胞应激模型,以便进一步研究肌肉细胞的有关代谢等。总之,细胞培养液中添加DEX显著影响了胸肌和腿肌卫星细胞的相对存活率,随着DEX浓度增加,细胞存活性呈幂函数曲线降低;培养液中添加VC改善了肌肉细胞的存活率,随着DEX浓度增加,VC的改善作用变小;腿肌卫星细胞抵御DEX破坏作用的能力更加明显,VC改善作用是腿肌细胞好于胸肌卫星细胞。

4.2.4 DEX对胸肌和腿肌细胞脂质过氧化产物生成量的影响

丙二醛（MDA）是膜脂质过氧化产物，不同浓度的DEX处理组肌肉细胞的MDA含量均比对照组高（表4-6）。以对照组的细胞液MDA为1（100%），随着DEX浓度的增加，胸肌卫星细胞内MDA显著增加（ $P<0.0067$ ），胸肌MDA相对生成量（Y）与DEX（x，g/L）之间呈幂函数关系 $Y=1.5723x^{0.0983}$ （ $R^2=8909$ ）；腿肌卫星细胞内MDA也显著增加（ $P<0.0001$ ），腿肌MDA相对生成量（Y）与DEX（x，g/L）之间呈幂函数关系 $Y=1.3213x^{0.0789}$ （ $R^2=9265$ ）。说明DEX处理增强了肌肉细胞的膜脂质过氧化作用，使膜系统受到不同程度的过氧化损伤；相对来说腿肌卫星细胞的MDA相对生成量低于胸肌卫星细胞，说明腿肌卫星细胞对DEX的耐受性更好。

表4-6 DEX对胸肌和腿肌细胞中MDA相对生产量的影响

DEX 浓度、DEX content, g/L		2.273	1.136	0.568	0.284	0.142	0.0710	0.0355	0	P value
MDA 相对生成量	BM	1.83	1.56	1.46	1.29	1.25	1.27	1.17	1	0.0067
	SCs	$\pm 0.21^{aA}$	$\pm 0.096^{abAB}$	$\pm 0.13^{bcAB}$	$\pm 0.13^{bcB}$	$\pm 0.14^{bcB}$	$\pm 0.32^{bcB}$	$\pm 0.15^{cB}$		
MDA Relative yield	TM	1.45	1.35	1.26	1.14	1.09	1.08	1.06	1	0.0001
	SCs	$\pm 0.058^{aA}$	$\pm 0.0047^{bB}$	$\pm 0.035^{cB}$	$\pm 0.026^{dC}$	$\pm 0.023^{edC}$	$\pm 0.052^{edC}$	$\pm 0.0255^{eC}$		

A, B, C, and a, b, c, d: 同表4-4; same as 4-4;

BM SCs: Satellite cell from breast muscle, 胸肌卫星细胞; TM SCs: Satellite cell from thigh muscle, 腿肌卫星细胞。

4.2.5 DEX对胸肌肉卫星细胞中氧自由基产生量的影响

氯化硝基四氮唑蓝（NBT）作为最终电子受体，底物脱下来的氢最后传递给NBT，NBT被还原后产生蓝紫色的不溶于水的物质，但溶于甲醇和DMSO中。通过测定NBT被还原生产的甲瓩的量可以反映细胞内自由基的生成量，从而反映DEX对自由基生成量的影响。单测定反应体系的OD值（表4-7）表明，随着DEX浓度增加（0-0.3125 g/L）OD值增加明显，但DEX浓度在增加，则OD值降低比较明显，这可能与DEX浓度较大（大于0.625 g/L）时，细胞的存活率降低，NBT法反映的是细胞内氧自由基的生成量，没有活细胞，自然也不能还原NBT；因此用前面做的MTT法蓝染率来校正NBT法测定的OD值，数据就会更有意义。

用表4-7中胸肌卫星细胞存活率数据校正后OD值随DEX浓度的增加而增加明显，DEX 2.5、1.25和0.625 g/L最高，三组差异不显著（ $P>0.05$ ），极显著高于其它处理组（ $P<0.01$ ），对照组最低，极显著低于其它处理组（ $P<0.001$ ）。说明随着DEX浓度的增加，细胞内氧自由基产生量增加，产生氧化应激现象比较明显。校正后OD值（Y）与DEX浓度（X，g/L）的关系呈幂函数关系： $Y=0.8328x^{0.457}$ （ $R^2=0.9232$ ）。腿肌卫星细胞的OD值相对较低，且未校正前因为DEX对活细胞的杀伤作用较大，NBT被还原的量较低，DEX浓度大于0.625g/L的处理的OD值均较低，当DEX小于0.15625g/L时，OD值均较高；校正后OD值随DEX浓度的增加而明显增加（ $P<0.01$ ），校正后OD值（Y）与DEX浓度（X，g/L）的关系呈幂函数关系： $Y=0.3898x^{0.334}$ （ $R^2=0.979$ ）。

随DEX浓度的增加，校正后的NBT被还原量（吸光度值）显著增加，说明氧自由基量增加明显，自由基随DEX浓度升高而升高，二者成幂函数关系（胸肌、腿肌 $Y=0.8328x^{0.457}$ 和 $Y=0.3898x^{0.334}$ ）。

表4-7 地塞米松对肉仔鸡胸肌卫星细胞活性的影响

Table 4-7 Effect of DEX treatment on livability of SCs from breast muscle

DEX 浓度, DEX content, g/L	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.0390625	0	P value
BM SCs 吸光度值 OD Value	0.111 ±0.0063 ^{dC}	0.127 ±0.012 ^{eBC}	0.143 ±0.0031 ^{bb}	0.180 ±0.0085 ^{aA}	0.178 ±0.0066 ^{aA}	0.173 ±0.0090 ^{aA}	0.132 ±0.015 ^{bcBC}	0.123 ±0.013 ^{cdBC}	0.0001
校正吸光度值 Adjusted OD Value	0.974 ±0.029 ^{aA}	0.947 ±0.031 ^{aA}	0.943 ±0.064 ^{aA}	0.566 ±0.0015 ^{bb}	0.306 ±0.0098 ^{cC}	0.246 ±0.0024 ^{dCD}	0.181 ±0.014 ^{eDE}	0.123 ±0.013 ^{fE}	0.0001
LM SCs 吸光度值 OD Value	0.0650 ±0.0039 ^{dD}	0.0590 ±0.0077 ^{deD}	0.0503 ±0.0018 ^{eD}	0.0963 ±0.0095 ^{cC}	0.119 ±0.0065 ^{abAB}	0.113 ±0.0078 ^{bb}	0.109 ±0.0051 ^{bcB}	0.130 ±0.0085 ^{aA}	0.0001
校正吸光度值 Adjusted OD Value	0.519 ±0.0073 ^{aA}	0.423 ±0.054 ^{bB}	0.323 ±0.029 ^{cC}	0.303 ±0.017 ^{cC}	0.197 ±0.0078 ^{dD}	0.154 ±0.0097 ^{eDE}	0.138 ±0.0048 ^{eE}	0.130 ±0.0085 ^{eE}	0.0001

A,B C,D,E and a, b, c, due: 同表4-4; same as 4-4;

BM SCs: Satellite cell from breast muscle, 胸肌卫星细胞; LM SCs: Satellite cell from thigh muscle, 腿肌卫星细胞。

4.2.6 不同浓度维生素C对骨骼肌细胞损伤的影响

正常骨骼肌细胞生长良好，为绿色，成梭形或星型，大小较为统一，培养基中加入地塞米松后，损伤的骨骼肌细胞数较多，为黄色呈圆形，少数为正常细胞，为绿色呈梭形，加入VC后，大多数细胞为正常细胞，少数为损伤细胞，为橘红色或黄色呈圆形。以不添加VC的处理为对照，研究VC对肌肉卫星细胞的生长的促进作用，同时添加DEX，观察VC对因DEX而造成的细胞损伤的缓解作用。

随VC浓度的增加，标准培养基中细胞的存活率显著增加，细胞相对存活率（Y）与VC浓度（X, g/L）之间呈幂函数关系： $Y=1.5451x^{0.1007}$ （ $R^2=0.9863$ ）。细胞在培养基中的生长过程中自身会产生一些超氧化物、代谢物等会抑制自身的生长，通过向培养基中添加VC，可以清除和还原抑制细胞生长的一些物质（超氧化物），从而起到促进细胞增殖的作用，但这种对细胞增殖的促进作用不会无限，因为细胞的生长空间有限，因此成幂函数关系。培养基中加入DEX后，细胞的存活率降低比较明显，前面研究表明0.15625g/L的DEX导致的细胞存活率为60%左右，用此浓度的DEX来处理肌肉卫星细胞，同时添加不同浓度的VC观察其对因DEX而造成的细胞存活率降低的作用。研究表明，随VC浓度的增加，细胞的相对存活率增加显著，但存活率均低于未添加DEX的处理；加DEX后，不同浓度VC对细胞存活率的改善相对作用降低，低浓度VC时这种改善作用降低得较少，高浓度VC对因DEX而造成的细胞存活率的改善作用降低。DEX处理后再加VC，细胞相对存活率（Y）与VC浓度（X, g/L）之间仍呈幂函数关系： $Y=1.3099x^{0.0685}$ （ $R^2=0.9503$ ）。

表4-8 维生素C对肉仔鸡胸肌卫星细胞活性的影响

Table 4-8 Effect of VC on relative livability of SCs from breast muscle

浓度, Concentration, g/L	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0	P Value
VC	1.59 ^{aA} ±0.27	1.42 ^{abAB} ±0.27	1.32 ^{bcBC} ±0.084	1.23 ^{bcdBCD} ±0.12	1.18 ^{cdeBCD} ±0.10	1.10 ^{deCD} ±0.11	1.02 ^{eD} ±0.046	1	0.0001
VC+DEX	1.34 ^{aA} ±0.036	1.26 ^{abAB} ±0.044	1.17 ^{bcBC} ±0.072	1.12 ^{cdBC} ±0.029	1.05 ^{cdC} ±0.24	1.03 ^{dC} ±0.073	1.02 ^{dC} ±0.048	1	0.0001

A,B C,D,E and a, b, c, d: 同表4-4; Same as 4-4.

培养基中添加不同浓度VC对细胞相对存活率的影响不同,浓度越大对细胞存活率的改善作用越强,VC浓度与细胞相对存活率呈明显的幂函数关系(VC: $Y=1.5451x^{0.1007}$; VC+DEX: $Y=1.3099x^{0.0685}$)。

4.3 讨论

动物应激时血清皮质酮激素会明显升高(Ben Nathan 等, 1976; Marshaly 等, 1984; Gould 和 Siegel, 1985; Davis 和 Siopes, 1987; Smith RF 和 Dobson H, 1990; Devhim 和 Teeter, 1991; 杜荣和顾宪红, 1995; Geraert 等, 1996; Mitchell 等, 1997; Kannan 等, 1997a, b; Hocking 等, 1999; 刘铀等, 1999; Littin 和 Cockrem, 2001),医学上认为皮质醇属于分解代谢类异化激素(谢敏豪, 1993),其主要作用是抑制肌肉和脂肪组织从血液中摄取葡萄糖,使肌肉蛋白质的合成减少,分解增加,此反应还可能造成肌细胞损伤或凋亡,蛋白质分解增加即可作为底物氧化供能,也可终由葡萄糖-丙氨酸循环糖异生维持血糖恒定。皮质醇激素不仅可促进蛋白质分解,同时也影响水在体内的分布,可减少水分进入细胞并促进细胞内水分排出,从而增加细胞外液的含量,直接影响肌肉细胞的功能以及肉品质(蛋白含量、滴水损失等)。

VC作为一种具有强还原性抗氧化剂,在细胞外液中通过中和机体代谢过程中产生的 O_2^- , OH^- 和 H_2O_2 等自由基及其氧化物,降低了过氧化自由基在水相中引发的过氧化反应,保护生物膜免受脂质过氧化的破坏,从而间接对肉质起到保护作用(Barja 等, 1996)。Realini 和 Duchkett 等(2004)研究发现,饲料中添加VC,可明显降低不饱和脂肪酸的含量,使牛肉色明显变红并且在贮藏过程中延缓了色素的氧化。

DEX对骨骼肌细胞形态学的影响 显微镜观察了直接用DEX处理肌肉SCs后,细胞的变化。镜下观察到DEX造成培养肉仔鸡骨骼肌细胞的损伤或死亡现象,随DEX浓度的提高而严重,DEX浓度比较低时,显微镜下不能继续分辨出DEX的作用,需要进一步用其它手段研究,较低浓度时肌肉SCs的理化变化。

DEX对胸肌SCs活性的影响 通过细胞直接计数和观察细胞台盼蓝染(死亡)率,表明随DEX浓度增加,培养基中细胞数量减少;MTT法进一步确证了细胞活性随DEX浓度的增加而降低。刘传康(2003)研究了DEX对骨骼肌成纤维细胞增殖的影响,研究认为 10^{-5} mol/LDEX限制影响了成纤维细胞的增殖,与本研究表明的DEX可抑制细胞增殖,降低细胞存活率的结论一致。严政和赵彦(2005)用DEX处理骨骼肌SCs,建立了肌细胞损伤模型,研究认为DEX可以抑制骨骼肌细胞增殖,降低细胞存活率,以体外肌肉SCs培养和DEX建立的细胞应激模型,辅以细胞内钙离子为指示,可以筛选降低DEX对细胞损伤的添加剂。

DEX对胸肌和腿肌细胞脂质过氧化产物和氧自由基生成量的影响 肌细胞内钙离子浓度的超负荷还能促进膜脂质过氧化和自由基的形成,从而通过超氧化作用攻击细胞膜、细胞器及蛋白质等成分,结果造成细胞凋亡或死亡。刘传康(2003)研究认为DEX增加了成纤维细胞的凋亡,可能是自由基增多、MDA生成量增加的因素。本试验采用培养的肉仔鸡SCs建立的氧化应激模型研究了激素对细胞的影响,研究表明随DEX浓度升高,骨骼肌细胞会产生损伤甚至凋亡,VC对由激素导致的细胞损伤和凋亡有一定的预防作用。

不同浓度VC对骨骼肌细胞损伤的影响 VC是一种抗应激添加剂,在细胞膜上其抗氧化作用,

肌肉细胞受到刺激后，细胞内钙离子浓度升高，由于胞浆内游离钙过多，随之进入线粒体内，损伤氧化磷酸化，造成ATP合成不足（Wang和Duff, 1997），另一方面肌纤维、肌浆网和线粒体中钙依赖型ATP酶的超常活动，ATP消耗过多，使得高能磷酸化合物（ATP、CP）的储存严重耗竭，从而导致肌肉细胞功能和结构的破坏（Orzechowski等, 2003）。应用VC对DEX诱导损伤的骨骼肌细胞进行试验研究，显示VC可使骨骼肌细胞内的钙离子浓度降低，增加骨骼肌细胞的存活率。Rojas和Rugeles（2002）报道抗氧化剂VC通过抑制DEX诱导的淋巴细胞凋亡增强淋巴细胞的增殖能力，VC具有抗氧化作用，提示通过抗氧化促进细胞增殖，抑制DEX诱导的淋巴细胞的凋亡。

4.4 小结

研究建立了DEX浓度对培养基中的活细胞数、细胞台盼蓝蓝染率、胸肌和腿肌SCs相对存活率、肌细胞MDA相对生成量以及NBT被还原量（吸光度值）的影响，并建立了DEX浓度与所检测指标之间的数量关系。发现在培养液中添加VC可改善了肌肉细胞的存活率，随着DEX浓度增加，VC的改善作用变小；VC浓度越大，对细胞存活率的改善作用越强。这些结果表明可以通过向肌肉SCs培养基中添加不同浓度的DEX来建立肌肉细胞氧化应激模型，以便于进一步研究应激对肉质的影响，以及改善应激添加剂的作用机理。

第五章 DEX 对鸡胸、腿肌卫星细胞中 Ca^{2+} 的影响

细胞通过位于胞膜或胞内的受体,感受细胞外信息分子的刺激,经复杂的细胞内信号转导系统的转换而影响其生物学功能,这一过程称为细胞信号转导(唐量等,2004)。阐明肌肉细胞中信号转导的机理,认清动物应激期间,肌肉细胞的增殖、分化、代谢及凋亡等诸方面的表现和调控方式,进而理解肌肉生长、发育和代谢的调控机理。以细胞 Ca^{2+} 浓度变化为基础的 Ca^{2+} 信号系统,所参与的生理过程非常广泛。内质网是 Ca^{2+} 的贮存部位,细胞受到外来化学物质刺激时,细胞膜上的 Ca^{2+} 通道开放,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,通过CaM使得NOS(一氧化氮和酶)激活产生NO,肌细胞中,NO的靶酶是鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase),NO与其结合后被活化,继而产生肌肉收缩,发生肌肉代谢(郭艳林和孙大业,1995)。

已有研究表明应激期间,均伴有动物血清糖皮质激素的升高,且升高程度与应激强度的大小有一定的关系;应激还会影响肉质,而直接以肌肉细胞为研究对象,关于糖皮质激素在其细胞内的信号传导,还鲜见研究。本研究拟通过直接观察激素处理后,肌肉卫星细胞内 Ca^{2+} 的变化,证明激素可以通过激发细胞内游离 Ca^{2+} 的增加产生系列信号转导反应,从而引发细胞发生一些生理生化反应,从细胞水平探讨激素在氧化应激期间对肌肉品质的影响机理,为进一步研究应激对肌肉品质的影响。动物应激期间,通过细胞外糖皮质激素作用于肌肉细胞内钙离子信号转导系统,引起肌肉细胞发生一系列生理生化反应,最终可能影响肉质;可以研究如何阻断(或干预)该信号系统,从而在应激期间保护肉质,是本研究的意义所在。

5.1 材料与方法

5.1.1 试剂和试剂

①地塞米松(06022011, DEX, 天津药业焦作有限公司),用D-hanks液配制,高糖DMEM培养基(Gibco, 德国),胎牛血清(FBS, 杭州四季青公司, 中国)。②Fluo-3/AM(50013/50014/50016, Bitium, USA)用二甲基亚砷配成1 ug/ul,置于-20℃冰箱保存,Pluronic F-127(Sigma, USA)。③D-hanks液(g/L): NaCl, 8.01 g; KCl, 0.40g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.06g; KH_2PO_4 0.06g; NaHCO_3 0.35g; 酚红0.02g。④AA肉仔鸡(北京华都集团公司提供)胸肌和腿肌卫星细胞的培养。

LEICA TCS SP2 SE激光扫描共聚焦显微镜(Leica Corporate, Solms, Germany)。

5.1.2 方法

5.1.2.1 细胞培养

1日龄Arbor Acres商品肉仔鸡(北京华都肉鸡公司提供),按附录2的方法取胸肌和腿肌卫星细胞(台盼兰吞噬实验显示99%为卫星细胞),用含20%小牛血清的DMEM培养于37℃,含5% CO_2 孵箱内,3 d后换液,第4d分瓶,第5d即可进行实验。以 1×10^6 个/ml接种于激光共聚焦显微镜专用玻璃培养皿(P35G-0-10-C, 美国MatTek公司)。

5.1.2.2 荧光探针标记

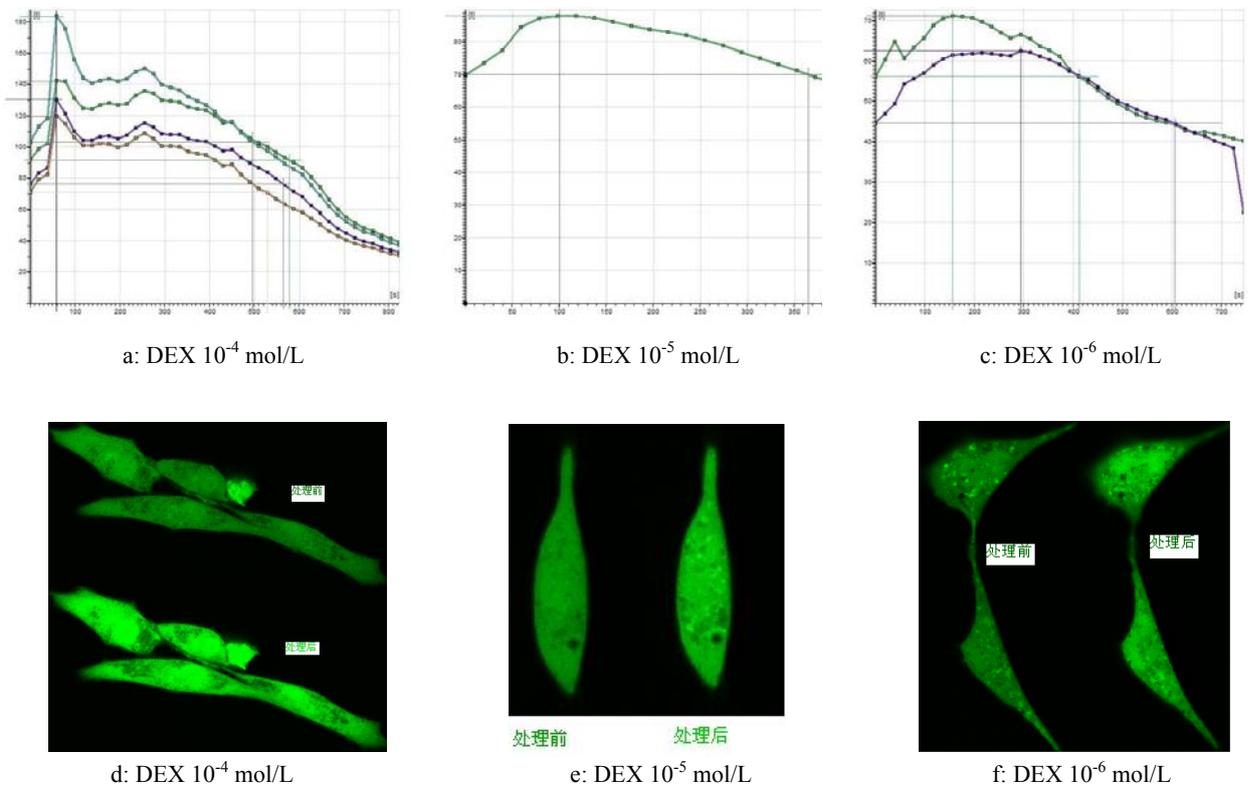
将培养2 d的胸肌和腿肌卫星细胞用D-hanks+Hepes缓冲液(Hepes终浓度为10 mmol/L)漂洗3次,滴入终浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的Fluo-3/AM,加入1 μl 25% pluronic F-127,在37℃、5% CO_2 孵箱中孵育1 h,其间轻轻振荡几次,经D-hanks+Hepes缓冲液漂洗2次后,再滴入D-hanks+Hepes液0.5 ml。

5.1.2.3 Ca^{2+} 动态变化的LSCM测定

LSCM由共聚焦显微镜主体，激光器（ Ar^+ 激光）和微型计算机构成。激光束的扫描与控制以及图像数据的采集和加工均由计算机完成。将标记好荧光探针Fluo-3/AM的胸肌和腿肌卫星细胞，放入激光扫描共聚焦显微镜测定小室，用装有LEICA倒置相差显微镜和10目镜×100油镜LEICA TCS SP2 SE激光扫描共聚焦显微镜系统扫描成像。用488 nm氩离子激光激发染料，发射波长505~530nm，以19.968秒的间隔扫描。数据通过图像采集器直接送入计算机，然后用LSM软件(Leica Corporate, Solms, Germany)进行图像分析。

5.2 结果与分析

5.2.1 添加不同浓度DEX胸肌卫星细胞内 Ca^{2+} 的变化



a,b,c: 不同浓度DSX处理胸肌卫星细胞前后，各卫星细胞内 Ca^{2+} 变化的曲线图；d,e,f: 处理前是指静息期细胞染色后的情况，处理后是指细胞内钙离子浓度最大时的情况。

a,b,c: graph of Ca^{2+} content in the satellite cell from breast muscle before and after DSX treatment; d,e,f: the color of before treatment is the satellite cell at stillness; the color of after treatment is Ca^{2+} content in the satellite cell at the highest level.

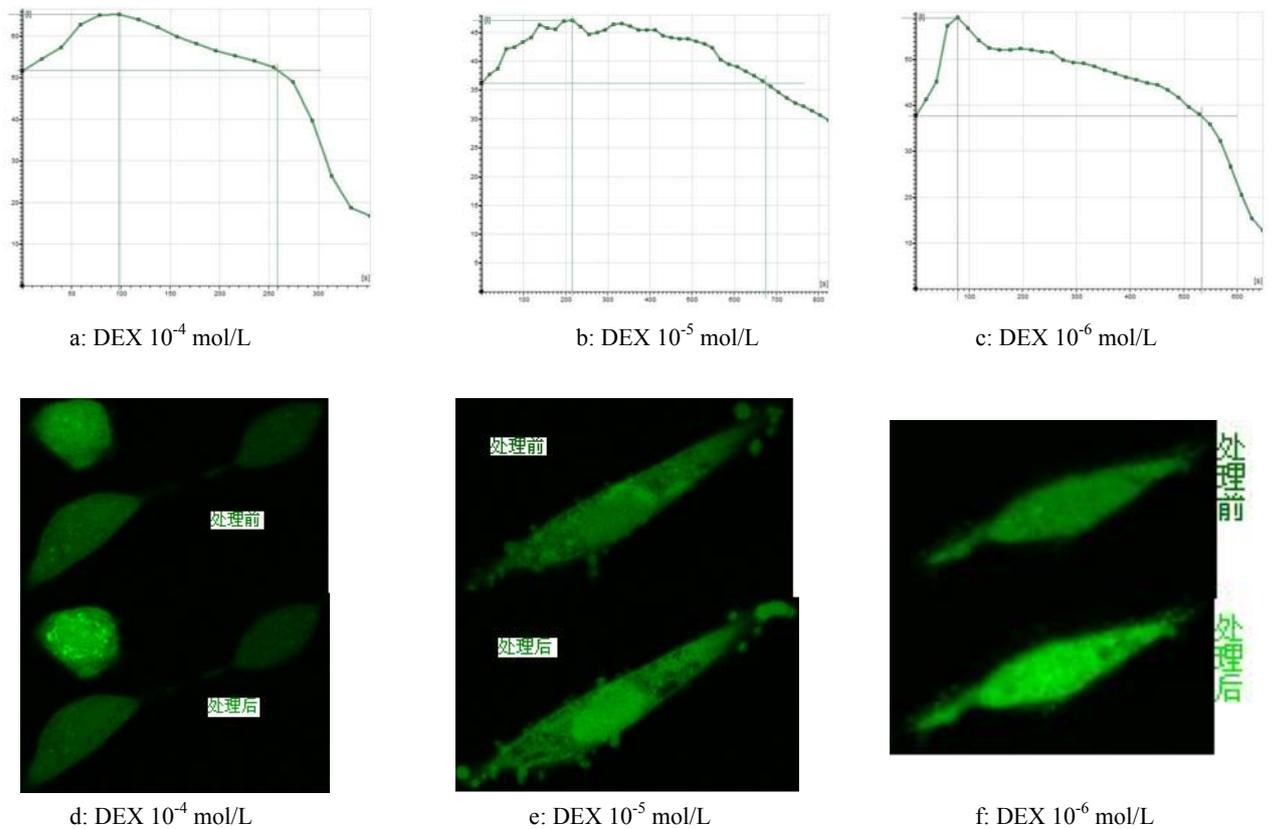
图 5-1 不同浓度DSX处理对胸肌卫星细胞内 Ca^{2+} 变化的影响

Fig. 5-1 Effect of deferent DSX treatment on Ca^{2+} content in the satellite cell from breast muscle

滴加DEX后，胸肌卫星细胞内 Ca^{2+} 迅速升高。 10^{-4} mol/L组，细胞经过2个缓慢升高（ $2 \times 19.563s$ ）后迅速达到了最高峰，5-1a中，观察了4个细胞的细胞内 Ca^{2+} 浓度变化曲线，曲线的趋势一样，均经过39.126s后，第58.699s达到最高（5-1d,相对值120-183），随后有一个平台期（约100s），然后经过一个反复后逐渐降低，均在500s左右降到与未滴加DEX时的细胞内 Ca^{2+} 浓度相当，随后继续

降低；10⁻⁵mol/L组（4-7b），细胞内Ca²⁺经过3个扫描间隔的直线增加后，于100s达到最高（4-7e，相对值88），随后逐渐缓慢降低，于约360s降到了未滴加DEX时的细胞内Ca²⁺浓度，与10⁻⁴处理组相比，细胞内钙离子浓度在处理后的升高和降低，均变得比较缓慢；10⁻⁶mol/L组（4-7c），观察了两个细胞，细胞内Ca²⁺经过8个扫描间隔的直线增加后，于160s达到最高（4-7f，相对值71.4），随后逐渐缓慢降低，于约413s降到了未滴加DEX时的细胞内Ca²⁺浓度，与10⁻⁴和10⁻⁵处理组相比，细胞内钙离子浓度在处理后的升高和降低，均变得比较缓慢。随着DEX浓度的降低，细胞内Ca²⁺达到最大值的时间变长，最大细胞内相对Ca²⁺浓度降低。细胞内Ca²⁺浓度越高，则降低到静息期的浓度需要的时间越长。

5.2.2 添加不同浓度DEX腿肌卫星细胞内Ca²⁺的变化



a,b,c: 不同浓度DEX处理腿肌卫星细胞前后，各卫星细胞内Ca²⁺变化的曲线图；d,e,f: 处理前是指静息期细胞染色后的情况，处理后是指细胞内钙离子浓度最大时的情况。

a,b,c: Graph of Ca²⁺ content in the satellite cell from thigh muscle before and after DEX treatment; d,e,f: the color of before treatment is the satellite cell at stillness; the color of after treatment is Ca²⁺ content in the satellite cell at the highest level.

图 5-2 不同浓度DEX处理对腿肌卫星细胞内Ca²⁺变化的影响

Fig. 5-2 Effect of different DEX treatment on Ca²⁺ content in the satellite cell from thigh muscle

注入DEX后，腿肌卫星细胞内Ca²⁺迅速升高。10⁻⁴mol/L组，处理后细胞内Ca²⁺经过5个缓慢升高（5×19.563s）后迅速达到了最高峰（5-2d,相对值66），图5-2a中，观察了1个细胞的细胞内Ca²⁺浓度变化曲线，然后经过逐渐降低，在260s左右降到与未滴加DEX时的细胞内Ca²⁺浓度相当，随后继续降低；10⁻⁵mol/L组（5-2b），细胞内Ca²⁺经过7个扫描间隔的增加后，又经历了4个反复，于216s达到最高（4-8e,相对值48），随后逐渐缓慢降低，于约675s降到了未滴加DEX时的细胞内Ca²⁺

浓度, 与 10^{-4} 处理组相比, 细胞内钙离子浓度在处理后的升高和降低, 均变得比较缓慢; 10^{-6} mol/L 组 (5-2c), 细胞内 Ca^{2+} 经过4个扫描间隔的直线增加后, 于80s达到最高 (5-2f, 相对值60), 随后逐渐缓慢降低, 于约533s降到了未滴加DEX时的细胞内 Ca^{2+} 浓度, 与 10^{-4} 和 10^{-5} 处理组相比, 细胞内钙离子浓度在处理后的升高和降低, 均变得比较缓慢。随着DEX浓度的降低, 细胞内 Ca^{2+} 达到最大值的时间变长, 最大细胞内相对 Ca^{2+} 浓度降低。细胞内 Ca^{2+} 浓度越高, 则降低到静息期的浓度需要的时间越长。

5.2.3 不同浓度DEX对胸肌和腿肌卫星细胞内 Ca^{2+} 变化的区别

胸肌卫星细胞内 Ca^{2+} 浓度, 在不同的DEX处理组, 均大于腿肌。 10^{-4} DEX处理组, 胸肌相对值为145, 而腿肌卫星细胞仅为66; 10^{-5} DEX处理组, 胸肌相对值为88, 而腿肌卫星细胞仅为48; 10^{-6} DEX处理组, 胸肌相对值为63, 而腿肌卫星细胞仅为60。随着DEX处理浓度的降低, 两种来源的肌肉卫星细胞内 Ca^{2+} 浓度的最大值相差越来越小 (表5-1)。

随着DEX浓度的降低, 两种来源的卫星细胞内钙离子浓度的最大值逐渐降低, 达到最大值需要的时间不断延长, 细胞内钙离子浓度恢复到静止状态需要的时间延长, 这在胸肌卫星细胞表现得更为明显; 腿肌卫星细胞可能是激素注射的原因, 其曲线出现了多次反复, 最终影响了最大值的表现。

表 5-1 DEX处理后胸肌和腿肌卫星细胞内钙离子变化的参数比较

Table 5-1 Effect of DEX on Ca^{2+} content in the satellite cells from breast and thigh muscle

细胞来源 Source of SCs	DEX 处理, DEX treatment, mol/L	10^{-4}				10^{-5}		10^{-6}	
	细胞, Cell number	1	2	3	4	1	1	2	
胸肌 Breast muscle	相对最大值 Relative max value	185	142	130	120	88	72	63	
	达到最大值的时间 Time needed to reach the max value, s	59	59	59	59	101	158	158	
	达与初始值相同的时间Time needed to reach the stillness level ,s	496	578	565	530	366	412	606	
腿肌 Thigh muscle	相对最大值 Relative max value	66				48		60	
	达到最大值的时间 Time needed to reach the max value, s	98				216		80	
	达与初始值相同的时间Time needed to reach the stillness level, s	260				675		533	

5.3 讨论

细胞通过位于胞膜或胞内的受体, 感受细胞外信息分子的刺激, 经复杂的细胞内信号转导系统的转换而影响其生物学功能, 这一过程称为细胞信号转导 (唐量等, 2004)。阐明肌肉细胞中信号转导的机理, 认清动物应激期间, 肌肉细胞的增殖、分化、代谢及凋亡等诸方面的表现和调控方式, 进而理解肌肉生长、发育和代谢的调控机理。以细胞 Ca^{2+} 浓度变化为基础的 Ca^{2+} 信号系统, 所参与的生理过程非常广泛。内质网是 Ca^{2+} 的贮存部位, 细胞受到外来化学物质刺激时, 细胞膜上的 Ca^{2+} 通道开放, 使胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 通过CaM使得NOS (一氧化氮和酶) 激活产生NO, 肌细胞中, NO的靶酶是鸟苷酸环化酶 (Guanylate Cyclase), NO与其结合后被活化, 继而产生肌肉收缩, 发生肌肉代谢 (郭艳林和孙大业, 1995)。

马晓冬等(1999)用荧光探针Fluo-3/AM测定了巨噬细胞内 Ca^{2+} 的变化,DSX(1.5 μm)处理100s后细胞内 Ca^{2+} 达到最高,与本研究相似,但是该研究中900s后 Ca^{2+} 仍未见明显降低,可能是细胞不同而至。本研究胸肌卫星细胞对DSX处理的反应比较整齐,可作为进一步研究应激对肌肉品质影响的模型来应用。

细胞内游离 Ca^{2+} 是其应激的指示剂,细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}]_i$)的平衡主要由细胞内钙库释放和细胞外的钙内流决定。Masato等(1998)研究认为氧化应激会增加细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度,而抗氧化剂Bcl-2的表达,会增加线粒体中 Ca^{2+} 的储存量,降低氧化应激导致的细胞内 Ca^{2+} 的浓度的增加。应激时细胞内钙离子释放是细胞内游离 Ca^{2+} 的主要来源,其机制也是研究比较透彻的(李和旺等,1995)。细胞内钙库释放的调节有两个最经典的通道,三磷酸肌醇(IP_3)信号调节通路和雷诺定(ryanodine)信号调节通路。因此需要进一步研究肌肉细胞内钙离子释放通道,以便于进一步研究应激对肌肉品质的影响。

肌肉细胞内钙离子升高,由于胞浆内游离钙过多,随之进入线粒体,损伤氧化磷酸化过程,造成ATP合成不足(Wang和Duff,1997);另一方面肌纤维、肌浆网和线粒体中钙依赖型ATP酶的超常活动,造成ATP消耗过多,最终造成肌肉中高能磷酸化合物(ATP、CP)的储存严重耗竭,造成肌肉细胞结构破坏(Orzechowski,2003)。肌细胞内钙离子浓度超负荷,能促进膜脂质过氧化和自由基的形成,这在试验5.2中已经得到证实,从而通过超氧化作用攻击细胞膜、细胞器及蛋白分子等,造成细胞凋亡或死亡。

严政和赵彦(2005)研究认为,加入DEX后,细胞内钙离子浓度升高,抑制了细胞增殖,在加入支链氨基酸和 β -羟基- β -甲基丁酸盐复合物可以使得钙离子浓度降低,增加骨骼肌细胞的存活率。因此说细胞内钙离子可以作为筛选良好饲料添加剂的一个指示指标。

本研究中腿肌SCs的 10^{-5} DSX处理组中细胞内 Ca^{2+} 浓度忽高忽低,可能是因为操作时向培养皿中注入DSX时,距离细胞较远,DSX在培养皿中分布较慢所致,这从另一侧面充分显示了细胞内钙离子对细胞外的GC反应非常敏感,因此可用这种方法建立模型研究减少应激对肌肉细胞影响的添加剂。

本研究提示我们血清GC浓度增加时,随着达到肌肉细胞环境GC的增加,肌肉细胞内钙离子浓度会增加,且随着血清GC的增加,肌肉细胞内钙离子会增加,从而通过细胞内钙离子信号转导系统引发肌肉细胞的代谢紊乱和凋亡,前面动物试验研究表明,通过肌肉注射或者饮水中GC处理,肉仔鸡血清中的皮质酮浓度增加明显,肉质形状变差,结合本研究的结论,钙离子信号转导系统在应激期间引发肌肉代谢紊乱中期到了重要作用。该信号通路的研究,可有助于研究应激干预方式和添加剂,为进一步应用于生产实践奠定基础。

5.4 小结

用不同浓度DEX处理胸肌和腿肌SCs,细胞内游离钙离子浓度均会发生相应的变化,随着浓度的降低,两种来源的SCs内钙离子浓度的最大值逐渐降低,达到最大值需要的时间不断延长,细胞内钙离子浓度恢复到静止状态需要的时间延长,这在胸肌SCs表现得更为明显。动物应激期间,通过细胞外DEX作用于肌肉细胞内钙离子信号转导系统,引起肌肉细胞发生一系列生理生化反应,最终影响肉质,该通路可能是一种信号转导机制。

第六章 主要结论和有待进一步研究的问题

6.1 主要结论

本论文通过4个系列试验系统研究了建立肉仔鸡氧化激素模型的可行性。模拟了急性应激(激素注射)、慢性应激(激素饮水),以及直接氧化应激(激素直接处理细胞)三种模型,研究了模拟应激条件下肉仔鸡肉品质、生产性能和肌肉组成、消化能力和免疫功能的变化,以及肌肉卫星细胞活性变化等。得出以下主要结论:

1、本试验条件下以 ACTH 6 IU/kg BW 或 DEX 6mg/kg BW 的剂量,在 40 日龄注射后 8h 产生氧化应激,对肉质等指标影响明显;40d,处理后 8~12h 应激模型产生组织氧化应激;从血液氧化应激指标来看,以 40d,激素注射后 8h 为适宜。急性氧化应激模型:40d 肉仔鸡肌肉注射 DEX (6mg/kg BW) 和 ACTH (6 IU/kg BW) 12±4h。

2、20 和 30mg/L 可的松饮水,第 3~4d 即影响到了日粮 CP、EE 和 Ash 的消化率,10d 时血液 TP、尿酸含量升高。20mg/L 6d 影响了肉品的滴水损失、营养(CP、EE 和水分)组成;30mg/L 3d 即可引起肉仔鸡的血液激素和抗氧化指标的明显变化;20 和 30mg/L 可的松饮水 1~3d 对心脏和肝脏过氧化状态有显著影响,而后有一个适应过程。总之,20~30mg/L 可的松饮水,3d 即可引起明显的氧化应激现象,可作为慢性氧化应激模型开展研究。

3、研究建立了 DEX 浓度对培养基中的活细胞数、细胞台盼蓝蓝染率、胸肌和腿肌 SCs 相对存活率、肌细胞 MDA 相对生成量以及 NBT 被还原量(吸光度值)的影响,并建立了肌肉卫星细胞的氧化应激模型:0-0.625mol/L DEX 培养 1d。

4、不同浓度 DEX 处理胸肌和腿肌 SCs,细胞内游离 Ca^{2+} 浓度均会发生相应变化,随着浓度的降低,两种来源的 SCs 内钙离子浓度的最大值逐渐降低,达到最大值需要的时间不断延长,细胞内钙离子浓度恢复到静止状态需要的时间延长,这在胸肌 SCs 表现得更为明显。

另外,论文研究还表明与直接屠宰相比,致晕后屠宰可改善肉质;建立了肉仔鸡腿和胸肌 SCs 的分离、纯化、培养、鉴定、冻存和复苏的方法。以上结果表明:三种氧化应激模型均能引起肉仔鸡肉质、激素或细胞活性等的变化,可用于实际生产研究应激对肉仔鸡的影响及其机理。

6.2 研究的创新点

1、通过外源激素导入(注射、口服)的方法,建立慢性和急性肉仔鸡氧化应激模型;

2、建立肉鸡的肌肉卫星细胞的提取、培养等方法,研究 DEX 对肌细胞活性的影响,建立了肌肉细胞的氧化应激模型,并用 VC 进行了验证。研究了 DEX 对肌细胞内钙离子浓度的动态变化。

4、从抗氧化添加剂筛选和研究 GC 对肉质影响的机理两方面研究了氧化应激模型及其应用。

6.3 有待进一步研究的问题

1、致晕方式对肉仔鸡肉质有一定的影响,其影响机理需进一步探讨。

2、应激影响肌肉卫星细胞的机理,信号转导通路需要进一步研究。

3、氧化应激的具体判定指标,还需要进一步研究。

参考文献

1. 白兆鹏,孙文志,吴琼,刘海军.硫辛酸对热应激下产蛋鸡生产性能的影响.饲料博览,2004,7:1-4.
2. 陈从波,姚启盛,王卫民,王晓康,陈立新.骨骼肌卫星细胞纯化及培养的实验研究.实用医学杂志,2006,22(7):760-762.
3. 陈润生,1995.猪选种中高新技术研究进展.养猪,1:22-25.
4. 陈思峰,吴中立.体液和组织磷脂酶A₂简便快速测定法.第二军医大学学报,1989,10(3):215.
5. 陈伟华,马海田.动物应激中的糖皮质激素辨析.畜牧与兽医,2006,8(38):11.
6. 陈媛,周玫,齐凤菊.某些心脏病患者血浆丙二醛含量和血浆红细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定.中华医学杂志,1987,67(7):402.
7. 陈志阳,王国华,杨敏,刘新平,药立波.一种简便快速检测淋巴细胞增殖的方法.中国生化药物杂志,2000,21(5):245-247.
8. 陈岩,王琨,朱大海.鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养、鉴定.遗传,2006,28(3):257-260.
9. 陈忠,王婷,黄丽明,方代南.GABA对热应激仔鸡的影响.动物学研究,2002,23(4):341-344.
10. 丛杰,方允中.应激反应引起过氧化损伤.自由基生命学进展,1993,1:28-34.
11. 戴剑,薛松.维生素C的功能.中国饲料,1997,11:19-20.
12. 杜荣,顾宪红.环境温度和日粮能量水平对鸡浆皮质酮水平的影响.动物营养代谢研究论文集,北京:北京农业大学出版社,1995,6181-184.
13. 鄂征.组织培养技术(修订本).北京:人民卫生出版社,1992:107-185.
14. 范石军,韩友文,李德发,胡松,李树继.雏鸡高温应激与超氧化处理对其肝脏丙二醛和谷胱甘肽含量及活性的影响.中国饲料,2001,10:11-13.
15. 方允中,郑荣梁,主编.自由基生物学的理论与应用.北京:科学出版社,2002,135-137.
16. 扶国才,尤明珍.肉质的营养调控.肉品卫生,2002,1:13-16.
17. 傅伟龙,高增兵,朱晓彤,蒋宗勇,林映才,余德谦.维生素E和C对高温环境中肉鸡生长及血液甲状腺激素浓度的影响.华南农业大学学报,2000,21(4):61-65.
18. 高树新,王国赋,朱玲.维生素E和维生素C对热应激时肉仔鸡某些血液生化指标的影响.内蒙古畜牧科学,2002,6:4-6.
19. 顾宪红,王新谋.高温对蛋鸡生产性能和血浆皮质醇、甲状腺素、孕酮水平的影响.畜牧兽医学报,1995,26(2):109-115.
20. 郭艳林,孙大业.细胞信号系统研究进展.生物化学与生物物理进展,1995,22(3):217-224.
21. 哈苏荣,蒋金书,杜小燕,朱蓓蕾.复方丁氨丙磷溶液的抗冷应激作用及其机理研究.动物医学进展,2005,26(3):59-62.
22. 韩瑞丽. β -胡萝卜素和VE对富含n-3多不饱和脂肪酸鸡肉的保护作用和肉质的影响[硕士学位论文],2003.泰安:山东农业大学.
23. 洪奇华,阮晖,詹勇,徐仲钧.糖萜素饲料添加剂抗应激研究.饲料博览,1999,12:22-23.
24. 胡兰,孙长勉,刘梅.维生素E对肉仔鸡抗热应激的影响.沈阳农业大学学报,2001,32(2):117-119.
25. 胡秀芳,毛建姝,蒋丽萍,杨贤强.茶多酚与其它抗氧化剂的协同作用.茶叶,2000,26(2):66-69.
26. 黄昌澍.鸡的环境生理.南京农学院学报,1983,2:94-105.
27. 黄志毅,安立龙,郑枢,邵少贞,邓素军,许英梅.甜菜碱对热应激肉鸡生产性能的影响.家畜生态,2004,25(1):25-30.

28. 姜礼胜,蒋宗勇,林映才,吴维辉,郑黎.高温条件下复合抗应激剂对肉鸡的影响.动物营养学报,1999,11(4),39-43
29. 景栋林.以免疫反应作为应激反应的指标.国外畜牧科技,1986,1:50-54.
30. 李德发.营养调控肉品质量的研究现状与发展趋势.见李德法主编.动物营养研究进展.北京:中国农业科技出版社,2004,7-14.
31. 李康然.鸡的应激反应及防制.广西畜牧兽医,1997,13(2):50-54.
32. 李和旺,韩启德.细胞外Ca²⁺内流入胞质的机制.生理科学进展,1996,27(4):307-312.
33. 李和旺,王宪,韩启德.细胞内贮存钙释放的机制.生理科学进展,1995:26(3):209-212.
34. 李静,乔健,高铭宇,范春艳,欧德渊,刘文菊.40℃持续热应激对肉鸡股动脉压的影响.中国农业大学学报,2004,9(3):41-44.
35. 李士泽,杨焕民,袁学军,杨玉英,靳锐.冷应激对健康雏鸡某些内分泌活动的影响.应用与环境生物学报,1998,4(2):167-169.
36. 李绍钰.热应激对肉仔鸡生产性能和产品品质的影响及核黄素抗应激效果的研究.[博士学位论文],1999.北京:中国农业科学院研究生院.
37. 李绍钰,张敏红,张子仪,魏凤仙.维生素E、C、B₂对高温环境下肉鸡生产性能及脂质过氧化水平的影响.河南农业科学,2000,1:28-32.
38. 李有业编译.有效预防鸡热应激.中国家禽,2003,25(15):36-37.
39. 林忠宁,董胜璋,董书芸,卢次勇,余贵英.MTT法检测T淋巴细胞增殖功能的方法学探讨与应用.中国卫生检验杂志,2000,10(1):8-10.
40. 梁礼成,刘健华,金久善,赵继勋,何诚.ACTH和地塞米松对鸡血浆纤维连接蛋白及血清生化指标的影响.中国农业大学学报,2000,5(3):106-110.
41. 林海,杜荣.热应激对肉鸡组织过氧化状态的影响.动物营养学报,2001,13(2):30-32.
42. 刘传康.糖皮质激素局部注射治疗婴幼儿先天性写景机理的研究.[博士学位论文],2003.重庆:重庆医科大学.
43. 刘凤华.高温对蛋鸡血液生理生化及生产性能的影响.中国畜牧杂志,1997,33(5):23-25
44. 刘国艳,柴春彦,康世良.氟中毒时鸡体内总抗氧化能力的变化.上海畜牧兽医通讯,2001,4:6-7
45. 刘健华,梁礼成,金久善,芦洪奎.高温对肉鸡血浆纤维连接蛋白及血清生化指标的影响.中国兽医学报,2000,20(6):591-593
46. 刘瑞生.肉鸡热应激研究进展.江西畜牧兽医杂志,2001,3:5-6.
47. 刘思当,宁章勇,谭勋,王树迎.2003.实验性热应激对肉仔鸡免疫器官的影响.中国兽医学报,23(3):281-283.
48. 刘铀,林红英,罗东君,刘艳芬.热应激对肉鸡血液生化指标及内分泌机能的影响.湛江海洋大学学报,1999b,19(1):61-64.
49. 刘铀,刘艳芬,林红英,罗东君.维生素E防治肉鸡热应激机理的初步研究.中国家禽,1999a,21(6):6-10.
50. 马晓冬,朱晓亮,赵清,张瑾,张飒,雷国华,黄行许,鲍永耀.荧光探针Fluo-3/AM和FuraRed测量单细胞中比率钙.中国医学物理学杂志,1999,16(3):3-8.
51. 苗燕,武书庚,齐广海,张海军.禽肉色泽影响因素研究进展.中国饲料,2006,4:8-10.
52. 苗燕,齐广海,武书庚,张海军.急性热应激条件下不同脂肪类型对肌肉品质及过氧化状态的影响.冯定远主编《动物营养与饲料研究-第五届全国饲料营养学术研讨会论文集》中国农业科技出

- 版社,2006,北京,p83.
53. 闵庆文,肖建雄,邵樟兴.温湿条件对蛋鸡生产的影响及热应激指标.南京气象学院学报,1994,17(3):367-372.
 54. 邵素霞,张雷,赵春芳,郑力芬,闫蕴力,马洪骏.新生大鼠骨骼肌卫星细胞的原代培养及标记方法.基础医学与临床,2004,24(1)79-82.
 55. 宋志宏,高应.沙棘油和维生素E对冷暴露大鼠脂质过氧化物作用的影响.营养学报,1995,17:27-31.
 56. 隋绍娟.应激与能量类型对肉鸡肉品质的影响[D].山东农业大学:2005.
 57. 孙永林.白腐菌降解木素纤维过程中清除自由基物质产生[D].华中科技大学硕士学位论文
 58. 孙长勉,栾新红,曹中赞,郑雅文,胡建民.维生素E对热应激条件下肉鸡甲状腺激素分泌的影响.沈阳农业大学学报,2002,33(5):360-362.
 59. 孙玉民等.畜禽肉品学.山东科技出版社1993.
 60. 唐量,熊正英,张英起.运动与骨骼肌细胞信号转导机制的研究进展.中国运动医学杂志,2004,23(5):584-590.
 61. 王启军,卢庆萍,张宏福.高温环境对北京油鸡生产性能及脂肪沉积的影响.广东饲料,2006,15(6):39-39.
 62. 王启军,张宏福,卢庆萍,王永军.热应激对肉仔鸡脂肪沉积及血液生化指标的影响.安徽农业科学,2006,34(9):1886-1887,1889.
 63. 王小龙,高得仪,陈万芳,等.兽医临床病理学.北京:中国农业出版社,1995.114-148.
 64. 王新谋.家畜应激与家畜生产.畜牧兽医杂志,1985(3):41-45.
 65. 王学瑞,王毓洪,刘奔,苏桂新,秦毅,高原,郑伦,范金爽.慢性应激不同方式对大鼠血清皮质酮的影响.中国应用生理学杂志,2006,22(4): 449-450.
 66. 文杰,林济华,高宇清.维生素C对热应激状态下肉仔鸡生产性能及维生素C合成能力的影响.畜牧兽医学报,2000,31(6):497-502.
 67. 武书庚,张海军,齐广海.家禽应激模型研究进展.王恬主编《饲料营养研究进展(2006年版)》中国农业科技出版社,北京,p217-223.
 68. 吴东,李吕木,詹凯.不同抗热应激剂对肉鸡生产性能及生化指标影响.中国畜牧杂志,2003,39(3):33-34.
 69. 吴孝兵.早期适应饲养对肉仔鸡后期抗热应激能力的影响.中国家禽,2003,25(2):45.
 70. 夏东,李如治.NH₄Cl和NaHCO₃对肉用仔鸡慢性热应激的影响.畜牧与兽医,1999,31(5):5-6.
 71. 向荣,王鼎年.过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进.生物化学与生物物理进展,1990,17(3):241-242.
 72. 效梅,安立龙,许英梅,王均良,熊杰,熊立根,王顺祥.中药添加剂对热应激肉仔鸡热调节能力影响的研究.甘肃畜牧兽医,2003,33(3):13-15.
 73. 谢敏豪.专项训练运动能力与血激素水平的关系.中国运动医学,1993,12(1):7-10.
 74. 薛庆善.体外培养的原理与技术.北京:科学出版社,2001.643-655.
 75. 严政,赵彦.运动训练后皮质醇激素变化及对骨骼肌细胞的影响.中国临床康复,2005,9(48):149-152.
 76. 杨国宇,惠参军,崔平安,王月影,朱河水.日粮中添加 α -硫辛酸对肉鸡脂肪代谢的影响.兽药与饲料添加剂,2003,3:1-2.

77. 杨宏宇,林文娟.白细胞介素-1在病态行为中的作用及其机制.心理科学进展,2004,12(2):290-295.
78. 杨明,李庆芬.哺乳动物冷应激的主要神经内分泌反应.动物学研究,2002,23(4):335-340.
79. 杨蕴堂.鸡应激的诊断方法综述.国外畜牧科技,1991,18(2):22-24.
80. 叶应妩,王毓三.全国临床检验操作规程.南京:东南大学出版社,1991,186-209.
81. 应如海,宁康健,钟德山.安定对肉仔鸡生长性能及抗热应激能力的影响.安徽农业技术师范学院学报,1998,12(4):23-25.
82. 张宝,周玫,陈媛.细胞外超氧化物歧化酶.医学综述,2000,6(8):340-341
83. 张乐萍,王述柏,单虎,马端忠,侯世忠.抗应激添加剂对热应激肉仔鸡甲状腺和肾上腺组织结构的影响.饲料研究,1998,5:1-3.
84. 张丽英主编.饲料分析及饲料质量检测技术(第2版)[M].北京:中国农业大学出版社,2003.
85. 张伟力,Huiskes JH.季节和屠宰日龄对商品猪胴体和肉质性状的影响.中国畜牧杂志,1995,31(6),12-14.
86. 张秀明,严丽娟,柴建开,周伟强,王丽霞.改良硫代巴比妥酸荧光法测定血清过氧化脂质.生物化学与生物物理进展,1996,23(2):175-179.
87. 赵保路.氧自由基和天然抗氧化剂.北京:科学出版社,1999:11-13.
88. 赵恩军,华修国,张斌,李华威,谢爱纯.冷热刺激对犬血清皮质醇、促肾上腺皮质激素及血液生理指标的影响.畜牧兽医学报,2003,34(5):457-460.
89. 赵健容,夏东,李如治.冷应激对蛋鸡生理生化指标的影响.中国畜牧杂志,1998,34(6):6-8.
90. 赵克然,杨毅军,曹道俊.氧自由基与临床[M].北京:中国医药出版社,2000, p8-19
91. 郑建仙.功能性食品[M].北京:中国轻工出版社,1995,344-378.
92. 郑君杰,武书庚,齐广海.鸡蛋中的脂类过氧化作用与保护.饲料研究,1999,11:7-8.
93. 钟琳,熊英,姚裕家.缺氧缺血大鼠脑组织GLUT-1表达及地塞米松对其表达的影响.四川医学 2007,28(2):138-140.
94. 周杰,骆先虎,檀其梅.高温对肉仔鸡生产性能和某些血清生化指标的影响.畜牧与兽医, 1997,19(2):57-59.
95. 朱海宏,赵明,耿排力,吴洪福.低氧应激对大鼠体内ACTH含量的影响.中国应用生理学杂志,2005,21(1):72-73.
96. 朱明霞,马洪.家禽应激反应的研究进展.畜牧兽医科技信息,2005,9:17-19.
97. Andrea M, Ward Ronald, Peterson A. The effect of heat exposure on plasma uric acid, lactate dehydrogenase, chloride, total protein and zinc of the broiler. *Poultry Science*, 1973, 52:1671-1673.
98. Aoyagi Y, Ohnishi T, Itoh S, T Nakaya. Effect of heat stress and L-ascorbic acid-2-pHospHate magnesium on plasma and liver thiobarbituric acid reactive substance concentration and on liver protein carbonyl concentration in chicks. *Japanese Poultry Science*, 1997, 34(1):63-66.
99. Apontoweil P, Berends W. Glutathione biosynthesis in Escherichia coli K 12. Properties of the enzymes and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 399(1): 1-9.
100. Asghar A, Gray JT, Booren AM, Gomah EA, Abouziied MM, Mille JM, Buckley DJ. Effect of supranutritional dietary vitamin E level on subcellular deposition of a-tocopherol in the muscle and on pork quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991, 57(1):31-41.
101. Asghar A, Gray JT, Buckley DJ, Pearson AM, Booren AM. Perspective in warmed-over flavour. *Food Technology*, 1988, 42(6):102.

102. Auclair D, Garrel DR, Chaouki Zerouala A, Ferland LH. Activation of the ubiquity pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of Glucocorticoid, *The American Journal of Physiology*, 1997, 272:C1007–C1016.
103. Bachs O, Agell N, Carafoli E. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992, 1113(2):259–270.
104. Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid Peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 17:105-115
105. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *The FASEBJ Journal*, 2000, 14(2):312-318.
106. Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship oaring, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews*, 2002, 1397-1411.
107. Baroffio Anne, Marie-Luce Bochaton-Pialla, Giulio Gabbian, Charles R Bader. Heterogeneity in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation*, 1995, 59: 259-268.
108. Barton-Gade P. Meat quality. U: Pig Production. c10. MR Taverner and AC Dunkin (ed.). Elsevier, Amsterdam. Lausanne. New York. Oxford .Shannon. Tokyo, str.1996. 17-39.
109. Ben Nathan D, Heller ED, Perek M. The effect of short heat stress upon leukocyte count, plasma corticosterone level, plasma and leukocyte ascorbic acid content. *British Poultry Science*. 1976,17:481-485.
110. Beuving G, Jones RB, Blokhuis HJ. Adrenocortical and heterophil/lymphocyte responses to challenge in hens showing short or long tonic immobility reactions. *British Poultry Science*.1989, 30(1):175-84.
111. Bischoff R. The Satellite and Stem Cells in Muscle Regeneration. In Engle AG, Franzini-Armstrong C, 3rd ed. Mycology. New York: McGraw-Hill, 2004, 66-86.
112. Bischoff R, Heintz C. Enhancement of skeletal muscle egeneration. *Developmental Dynamics*, 1994, 201(1):41-54.
113. Blalock EJ. A molecular basis for bi-directional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews*, 1989, 69:1-32.
114. Bogin E, Peh HC, Avidar Y, Israeli B, Kevkhaye E, Lombardi P, Cahaner A. Sex and genotype dependence on the effects of long tern high environmental temperatures on cellular enzyme activities from chicken organs. *Avian Pathol*, 1997, 26(25):511-524.
115. Boonstra R, Tinnikov AA. Increased corticosteroid binding capacity of plasma albumin but not of corticosteroid-binding globulin caused by ACTH-induced changes in free fatty acid concentrations in snowshoe hares and rabbits. *Journal Endocrinol*, 1998, 156(1):205-212.
116. Bornstein SR, Chrousos GP. Adrenocorticotropic (ACTH) and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs. *Clinic Endocrinol Metabolism*, 1999, 84(5): 1729-1736.
117. Brown KI, Brown DS, Meyer RK. Effect of surgical trauma, ACTH, and adrenal cortical hormones on electrolutes and gluconeogenesis in male chickens. *Am.J.Physiol*. 1958, 192:43-50.

118. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 1990, 120: 357-363
119. Byrnes WC, Clarkson PM, White JS, Hsieh SS, Frykman PN, Maughan RJ. Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *Journal of Applied Physiology*, 1985, 59:710-715.
120. Cai L, Sacoh M, Cherian MG. Metallothioneine in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*, 1999, 132(3):85-98.
121. Cassens RG. Muscle biochemistry: The importance of myofiber type. *Food Microstructure*, 1984, 14 (3):1-7.
122. Chamblee TN, Morgan GW, Schultz CD. Effects of following short-term deprivation of feed or water, or both on selected physiological parameters for broiler chickens. *Poultry Science*, 1989, 68:1619-1623.
123. Cillis S, Crabtree GR, Smith KA. Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production 1. The effects of nitro-induced Lymphocyte proliferation. *Journal of Immunology*, 1979, 123:1624-1631.
124. ClapHam DE. Calcium signaling. *Cell*, 1995, 80:259-268.
125. Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise induced muscle damage and rapid adaptation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1992, 24:512-520.
126. Collins A, Duthie S, Ross M. Micronutrients and oxidative stress in the etiology of cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1994, 53:67-75.
127. Dahlmann B, Rutschmann M, Reinauer H. Effect of starvation or treatment with corticosterone on the amount of easily releasable myofilaments in rat skeletal muscles. *The Biochemical Journal*, 1986. 234:659-664.
128. Dallman MF, Darlington DN, Suemaru S, Cascio CS, Levin N. Corticosteroids in homeostasis. *Acta Physiol Scand Suppl.*, 1989, 136 (583): 27-34.
129. David PT, Gerard MJ. The use of endogenous antioxidants to improve photo protection. *The Journal of Photochemistry and Photobiology*, 1997, 41(B):1-10.
130. Davis GS, Siopes TD. Plasma corticosterone response of turkeys to adrenocorticotrophic hormone: age, dose, and route of administration effects. *Poultry Science*, 1987, 66:1727.
131. Davision TC, Freeman BM, Rea J. Effects of continuous treatment with synthetic ACTH¹⁻²⁴ or corticosterone on immature Gallus domestics. *General and comparative endocrinology*. 1985, 59(3):416-423.
132. Debut M, Berri C, Baeza E, Sellier N, Arnould C, Guemene D, Jehl N, Boutten B, Jégo Y, Beaumont C, Le Bihan-Duval E. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. *Poultry Science*. 2003, 82(12):1829-1838.
133. Decuyper E, P Van As, S Van der Geyten, Darras V. Thyroid hormone availability and activity in avian species: A review. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005,29(1):63-77
134. Deyhim F, Teeter RG. Sodium and potassium chloride drinking water supplementation effects on acid-base balance and plasma corticosterone in broilers reared in thermoneutral and heat distressed environment. *Poultry Science*, 1991, 60:1583- 1586.

135. Dickson WM. Endocrinology, reproduction and lactation. In: Duke's Physiology of domestic animals. 1987, 790-791.
136. Diplock AT. Metabolic aspects of selenium action and toxicity. *CRC critical reviews in toxicology*, 1976, 4(3):271-289
137. Ebbeling CB, Clarkson PM. Exercise induced muscle damage and adaptation. *The American journal of sports medicine*, 1989, 7:207-234.
138. Etlinger JD, Zak R, Fischman DA. Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle, *The Journal of Cell Biology*, 1976, 68(1):123-141.
139. Fletcher DL. Relationship of breast meat color variation to muscle pH and texture. *Poultry Science*, 1995, 74 suppl. 120.
140. Fridovich I. Oxygen is toxic. *BioScience*, 1977, 22(7):462-466
141. Gray JI, Pearson AM. Rancidity and warmed-over flavour. *Advance Meat Research*, 1987, 3:221
142. Gentry JG, McGlone JJ, Miller MF, Blanton JR Tr. Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics. *Journal of Animal Sciences*, 2004, 82(2):209-217.
143. Geraert PA, Padilha JCF, Guillaumin S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: Growth performance, body composition and energy retention. *British Journal of Nutrition*, February 1996, 75(2):195-204.
144. Glick B. Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. *The Journal of Immunology*, 1967, 98:1076-1084.
145. Gopalakrishna R, Barsky SH. Quantization of tissue calpain activity after isolation by hydrophobic chromatography, *Analytical Biochemistry*, 1985, 148:413-423.
146. Gould NR, Siegel HS. Serum lipoproteins in chickens after administration of adrenocorticotropin or exposure to high temperature. *Poultry Science*, 1985, 64(3):567-74.
147. Gould NR, Siegel HS. Effects of corticotrophin and heat on corticosteroid-binding capacity and serum corticosteroid in White Rock chickens. *Poultry Science*, 64(1):144-8.
148. Griffin HD. Control of fat deposition. *World's Poultry Science*, 1988, 44(3):228 - 230.
149. Griffin HD, Whitehead CC. Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broiler: development and use of a simple assay for plasma very low density lipoprotein. *British Poultry Science*, 1982, 25:277-286.
150. Gutteridge TMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. 1994. pp143. Oxford University Press, Oxford, UK.
151. Hacina Ain Baziz, Geraert PA. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler. *Poultry Science*, 1996, 75:505-513.
152. Haggendal J, Jonsson L, Johansson G, Bjurström S, Carlsten J, Thoren-Tolling K. Catecholamine induce free radicals in myocardial cell necrosis on experimental stress in pigs. *Acta physiol scand*, 1987, 131: 447-452.
153. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology and Medicine, 1989, 2ed edn Oxford, UK Clarenton Press.
154. Hambrecht E, Eisse JJ, Newman DJ, Smits CH, Verstegen MW, den Hartog LA. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type

- composition. *Journal Animal Science*, 2005, 83(4):900-907.
155. Hayashi K, Kayali AG, Young VR. Synergism of triiodothyronine and corticosterone on muscle protein breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 883:106-111.
156. Hayashi K, Tada O, Higuchi K, Ohtsuka A, 2000. Effects of corticosterone on connectin content and protein breakdown in rat skeletal muscle. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(12):2686-2688.
157. Hepler PK. Calcium and mitosis. International review of cytology (Academic Press), 1992, 138: 239-268.
158. Hinrichsen RD. Calcium and calmodulin in the control of cellular behavior and motility. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1155:277-293.
159. Hocking PM. Assessment of pain during locomotion and the welfare of adult male turkeys with destructive cartilage loss of the hip joint. *British*, 1999, 40(1)30-34.
160. Hofmann K. What is quality? Definitions, measurement and evaluation of meat quality. *Meat Focus International*, 1994, 5:73-82
161. Howard CG. Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol Today*, 1994, 15:209-213.
162. Howliger MAR, Rose SP. Temperature and the Growth of Broiler. *World Poultry Science*, 1987, 43:228-237.
163. James M. Multiple concurrent stressors in chickens 1. Effect on weight gain, feed intake and behavior. *Poultry Science*, 1989, (68):501-509.
164. Jauregui CA, Regenstein JM, Baker RC. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture, A water-binding property of muscle foods. *Journal Food Science*, 1981, 46: 1271-1273.
165. Kannan G, Heath JL, Wabeck CJ, Mench JA. Shackling of broilers: effects on stress responses and breast meat quality. *British Poultry Science*, 1997a, 38(4):323-332.
166. Kannan G, Heath JL, Wabeck CJ, Souza MC, Howe JC, Mench JA. Effects of crating and transport on stress and meat quality characteristics in broilers. *Poultry Science*, 1997b, 76(3):523-529.
167. Kannan G, Heath JL, Wabeck CJ, Owens SL, Mench JA. Elevated plasma corticosterone concentrations influence the onset of rigor mortis and meat color in broilers. *Poultry Science*, 1998, 77:322-328.
168. Kang YJ. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proceed Society Exp Biol Med*, 1999, 222(3):263-273.
169. Kaur H, Hughes MN, Naughton P, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett*, 2003, 543(1-3):113-119.
170. Khansari DN, Murgu AJ, Faith RE. Effects of stress on the immune system. *Immunol Today*, 1990, 11:170-175.
171. Khayat Ali, Schwall Don. Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*, 1983, 7:130-140
172. Klont RE, Lambooy E. Influence of preslaughter muscle temperature on muscle metabolism and meat quality in anesthetized pigs of different halothane genotypes. *Journal of Animal Science*, 1995a, 73(1):96-107.
173. Klont RE, Lambooy E. Effects of preslaughter muscle exercise on muscle metabolism and meat

- quality studied in anesthetized pigs of different halothane genotypes. *Journal of Animal Science*, 1995b, 73(1):108-117.
174. Küchenmeister U, Nürnberg Karin, Fiedler Ilse, Gerda Kuhn, Gerd Nürnberg, Klaus Ender. Cell injury and meat quality of pig in the time period post mortem from two genotypes susceptible or resistant to malignant hyperthermia. *European Food Research and Technology*, 1999, 2:97-103.
175. Lauridsen C, Bertelsen G. Will supplementation of vitamin C to poultry feed improves the quality of poultry meat. *Meat Focus International*, 1996, 5(11):388-390.
176. Lawrie RA. The conversion of muscle to meat. *Meat Science*, 1998, 96-118.
177. Lawrie RA. Metabolic stress which affect muscle. *The physiology and Biochemistry of Muscle as Food*, 1966, 137-16.
178. Lillehoj HS, Kaspers B, Jenkins MC, Lillehoj EP. Avian interferon and interleukin-2: A macrophages as a result of tumbling stress. *American Journal of Pathology*, 1992, 78:57-62.
179. Lillie RG. Effect of environment and dietary energy on cage leghorn pullet performance. *Poultry Science*, 1976, 55:1238-1246.
180. Lin H, Sui SJ, Jiao HC, Buyse J, Decuypere E. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2006, 143:400-405.
181. Littin KE, Cockrem JF. Individual variation in corticosterone secretion in laying hens. *British Poultry Science*, 2001, 42: 536-546.
182. Machida K, R Ishibashi, T Hara, A Ohtsuka, K Hayashi, Effects of corticosterone on Ca^{2+} uptake and myofibrillar disassembly in primary muscle cell culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003, 67(2):244-249.
183. Mancuso C, Bonsignore A, Distasio E, Mordente A, Motterlini R. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(12):2355.
184. Mashaly MM, Webb ML, Youtz SL, Roush WB, Graves HB. Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. *Poultry Science*, 1984, 63:2271-2274.
185. Masato Ichimiya, Seung H, Chang, Hui Liu, Irene K Berezsky, Benjamin F Trump, Paul A Amstad. Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca^{2+} mobilization. *American Journal Physiol Cell Physiol*, 1998, 275(3): C832-C839.
186. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Journal Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9: 493-495.
187. Maxwell MH. Avian blood leukocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*. 1993, 49:34-43.
188. McCord JM, Friovich. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte. *Journal Biological Chemistry*. 1969, 244:6049-6055
189. McKeith FK, M Ellis, KD Miller, DS Sutton. The effect of RN genotype on pork quality. In: Proc. Recip. Meat Conf., Storrs, CN, 1998, 51:118-124.
190. Mitchell MA, Kettlewell PJ, Maxwell MH. Indicators of physiological stress in broiler chickens

- during road transportation. *Animal Welfare*, 1992, 1:91-103.
191. Mitchell MA, DA Sandercock. Possible mechanisms of heat stress induced myopathy in the domestic fowl. *Journal of physiology and biochemistry*, 1997, 53(1):75. (Abstr.).
192. Mitchell MA, Kettlewell PJ. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems. *Poultry Science*, 1998, 77:1803-1814.
193. Mikhailov VF, Mazurik VK, Burlakova EB. Signal function of the reactive oxygen species in regulatory networks of the cell reaction to damaging effects: contribution of radio sensitivity and genome in stability. *Radiats Biol Radioecol*, 2003, 41(3):5-18.
194. Minami ME, Kuraishi Y, Yamaguchi T, Nakai S, Hirai Y, Satoh M. Immobilization stress induced interleukin-1B mRNA in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 1991, 123: 254-256.
195. Mukai Kazuo, Hitoshi Morimoto, Yuji Okauchi, Shinichi Nagaoka. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipid*, 1993, 28 :753-756
196. Munk A, Guyre P, Holbrook N. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 1984, 5:25-44.
197. Munoz M, Cedeno R, Rodriguez J, van der Knaap WPW, Mialhe E, Bachere E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2000, 191: 89-107.
198. Nijdam E, Delezie E, Lambooi E, Nabuurs MJ, Decuypere E, Stegeman JA. Comparison of bruises and mortality, stress parameters and meat quality in manually and mechanically caught broilers. *Poultry Science*, 2005, 84(3):467-474.
199. Nosaka K, Clarkson PM. Variability in serum creatine kinase response after eccentric exercise of the elbow flexors. *The International Journal of Sports Medicine*, 1996, 17:120-127.
200. Odedra BR, Bates PC, Millward DJ. Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *The Biochemical Journal*, 1983, 214:617-627.
201. Orzechowski A, Jank M, Gajkowska B, Sadkowski T, Godlewskia MM. Delineation of signaling pathway leading to antioxidant-dependent inhibition of Dexamethasone-mediated muscle cell death. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2003, 24(1):33-53.
202. Owens CM, SR Mckee, NS Matthews, and AR Sams. The development of pale, oxidative meat in two genetic lines of turkeys subjected to heat stress and its prediction by halothane screening. *Poultry Science*, 2000, 79:430-435.
203. Owens CM, Sams AR. The influence of transportation on turkey meat quality. *Poultry Science*, 2000b, 79(8):1204-1207.
204. Post J, Rebel MJ, AAHM ter Huurne. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broilers chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poultry science*, 2003, 82:1313-1318.
205. Puvadolpirod S, Thaxton JP. model of physiological stress in chickens 1.Response parameters. *Poultry Science*, 2000, 79:363-369.
206. Puvadolpirod S, Thaxton JP. Model of physiological stress in chickens 2.Dosimetry of Adrenocorticotropin. *Poultry Science*, 2000, 79:370-376.
207. Puvadolpirod S, Thaxton JP. model of physiological stress in chickens 3.Temporal patterns of

- response. *Poultry Science*, 2000, 79:377-382.
208. Puvadolpirod S, Thaxton JP. Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. *Poultry Science*, 2000, 79(3):383-390.
209. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 142(5):1257-1267.
210. Rojas M, Rugeles MT. Differential modulation of apoptosis and necrosis by antioxidants in immunosuppressed human lymphocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, 15:180(2):67-73.
211. Realini CE, Duckett SK, Windham WR. Effect of vitamin C addition to ground beef from grass-fed or grain-fed sources on color and lipid stability and prediction of fatty acid composition by near-infrared reflectance analysis. *Meat Science*, 2004, 68(1):35-43.
212. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 1999, 20(1):45-53.
213. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 1994, 123: 213-257.
214. Siegel HS. Age and sex modification of responses to adrenocorticotropin in young chickens. 1. Changes in adrenal and lymphatic gland weights. *Poultry Science*, 1962a, 40:1263-1274
215. Siegel HS, Could NR. Corticosteroid binding to lymphocytes of various tissues in growth birds subjected to high temperature in young chickens. *Proceeding of World Poultry Science*, (Madrid), 1982, 14:453-463.
216. Siegel HS. Immunological responses as indicators of stress. *World Poult. Sci. J.* 1985, 41:36-44
217. Siegel HS. Gordon Memorial Lecture: Stress, strains and resistance. *British Poultry Science*, 1995, 36(1):3-22.
218. Siegel HS, Van Kampen M. Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. *British Poultry Science*, 1984, 25:477-485.
219. Simon J, Rosselin G. Effect of intermittent feeding on glucose insulin relationship in the chicken. *The Journal of Nutrition*, 1979, 109: 631-641.
220. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical Journal*, 1984, 222:1-15.
221. Smith RF and Dobson H. Effect of preslaughter experience on behaviour, plasma cortisol and muscle pH in farmed red deer. *The Veterinary Record*, 1990, 126(7):155-8.
222. Smith CJV. Blood glucose level in young chickens: The influence of Light regime. *Poultry Science*, 1972, 51:268-273.
223. Smith CJV, Bright-Taylor. Does a glucostatic mechanism for food intake control exist in chickens? *Poultry Science*, 1974, 53:1720-1724.
224. Steckler A, Sahgal A. The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognition behavior. *Behavior Brain Research*, 1995, 67: 165-199.
225. Stina Fjelkaer Modig, Tornberg E. Water distribution in porcine M. Longissimus dorsi in relation to sensory properties. *Meat Science*, 1986, (3): 213-231.
226. Subba Rao Glick. Effect of cold exposure on the immune response of chickens. *Poultry Science*,

- 1997, 56(4):992-996.
227. Sullivan DA, Vira CR. Sex hormone and glucocorticoid receptor in the bursa of Fabricius of immature chicks. *Journal of immunology*, 1979, 122:2617-2623.
228. Taillandier D, Arousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *The Biochemical Journal*, 1996, 316:65-72.
229. Tanaka, Ii K, Ichihara A, Waxman L, Goldberg AL. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261:15197-15203.
230. Teeter RG. Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks. *Poultry Science*, 1985, 64(6):1060-1064.
231. Tomas FM, Munro HN, Young VR. Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N taumethylhistidine. *The Biochemical Journal*, 1979, 178:139-146.
232. van der Westhuyzen DR, Matsumoto K, Etlinger JD. Easily releasable myofilaments from skeletal and cardiac muscles maintained in vitro. Role in myofibrillar assembly and turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(22):11791-11797.
233. Wakabayashi A, Nishi T, Mihranian M, Ito Y, Guilmette JE, Connolly JE. Experimental evaluation of hypothermic intermittent coronary perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997, 77(5):641-646
234. Wang L, Duff HJ. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circulation Research*, 1997, 81(2):120-127.
235. Webster C, Pavlath GK, Park DR, Walsh FS, Blau H. Isolation of human myoblasts with the fluorescence - activate cells sorter. *Experimental Cell Research*, 1988, 174(1):252.
236. Winer BJ, Statistical Principles in Experimental Design, edn 2. 1971 New York: McGraw-Hill Press.
237. Wood DF, Richards JF. Effect of some antemortem stressors on postmortem aspects of chicken broiler pectoralis muscle. *Poultry Science*, 1975, 54:528-531.
238. Wu SG, Miao Y, Zhang HJ, Qi GH. Effect of DEX treatment on Ca^{2+} content in the satellite cell from broiler muscle. *Poultry Sciences*, 2007, 86(1):75. (Abstr.).
239. Yoshioka G, N Imaeda, Y Torimoto, T Ohtani, K Hayashi. Influence of transport stress on serum cortisol and thyroid hormones in pigs with halothane gene. *Animal Science Journal*, 2004, 75:451-456.
240. Young JF, Rosenvold K, Stagsted J, Steffensen CL, Nielsen JH, Andersen HJ. Significance of preslaughter stress and different tissue PUFA levels on the oxidative status and stability of porcine muscle and meat. *Journal Agriculture Food Chemical*. 2003, 51(23):6877-6881.
241. Young JF, Karlsson AH, Henckel P. Water-holding capacity in chicken breast muscle is enhanced by pyruvate and reduced by creatine supplements. *Poultry Science*. 2004, 83(3):400-405.

附录 1 屠宰致晕方法对肉仔鸡肉质的影响

摘要: 选择 6 周龄健康 AA 肉仔鸡公鸡 50 只, 选用 5 种屠宰方法 (直接断颈, 舌下静脉放血, CO₂、水介质电麻和探针电麻致晕后屠宰), 每屠宰方法 10 只鸡, 探讨了屠宰致晕方法对肉品质的影响。结果表明, 经过麻醉 (CO₂、电) 处理后屠宰的肉品的 pH₁ 与 pH₂₄、ORP₁ 值与 ORP₂₄ 相差较小 (P>0.05), 其 ORP₁ 值和 ORP₂₄ 值也均低于其它处理 (P<0.05), 剪切力也显著低于未经麻醉直接屠宰的处理, 对滴水损失没有太大影响 (P>0.05)。结果表明, 屠宰致晕方法对肉质有一定的影响, 与直接屠宰放血方法相比, 致晕后屠宰可以改善肉质。

关键词: 致晕, 肉仔鸡, 肉质, 剪切力, pH 值, ORP 值, 滴水损失

Abstract: The Fifty Arbor Acre male Broilers, 42 day-old, were used to study the effect of slaughter methods on meat quality of broilers, to select the appropriate slaughter methods and to lessen the effect of slaughter stress. The method include: behead directly, hypoglossal vein bleed, stunning by electrify medium by salt, stunning by electrify probe, or stunning by CO₂. The results showed that meat of broilers which suffered stunning, CO₂ or electric, has lower differences between pH₁ and pH₂₄, ORP₁ and ORP₂₄, and the shear force of stunning meat was lower, but the drip loss of all the 5 treatments had no significant differences (P>0.05). The results indicate that the birds should be stunned before slaughter to ensure the meat quality.

Key words: stunning, broiler, meat quality, pH, ORP, drip loss

动物生产的各个环节均可能影响机体的抗氧化状况和肉质。原始屠宰方法易造成动物恐惧紧张, 产生应激反应, 导致皮质激素分泌过量, 进而致肉品中可能残留对人体健康有害的成分。击晕后屠宰, 可避免宰前应激对动物和肉质的影响。击晕方式主要有电击晕和气体 (CO₂、氩气、氮气等) 致晕, 以电击晕较普遍, 但该法可能会导致鸡只阵挛、惊厥, 翅膀拍动, 喙骨及锁骨骨折, 胸肌及腿肌出血。高压电击还会导致心脏纤维性颤动, 以至屠宰后放血困难。气体致晕法能减少骨碎和肌肉淤血 (Larsen, 1982), 但致晕过程较长, 延长了动物受痛苦的时间。气体致晕法因减轻宰前应激反应, 而在一定程度上减轻了肉鸡胴体的损伤, 改善工作环境 (Mohan Raj 等, 1990; 1991; 1993; Kang 和 Sam, 1999 等) 和肉质 (Mohan Raj 和 Gregory, 1994)。CO₂、电击致晕后屠宰与直接断颈屠宰在肉品 pH 值、R 值及滴水损失等指标之间差异不显著 (Kang 和 Sam, 1999), CO₂ 屠宰法处理的鸡只肉色较暗, 而电击后致晕屠宰后的肉色较其它两种方法更红。火鸡上的研究表明, 宰后 15min 的 pH 值, 电击与 CO₂ 致晕后屠宰两种方法无显著差异, 而直接屠宰的 pH 值较两者均低, 不同的致晕方法对火鸡肉的最终 pH 值、肉色、煮后 pH 值、煮后肉色及剪切力等方面均无显著差异, 对于 M-钙激活蛋白酶活性以电击、CO₂ 致晕、直接屠宰的顺序依次下降 (Raj 等, 1994)。

由于试验研究所用鸡品系不同, 电击电压、电流的差异, 气体成分与浓度等因素的不同, 导致各报道中关于屠宰方法对肉质的影响不一。因此, 本研究重点研究了动物屠宰过程中常用、兼顾工业化生产中使用的致晕方法, 在实验室条件下研究了断颈、割喉法、电麻或气体致晕 (CO₂) 屠宰法对肉仔鸡肉质的影响。

1.1 材料和方法

1.1.1 试验日粮

试验肉仔鸡屠宰前采食自配粉料，配方及营养组成见表 2-1。

1.1.2 试验肉仔鸡及试验设计

选体重相近 (2.1kg) 6w 雄性 AA 肉仔鸡 50 只，采用随机单位组设计，设 5 个处理 (直接断颈 (Behead directly, BD)、割喉法静脉放血 (Hypoglossal vein vlood, HVB)、1%NaCl 水介质电麻 (交流电 25V+10s; Stunning by electrify medium by salt solution, SEMSS)，探针双耳电麻 (裹上蘸有生理盐水的脱脂棉, 25V, 实际电流 12±2mA; Stunning by electrify through ears by probe, SETEP)，或气体至晕 (98% 二氧化碳; Stunning by CO₂, SC)。每处理设 5 个重复，每个重复两只鸡，屠宰一只。

1.1.3 样品的采集与制备

试验动物通过致晕 (或者不经致晕)，处理至肉仔鸡处于无意识状态后，统一采用颈静脉放血致死，待放血干净，沿腹部皮下扒皮，取左侧胸肌和腿肌，4℃ 保存用于测定滴水损失，取右侧胸肌和腿肌用于测定剪切力，pH 值和 ORP 值。

表 1-1 日粮组成和营养水平 (5-6 周龄)

Table 1-1 Dietary composition and nutrient level of the basal diet (5-6w)

饲料原料, Feed ingredient	比例, Percentage%	营养素, Nutrient	水平, Level
玉米 (Corn), 国标2级, 8.3	56.76	禽代谢能(PME, MJ/kg)	12.76
豆粕 (Soybean meal), 43	26.07	粗蛋白 (CP, %)	20.5
花生粕 (Peanut meal), 44.7	9.8	粗脂肪 (EE, %)	7.05
豆油 (Soybean oil)	3.9	钙 (Ca, %)	0.85
赖氨酸盐酸盐 (Lys-HCl)	0.2	总磷 (TP, %)	0.62
DL-蛋氨酸 (DL-Met)	0.25	有效磷 (AP, %)	0.43
石粉 (limestone), 35.9	0.85	赖氨酸 (Lys, %)	1.18
磷酸二氢钙 (DCP), 23.1/16	1.8	蛋氨酸 (Met, %)	0.53
食盐 (Salt)	0.3	蛋+胱氨酸(Met+Cys,%)	0.83
氯化胆碱 (Choline chloride), 50%	0.1	苏氨酸 (Thr, %)	0.78
复合微量元素 (Trace mineral premix) ¹	0.2	色氨酸 (Try, %)	0.26
复合维生素 (vitamin premix) ²	0.02		

1: 每 kg 日粮中提供: VA, 12500IU; VD₃, 4480IU; VK₃, 3.0mg; VB₁, 1.5mg; VB₂, 6.0mg; VB₆, 3.0mg; 泛酸, 14.0mg; VB₁₂, 0.02mg; 生物素, 100μg; 维生素 E, 30 IU; 烟酸, 80mg; 叶酸, 1.5mg。

²: 每千克日粮中提供: Mn, 88mg; Zn, 95mg; Fe, 100mg; Cu, 12.5mg; Se, 105μg; 1,900μg。

1: Supplied (Per Kg diet): retinyl acetate, 908μg; cholecalciferol, 66μg; DL-α-topheryl acetate, 26mg; menadione sodium bisulfate complex, 0.75mg; riboflavin, 7.5mg; D-calcium pantothenate, 9.7mg; niacin, 26.4mg; cyanocobalamin, 0.011mg; choline chloride, 1012mg; D-biotin, 0.31mg; pteroylmonoglutamic acid, 3.1mg; thiamin-HCl, 8mg; pyridoxine-HCl, 3.1mg。

2: Supplied (Per Kg diet): Mn, 88mg; Zn, 95mg; Fe, 100mg; Cu, 12.5mg; Se, 105μg; 1,900μg。

1.1.4 测定指标与方法

pH 值、ORP 值测定 肉鸡屠宰后 1h 和 24h，用 KL-013 型高精度酸度计分别测定屠体肌肉的 pH 值和 ORP 值，取胸肌和腿肌至组织捣碎机中绞成肉糜状，将测定探头埋于 (约 2cm) 肉糜

中，同时插入温度测定探头，校正 pH 值和 ORP 值。

滴水损失测定 肉鸡屠宰后取右侧胸大肌和大腿肌的中层部分，分别修整成长×宽×厚为 $55 \times 50 \times 15 \text{ mm}^3$ 和 $50 \times 45 \times 11 \text{ mm}^3$ 的长方体后称重 (W_1)，然后用细线捆住肉样的一端，使肌纤维垂直向下，装入充气的塑料袋中，封口，肉样不与袋壁接触，扎好袋口，悬挂于 4℃ 冰箱中，放置 24 小时，取肉样称重 (W_2)。计算滴水损失 (%) = $(1 - W_2/W_1) \times 100$ 。

剪切力的测定 取肉样置于自封口塑料袋中，放于 80℃ 水浴中，待肉样中心温度达 72℃ 后，取出肉样，沿肌肉丝方向修整成长×宽×厚为 $50 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ 的长方体，用型号为 TA-XT2i/25 的力学结构分析仪 (Texture Analyzer) 测定剪切力，每间隔 10mm 测定一次，每个样品测定 3 个数据，求平均为该样品的剪切力值。

1.1.5 数据处理与统计

采用 SAS 6.12 软件 PROC ANOVA 程序进行统计分析，用 LSD (最小显著极差) 法对差异显著的数据进行多重比较。

1.2 结果与分析

1.2.1 屠宰致晕方式对宰后肉品 pH 值的影响

表 1-2 屠宰致晕方式对宰后肉品 pH 值的影响

Table 1-2 Effect of stunning methods on pH value of broiler meat

项目, item	屠宰后 1h, 1h after slaughter		屠宰后 24h, 24h after slaughter	
	胸肌, BM	腿肌, TM	胸肌, BM	腿肌, TM
断颈, BD	6.14±0.38 ^{cC}	6.25±0.33 ^{cB}	6.26±0.15 ^A	6.17±0.10 ^{aA}
静脉放血, HVB	6.69±0.15 ^{aA}	6.72±0.22 ^{aA}	6.00±0.063 ^B	5.94±0.068 ^{cC}
二氧化碳致晕, SC	6.59±0.061 ^{aAB}	6.46±0.16 ^{bcAB}	6.06±0.074 ^B	6.06±0.042 ^{bB}
水麻电, SEMSS	6.30±0.12 ^{bcBC}	6.49±0.10 ^{bAB}	6.08±0.065 ^B	6.01±0.047 ^{bAB}
双耳麻电, SETEP	6.45±0.31 ^{abABC}	6.47±0.12 ^{bAB}	6.06±0.033 ^B	6.01±0.025 ^{bAB}
SEM, P 值 P value	0.2385, 0.0004	0.2038, 0.0018	0.08761, 0.0001	0.06197, 0.0001

a, b, c: 同一列肩标无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)。下同。

a, b, c: Means within a column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$) .

A, B, C: 同一列肩标无相同字母者差异显著 ($p < 0.01$)。下同。

A, B, C: Means within a column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.01$) .

BD, behead directly, 断颈; HVB, hypoglossis vein bleed, 静脉放血; SEMSS, stunning by electrify medium by salt solution, 1%NaCl 水介质电麻 (交流电 25V, 550mA, 10s); SETEP, stunning by electrify through ears by probe, 探针 (裹上蘸有生理盐水的脱脂棉, 25V, 12±2mA, 10s); SC, stunning by CO₂ (98%二氧化碳致晕)。下同。

BM: breast muscles; TM: thigh muscles。下同。

屠宰后 1h 的肌肉 pH 值 (pH_1) 偏高 (BM 和 TM 分别为 6.43 和 6.48, $n=40$)，24h 后的 pH 值 (pH_{24}) 均有所降低 (BM 和 TM 分别为 6.09 和 6.04, $n=40$)，与正常肉代谢过程一致。由表 1-2 可以看出， pH_1 值高者，其 pH_{24} 均较低。不管是 pH_1 还是 pH_{24} 值，BM 和 TM 之间均未见显著差异。未经麻醉静脉直接放血屠宰方式的 pH_1 (BM 和 TM) 值最高，而 pH_{24} 值则在所有屠宰方式中最低；相反，直接断颈法的屠宰后 pH_1 (BM 和 TM) 值最低，而 pH_{24} 值则是所有屠宰方

式中最高的处理。经过麻醉 (CO₂、电) 处理后屠宰的肉品的 pH 值变化居中。

pH 直接影响肉品的许多特性, 如保藏性、热煮损失、干加工能力等。一般宰后 15min, 鸡肉的 pH 在 6.00~6.5 之间, 约经 1h 开始下降, 经僵直达最低 (5.4-5.6), 而后随着僵直的解除、成熟时间的延长, pH 值开始缓慢回升。肉品 pH 值是反映宰杀后动物体肌糖原酵解速率的重要指标, 正常猪肉 pH 值一般为 6.1~6.4, 应激时因肌肉中的糖原降解为乳酸, 而导致 pH 值下降, 如 PSE 肉的 pH 值为 5.1~5.5 (陈润生, 1981; Monin, 1985; 姚军虎, 1994)。动物被处死后, 有机体的自动平衡机能终止, 而一系列物理、化学和生物化学变化仍持续。动物由有氧代谢转变为无氧代谢 (糖酵解), 将储藏的糖原最终降解为乳酸, 乳酸的积累导致肌肉 pH 值降低。应激信号通过神经和激素的作用, 加速体内糖原的酵解, 使肌肉 pH 值迅速降低, 肌肉 pH 值下降的速度和强度, 对一系列肉质性状产生决定性的影响。酸性导致肌肉蛋白质变性, 使肌肉保水力降低、颜色变灰白色, 是形成 PSE 肌肉的重要机制, 肌肉 pH 值对其嫩度、滴水损失、肉色等均有直接影响 (Fletcher, 1995)。

多数研究者认为 pH 值能较好地反映肉品质的优劣, pH 值过高, 对正常肌肉转向食肉的过程不利, 过低则往往会引起异常肉的发生, 但目前对于不同畜禽肌肉的 pH 值尚没有统一标准。本研究静脉直接放血法后屠宰处理的宰后 pH₁ 最大, pH₂₄ 则最低。一定范围内, 肉的终点 pH 值愈低, 滴水损失愈大, 肉色评分愈低; 反之亦然 (张伟力, 1995), 因此从肉品 pH 值变化来看, 该法并非最好的屠宰办法。直接断颈屠宰方法的宰后 pH₁ 值最低, 宰后 45-60min 度量的 pH 值 (pH₁) 是公认的区分生理正常和异常肉质 (PSE 肉) 的重要指标, 但是本研究的 5 种屠宰致晕方式的 pH₁ 值范围均在合适的范围内, 但是考虑到动物福利, 因此也不是很好的方法。而其它三个方法 (先致晕, 后屠宰) 相差无几。

1.2.2 对宰后肌肉 ORP 值的影响

表 1-3 屠宰方式对宰后肉品 ORP 值的影响

Table 1-3 Effect of stunning methods on ORP value of broiler meat

项目, item	屠宰后 1h, 1h after slaughter		屠宰后 24h, 24h after slaughter	
	胸肌, BM	腿肌, TM	胸肌, BM	腿肌, TM
断颈, BD	213.00±2.00 ^A	225.50±5.79 ^{aA}	102.28±30.78 ^a	75.88±18.48 ^{aA}
静脉放血, HVB	178.75±2.55 ^B	181.00±3.38 ^{bB}	77.38±17.82 ^b	50.25±18.02 ^{bcB}
二氧化碳致晕, SC	173.13±24.19 ^B	168.00±27.65 ^{bBCD}	70.00±21.42 ^b	43.88±8.69 ^{bcB}
水麻电, SEMSS	125.63±16.78 ^C	139.75±16.38 ^{cE}	70.00±19.57 ^b	35.75±15.09 ^{cB}
双耳麻电, SETEP	137.88±10.29 ^C	146.63±10.14 ^{cED}	84.38±27.45 ^{ab}	58.63±27.24 ^{abAB}
SEM, P 值 P value	14.4318, 0.0001	15.8601, 0.0001	23.9151, 0.0579	18.5015, 0.0015

BM, TM; BD, HVB, SC, SEMSS, SETEP; ^{A, B, C, D, E, a, b, c}: 同表 1-2, as table 1-2。

屠宰后 1h 的肌肉 ORP 值较高 (ORP₁, BM 和 TM 分别为 165.68 和 172.18, 表 1-3), 24h 后的 ORP 值降低明显 (ORP₂₄, BM 和 TM 分别为 80.81 和 52.88, n=40), 与正常肌肉代谢过程一致。由表 2-3 可以看出, BM 的 ORP₁ 值和 ORP₂₄ 值相差 (110.72、101.37、103.13、55.63 和 53.5) 较低; 而相应处理 LM 的 ORP₁ 值和 ORP₂₄ 值相差 (149.62、130.75、124.12、104.00 和 96.00) 较高, LM 的 ORP 值 23h 内降低更加明显。对 ORP₁ 值, LM>BM (CO₂ 致晕法除外); 而对 ORP₂₄ 值, BM>LM。未经麻醉静脉屠宰方式的屠宰后 ORP₁ 和 ORP₂₄ 值 (BM 和 TM) 是所有屠宰方式

中最高的处理，也是 ORP_1 和 ORP_{24} 差值最大的处理，水电麻处理的 ORP_1 值和 ORP_{24} 值均最低；经过两种电麻醉处理后屠宰的肉品的 ORP 值变化最小，其 ORP_1 值和 ORP_{24} 值也均低于其它处理。

ORP (Oxidation-Reduction Potential, 氧化还原电位) 或 Eh , 作为介质 (土壤、天然水、培养基等) 环境条件的一个综合性指标, 已沿用很久, 它表征介质氧化性或还原性的相对程度。标准状态下, 用可接受或释放电子的金属电极, 即可测定该值。如果溶液中含有氧化剂或还原剂, 就有电子交换, 就有 ORP 值, ORP 值给出的是电子活度。有人研究了热处理、 pH 值、碱度、硬度以及茶水对饮用水 ORP 的影响, 研究认为在不含有毒、有害物质的条件下, 可将 ORP 作为健康饮用水的标准之一, 其数值可确定在 200 mV 以下 (尹军和刘志生, 2005)。健康动物体内的氧化与还原是平衡的, 但应激时, 机体内的抗氧化作用偏低, 氧化与还原不均衡, 使机体细胞处于被氧化状态, 而此时向机体输入可接受的还原物质, 以降低活性氧等氧化性物质含量及其活性, 可提高机体的免疫能力和自然治愈能力。

本研究表明屠宰后 ORP_1 较高, ORP_{24} 较低, 屠宰致晕方法对肌肉的 ORP 值有较大的影响, 屠宰场普遍使用的致晕后放血法有一定的道理, ORP 下降的过程是肌肉有机质分解的过程, 也就是肌肉熟化的过程, 因为 ORP 值较容易测定, 未来可以作为肉品熟化程度的一个指示指标。研究表明土壤有机质旺盛分解期 ORP 下降, 甚至可以是负值。目前国内外很多专家已公认, 饮用氧化还原电位 (ORP) 低 (还原水) 的水, 这在发达国家已成为时尚。动物屠宰前一段时间通过日粮添加必要的还原剂, 可用于生产“还原肉”, 满足人民的需要。

1.2.3 对宰后肌肉剪切强度的影响

肌肉剪切强度 $LM > BM$ (134.1 和 112.34); 处理方式对肌肉剪切力有一定的影响, 未经致晕的直接断颈和静脉 (口腔) 放血致死法的肌肉剪切强度显著大于其它先致晕而后放血致死的方法, 其它方法之间差异不显著 (表 1-4)。

表 1-4 屠宰方式对宰后肌肉剪切力和滴水损失的影响

Table 1-4 Effect of stunning methods on shear force and drip loss of broiler meat

项目, item	断颈	静脉放血	二氧化碳	水麻电	双耳麻电	P 值	SEM	
	BD	HVB	致晕, SC	SEMSS	SETEP	P value		
剪切力 Shear force (g/s/mm)	胸肌 BM	124.82±9.27 ^A	136.81±17.48 ^A	101.41±7.73 ^B	100.78±7.81 ^B	97.86±11.86 ^B	0.0001	11.43
	腿肌 TM	164.91±14.25 ^A	184.19±14.33 ^A	106.06±8.17 ^B	106.61±13.96 ^B	108.73±5.84 ^B	0.0001	11.87
滴水损失 Drip loss (%)	胸肌 BM	7.23±2.20	6.98±2.07	8.35±2.25	8.07±2.28	6.24±2.66	0.6859	2.2586
	腿肌 TM	11.98±3.81	10.44±1.99	12.42±5.30	11.68±4.84	12.16±5.07	0.9716	4.4226

BM, TM; BD, HVB, SC, SEMSS, SETEP; 同表 1-2, as table 1-2.

A, B: 同一行肩标无相同字母者差异显著 ($p < 0.01$)。下同。

A, B: Means within a row with no common superscripts differ significantly ($p < 0.01$).

嫩度 (tenderness) 是肌肉品质的一个重要的方面, 是受多种因素影响, 指人们对肉入口后咀嚼过程中的感觉, 包括入口后是否容易被咬开、嚼碎和咀嚼后口中的残渣量三个方面。嫩度主要由肌肉中结缔组织、肌原纤维和肌浆蛋白含量与化学结构状态决定。肌肉中的肌纤维数量越多, 肌纤维越细, 肉就越细嫩, 肌间脂肪与嫩度呈正相关, 目前嫩度的客观评定主要用剪切力值来表示, 剪切力值越大, 则嫩度越差。肉的嫩度还受 pH 值的影响, pH 值在 5.0-5.5 时肉的韧度最大, 而偏离这个范围, 则嫩度增加, 这与肌肉蛋白质等电点有关。

本研究测定剪切强度是在一定时间内, 机器遇到的最大的阻力, 与接触肌肉后的行程和时间

的比值，能比较客观的反应肌肉的嫩度。未经致晕而直接屠宰增加了肌肉的剪切强度，经 CO₂ 或电麻醉后，在放血屠宰的方法可以减少屠宰前动物对处理的反应，从而缓解宰前应激。

1.2.4 对宰后肌肉滴水损失的影响

滴水损失 LM>BM (11.74%和 7.35%)；5 种致晕屠宰方法中 CO₂ 致晕后放血屠宰的滴水损失最大 (表 1-4)，但各处理方法之间的 BM 和 TM 的滴水损失均没有差异。LM 和 BM 对致晕屠宰方式的反应基本一致；测定方法比较简单，但组内差异较大。

系水力 (water holding capacity) 是指肉受到外力作用如分割、贮藏和加工等一系列过程中保持其原有水分的能力，系水力也是一种重要的肉质性状，它可影响到肉的多汁性、嫩度、营养成分、色泽等食用品质及干加工肉的产量等，通常以失水率或滴水损失来衡量肉的系水力。系水力高，肉表现为多汁、鲜嫩、表面干爽；系水力低则表面水渗出，贮藏过程中滴水损失大。滴水损失不仅直接影响食肉的质地、滋味、香气、多汁性、营养成分损失、嫩度、颜色等食用品质，因此具有重要经济意义。滴水损失还与肌肉 pH 值有关，屠宰后的糖原酵解使得肌肉 pH 值下降，肌肉蛋白之间的静电强度减弱，减弱了电荷作用，肌球和肌动蛋白纤丝之间的间隙缩小，水分从肌原纤维渗到肌浆，再到肌细胞外间隙；另外应激时，氧自由基增多，膜脂肪氧化，膜流动性改变和破裂，导致水分外溢，增加了滴水损失。因为本次测定的滴水损失变异较大，并且宰前没有起他应激源，处理之间差异未达显著，有待进一步研究。

还需进一步研究致晕方式对宰后肌肉代谢、宰前内分泌、激素等的影响，从而为屠宰生产厂选择最佳和改进致晕方式。

1.3 小结

1.3.1 经过麻醉 (二氧化碳、电) 处理后屠宰的肉品的 pH₁ 与 pH₂₄，ORP₁ 值与 ORP₂₄ 相差较小，其 ORP₁ 与 ORP₂₄ 值均低于其它处理 (P<0.05)，剪切力也显著低于未经麻醉直接屠宰的处理 (P<0.05)。这些数据表明致晕屠宰方法对肉质有一定的影响，与直接放血屠宰相比，致晕后屠宰可以改善肉质。

1.3.2 致晕后屠宰不能完全避免应激，但能部分减少应激对肌肉品质的影响。但应在致晕深度与放血能否完全这一对矛盾之间寻求平衡。

附录2 肉仔鸡腿、胸肌卫星细胞的培养及其表型

摘要: 本研究肉仔鸡骨骼肌卫星细胞的体外分离、纯化、培养、鉴定、冻存和复苏的方法及其生物学特性; 采用 I 型胶原酶和胰蛋白酶两步消化法纯化出大鼠骨骼肌卫星细胞(SCS), 进行体外原代和传代培养, 借此观察 SC 的增殖、分化特点并进行免疫细胞化学染色鉴定; 研究表明: 两步消化法适用于肉仔鸡骨骼肌卫星细胞的分离和获取, 方法可靠。生长培养基能促进细胞的增殖, 延迟分瓶或分化培养基能促使细胞分化形成肌管。骨骼肌结蛋白(Desmin)单克隆抗体免疫细胞化学染色 SCs 呈阳性, 肌动蛋白(α -sarcometricaction)染色肌管呈强阳性, 并具有良好的增殖和分化能力; 体外培养的肉仔鸡腿肌和胸肌 SCs 在合适的培养条件和传代比例下能够增殖与分化并保持其生物学特性, 可作为肉仔鸡骨骼肌细胞增殖、分化和再生机制研究的技术平台。

关键词: 肉仔鸡, 骨骼肌卫星细胞, 细胞培养, 鉴定, 生物学特性

Abstract: To establish the methods for purification, culture, identification and biological characteristics of broiler skeletal muscle satellite cells (SCs). Broiler skeletal muscle SCs were obtained by the two-steps method of collagenase-1 and trypsin digestion, and were subjected to primary as well as secondary culture in vitro. Morphological characteristics, myotube formation and growth curve were observed to evaluate the proliferative and differentiation ability of SCs. The SCs were identified with cellular immunochemical stain. Results showed that satellite cells from broiler chicken skeletal muscle tissue expressed desmin and α -sarcometricaction, and possessed ability to proliferate and differentiate. In conclude, The two-step method with collagenase-1 and trypsin digestion was reliable for collection of SCs. The cells showed high proliferate ability in the proliferate media and could form myotubes in differentiation media. The SCs were weak positive and myotubes were strong positive by cellular immunochemical stain with myosin. It confirmed the cultured cells were SCs. The SCs cultured in vitro from broiler skeletal muscle had high proliferative and differentiation ability and maintain the biological characteristics. They could be used for tissue engineering and gene therapy. The technical platform was established to study the mechanism of myogenic proliferation, differentiation and muscle regeneration.

Keywords: broiler, skeletal muscle satellite cells, cell culture, identification, biological characteristics

肉仔鸡的饲养为丰富“菜篮子”, 做出了巨大贡献, 近年来人们生活水平不断提高, 对禽肉产品的品质要求也越来越高, 突出的反映是禽肉较柴, 不好吃, 畜牧工作者已经在加快肉仔鸡生长速度、改善肉质方面做了一些工作。但是肉质的好坏直接与动物遗传特性、屠宰时肌肉的代谢等有关, 肌肉细胞的代谢情况不甚明了, 是无法进行肉质调控的根本原因。供人民食用的肌肉主要是骨骼肌的肌细胞, 成熟个体的心肌与平滑肌组织均不含成肌细胞, 而骨骼肌组织中的成肌细胞则是以骨骼肌卫星细胞的形式存在。卫星细胞的分化过程为卫星细胞首先分化为成肌细胞, 随后成肌细胞逐渐平行排列, 相互融合在一起, 形成具有中心核链、肌丝在周边的肌小管, 肌小管不断接受新生的成肌细胞, 或者与相邻肌小管相互融合而进一步生长发育为肌原纤维, 细胞核则逐渐靠向周边, 从而形成肌纤维, 动物屠宰后的肌纤维就是人们所说的肌肉。

肉仔鸡骨骼肌卫星细胞是骨骼肌细胞的干细胞，可发育成为成肌细胞。而成熟的骨骼肌细胞本身不具备分裂能力，在体外不能长时间培养，因此，对骨骼肌细胞的研究主要是通过对骨骼肌卫星细胞的体外培养来实现的（Webster等，1988）。肌卫星细胞最早于1961年由Mauro在蛙的肌肉中发现，1974年由Bischoff从大鼠骨骼肌中分离出来并进行体外培养。在动物个体生长发育过程中，卫星细胞不断增殖并补充到成长的肌纤维中。在成体肌组织中，卫星细胞处于有丝分裂休眠期（即G0期），形成潜在的生肌细胞库。当受到应激因素（牵拉、损伤、化学药物或其它刺激）作用时，卫星细胞被激活，表现为细胞一极或两极出现胞质突起、核质比提高以及细胞器增多（Bischoff，2004），它们在肌纤维损伤时能迁移至受损肌组织处，彼此相互融合或与原有的肌纤维融合，因此骨骼肌卫星细胞被认为是维持骨骼肌生长和损伤后肌纤维再生的主要来源（Schultz和McCormick，1994）。

存在于动物肌组织中的卫星细胞可通过酶消化、体外培养而富集，肌卫星细胞的体外培养是研究骨骼肌细胞增殖、分化、再生机理和应激对肉的代谢的关键技术。由于出雏后肉仔鸡的肌纤维数相对恒定，骨骼肌的生长主要表现为肌纤维的肥大，肌纤维肥大主要来源于肌卫星细胞的增殖和与原有肌纤维的融合。为进一步研究各种调控物质对肉仔鸡骨骼肌生长的作用机制，有必要建立肉仔鸡卫星细胞的体外培养方法，同时，对于现在普遍使用的体细胞核移植技术，骨骼肌卫星细胞以其稳定的遗传性和可培养性，可以通过改造成为核供体细胞。本研究采用胶原酶消化法从肉仔鸡腿肌和胸肌中分离出骨骼肌卫星细胞，建立了鸡骨骼肌卫星细胞分离、培养和鉴定技术，为鸡骨骼肌发育调控机理和肉仔鸡骨骼肌应激模型的研究提供了基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 动物

健康的1日龄AA肉仔鸡，不分性别（由北京华都集团孵化场提供）。

2.1.2 主要试剂和仪器

2.1.2.1 试剂

自配D-Hanks液、PBS溶液，高糖DMEM培养基（Gibco，德国），胎牛血清（FBS，杭州四季青公司，中国），胰蛋白酶（250单位，Sigma），I型胶原酶（Invitrogen），HEPES（DNN，Woodland Kai Biomed Scientific CO.,LTD；CODE 82780；LOT J01899，99.99%）；免疫组化染色试剂盒（KIT-9901/9902/9903）、 α -骨骼肌肌动蛋白（Cat. No. MAB-0055，Clone: D33）和结蛋白（Desmin）单克隆抗体（Cat. No. MAB-0002，Clone: 5C5），DAB显色试剂盒（Cat. No. DAB-0031/1031），均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

2.1.2.2 仪器

超净工作台（SW-CJ-1F型，苏州净化设备厂），CO₂培养箱（2300型SH E I-LAB，美国Sheldon Manufacturing Inc.），倒置显微镜（IX71，OLYMPUS，日本），显微摄影系统（Olympus BH-2型，日本Olympus公司），高压灭菌锅，细胞刮（NUNC），烘箱。

2.1.3 实验方法

2.1.3.1 D-Hanks液配制

1000 ml三蒸水加以下试剂：NaCl 8.01g，KCl 0.40g，Na₂HPO₄·H₂O 0.06g，KH₂PO₄ 0.06g，

NaHCO₃ 0.35g, 酚红0.02g; 用1mol/L的NaOH调pH值7.0; 用除菌器(0.22 μm除菌膜双层)在超静台中过滤, 以250ml量分装小瓶, 盖紧瓶盖, 置4℃(短期)或-20℃(长期)保存备用。使用时添加青霉素100μl/ml, 链霉素100μg/ml。

2.1.3.2 PBS液

1000 ml三蒸水加以下试剂: NaCl 8.0000g, KCl 0.2000g, Na₂HPO₄·H₂O 1.5600g, KH₂PO₄ 0.2000g; 用1mol/L的NaOH调pH值7.4; 以250ml量分装小瓶, 盖紧瓶盖, 置4℃(短期)保存备用。

2.1.3.2 酶的配制 用D-Hanks液先配制0.25%胰酶-0.04% EDTA, 再配制0.1%胶原酶。

0.25%胰酶-0.04% EDTA配制: D-Hanks液用5.6% NaHCO₃调pH至7.2; 称取胰蛋白酶粉末0.2500g, EDTA 0.0400g放入烧杯, 用少许D-Hanks调成糊状, 再补足100ml, 搅拌均匀, 置于室温4h或冰箱内过夜, 并不时搅拌、震荡; 滤纸过滤, 再用无菌滤器(0.45 μm除菌膜双层)滤过除菌, 以10ml或5ml量分装小瓶, 盖紧瓶盖, 置-20℃保存备用。一瓶最好一次用完, 不宜反复冻融。

0.1%胶原酶: D-Hanks液用5.6% NaHCO₃调pH至7.2; 称取 I 型胶原酶粉末0.1000g放入烧杯中, 用少许D-Hanks溶解, 再补足100ml, 搅拌均匀, 置于室温4h或冰箱内过夜, 并不时搅拌、震荡; 滤纸过滤, 再用无菌滤器(0.45 μm除菌膜双层)滤过除菌, 以10ml或5ml量分装小瓶, 盖紧瓶盖, 置-20℃保存备用。使用时一瓶最好一次用完, 不宜反复冻融。

2.1.3.3 培养基的配制 包括DMEM、HEPES、标准培养基和分化培养基的配制。

DMEM: DMEM粉剂(GIBCO, Lot 1320590, Cat. 12100-038) 13.4g, 先加入800ml三蒸水, 搅拌, 待培养基溶解, 再加入NaHCO₃ 3.70g, 搅拌, 完全溶解后, 用盐酸调pH值7.0, 搅拌, 定溶至1000ml, 用除菌器(0.22 μm除菌膜双层)在超静台中过滤, 以200ml量分装小瓶, 盖紧瓶盖, 置4℃(短期)或-20℃(长期)保存备用。使用时一瓶最好一次用完, 不宜反复冻融。

1mol/L (100×) HEPES贮存液配制: 取4.76g HEPES溶于20ml三蒸水中, 用1mol/L NaOH调pH值至7.0-8.0后, 过滤(0.45 μm除菌膜双层)除菌, 分装小瓶(2ml/瓶), 4℃或-20℃保存备用。使用前取99ml培养基加入1ml HEPES储存液, 最终浓度为10 mmol/L。目的是为了较长时间稳定培养基的pH值。

标准培养基: DMEM 84%~79%, 15%~20%胎牛血清, 1% 1mol/L HEPES, 青霉素100μl/ml, 链霉素100μg/ml。

分化培养基: DMEM 94%, 5%胎牛血清, 1% 1mol/L HEPES, 青霉素100μl/ml, 链霉素100μg/ml。

2.1.3.4 培养瓶包被 包括0.1%明胶配制和培养瓶的包被。

0.1%明胶配制: 称取明胶(Gelatin, 批号050822, 北京化学试剂公司) 0.10g, 溶于100ml三蒸水中, 过滤(0.45 μm除菌膜双层)除菌, 分装小瓶(10ml/瓶), 4℃(短期)或-20℃(长期)保存备用。

包被: 吸取2.5mL的0.1%的明胶溶液加入25cm²无菌培养瓶(6孔板、24孔板、96孔板)内, 然后将培养瓶放入37℃干燥箱中24h以上。使用前将培养瓶取出, 倾去其中液体, 并用生长培养基冲洗后备用, 整个包被过程均为无菌操作。

2.1.3.5 肉仔鸡胸肌和腿肌细胞的分离

将1日龄AA肉仔鸡(北京华都)舌下放血致死, 放入75%酒精溶液中3分钟, 无菌条件下分离1 cm³大小的大腿和胸部肌肉, 在超净工作台上剔除血管组织及肌膜、腱索等。同时用含有双抗的D-Hanks液清洗3次, 随后将肌肉组织剪成1mm×1mm×1mm左右的肉糜状, 移入10ml离心管中,

加入D-Hanks液静置1min, 待肌肉组织沉淀, 弃上层液及漂浮组织(最好用吸管吸出)。加入2~3倍体积的0.1% I型胶原蛋白酶, 吹打混匀, 37℃水浴消化30~40 min, 其间吹打几次, 消化时间可根据消化效果稍加变动, 肉眼可见被胶原酶消化后的肌肉呈絮状, 摇匀过程中肌肉不再贴附于试管壁上, 显微镜下可见单个的肌束结构, 然后将消化产物1000 r/min离心8min, 弃上清。再加2~3倍体积的0.25%的胰蛋白酶, 37℃水浴中消化20~30 min, 其间反复吹打, 将肌卫星细胞从基底膜和肌膜之间吹打下来。加入2~3倍体积的培养基中止消化, 用吸管反复吹打使组织分散, 将细胞悬浮液依次滤过100、200和400目的不锈钢网, 收集滤液, 过滤液1 000 r/min离心5 min, 弃上清; 得试管底部细胞, 用相应体积的标准培养基, 重悬细胞; 1 000 r/min离心5 min, 弃上清; 得到试管底部的细胞, 用2~3ml标准培养基重悬细胞, 转移入培养瓶中, 再用2-3ml标准培养基洗涤试管, 将洗液一并转移入培养瓶中; 用标准培养基调整培养瓶中的培养基量, 进行培养。

2.1.3.6 卫星细胞原代培养

为减少成纤维细胞的污染, 参照QU等(1998)差速贴壁法(薛庆善, 2001)进行细胞纯化。将细胞悬液置入未经0.1%明胶包被的培养瓶中培养1h, 贴壁细胞为少量非肌源性细胞和杂质; 吸出培养基(未贴壁的细胞悬液), 显微镜下计数后, 转入另一未经0.1%明胶包被的培养瓶中培养1h; 纯化后的细胞进行台盼蓝染色计数, 接种到经0.1%明胶包被的处理的塑料培养瓶中; 用标准培养基进行培养, 3d后换液, 细胞进入对数生长期后每日换液一次。倒置显微镜下每日观察细胞的生长情况(邵素霞等, 2004), 待细胞生长至80%接触后进行传代培养。

2.1.3.7 台盼蓝活体染色

取9滴细胞悬液加入1滴0.4%台盼蓝(Sigma)液混合均匀, 静置5 min于显微镜下观察计数。活细胞不着色, 死细胞呈蓝色。计数200个细胞, 求出存活与死亡细胞的比例。

2.1.3.8 传代培养

当细胞长至70%~80%贴壁时进行传代培养。首先, 把待传代的培养瓶内培养基倒空, 用D-Hanks液清洗两遍细胞, 加入300μl浓度为0.25%的胰酶, 37℃消化5 min, 观察到细胞开始回缩变圆后, 加入胎牛血清终止消化, 最后按比例补加相应培养基, 用玻璃滴管吹下细胞, 1:2下传, 计数, 调节细胞密度后接种到新的培养瓶中。24 h后换液, 每日观察细胞形态。

2.1.3.9 卫星细胞增殖生长曲线的绘制

取传代培养的第2代SC, 经0.25%胰蛋白酶消化洗脱后以 1×10^5 个/孔接种于包被的24孔培养板中, 加入生长培养液置于37℃、5%CO₂孵箱中进行培养, 以后每日任取3孔消化后以方格计数法确定SC数量, 并据此绘制卫星细胞生长曲线。

2.1.3.10 细胞的冻存和复苏

将已全部贴壁的细胞用D-Hanks液清洗两遍, 加入300 ul 0.25%胰酶消化5 min, 加入400 μl胎牛血清终止消化, 再加入2.6 ml培养基后转移到离心管中, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清液。向离心管中加入700 μl DMEM、200 μl胎牛血清、100 μl DMSO后转移到冻存管中封存。先将冻存管置于4℃ 40 min, 再转入-20℃冰箱, 2 h后移入-80℃低温冰箱中过夜, 第2d转入液氮中保存。复苏时先将冻存管从液氮罐中取出, 迅速放入39℃的水浴中5 min。溶化后, 吸出细胞悬液注入到离心管中, 再加入D'Hanks液充分混合, 1 200 r/min离心5 min, 弃上清液。再用D'Hanks液重悬细胞, 离心, 弃清液, 加入标准培养液充分悬浮细胞, 均匀地接种于培养瓶中, 培养观察。

2.1.3.11 骨骼肌卫星细胞鉴定

取培养至第2~3代的细胞，消化后以 1×10^5 /孔接种于已经1%明胶包被的6孔培养板中，加入生长培养基进行培养，培养24h（陈岩等，2006）细胞贴壁伸展后，进行抗结蛋白（Desmin）的免疫细胞化学染色；待细胞分裂、增殖至80%汇合后，改用分化培养基培养，待肌管开始形成（陈从波等，2006）后，固定细胞，行 α -骨骼肌肌动蛋白（ α -sarcometric actin）的免疫细胞化学染色；固定细胞，按照说明书操作。以抗 α -骨骼肌肌动蛋白、结蛋白单克隆抗体（作第一抗体，以PBS溶液（pH 7.4）及试剂盒提供的非免疫动物血清代替第一抗体作为阴性对照。详细步骤见附录2。

4.1.1.3.12 细胞形态学特征观察

于倒置生物显微镜下观察培养瓶中原代及传代培养的细胞形态特征。

2.2 结果与分析

2.2.1 细胞形态

本研究分离出来的肌肉卫星细胞，经台盼蓝染色，细胞存活率>95%，刚分离出来的细胞呈圆形或椭圆形，细胞折旋光性强（图2-1a），24h后开始贴壁，贴壁细胞形态开始变得不规则，可见到小的突起，72h后细胞完全贴壁，细胞开始逐渐变大，成梭形或多角形，细胞之间可见突起间连接（图2-1b,c），5d后细胞进入对数增长期，随细胞密度增加，细胞变成扁梭形，当细胞贴壁面积达到60%~70%时，细胞开始有序排列，细胞间开始发生融合。延迟分瓶，细胞可相互融合成多核的肌管样结构（图2-1d）。并逐渐形成管状，即成为肌管细胞，此时细胞内有数个至数十个细胞核像串珠一样排列在细胞中央。

传代细胞贴壁较快，增殖速度也较原代加快。第2次接种24h后，大部分卫星细胞已贴壁，48h后可见大量梭形、纺锤形的单核细胞出现。随着培养时间的延长，梭形细胞的数量逐渐增加，培养3~6d后，卫星细胞相互融合成多核的肌管（图2-2a,b）；培养8~10d，肌管进一步变粗，有分叉（图2-2c,d）。

2.2.2 传代细胞生长曲线

肉仔鸡骨骼肌细胞传代培养生长曲线见图2-3。在细胞融合前进行传代，传代细胞具有正常的形态结构。卫星细胞经过一天的复苏，与第二天开始起对数生长的旅程，第5天和6天是因为接触抑制，细胞增殖缓慢。腿肌卫星细胞的生长稍微缓慢。

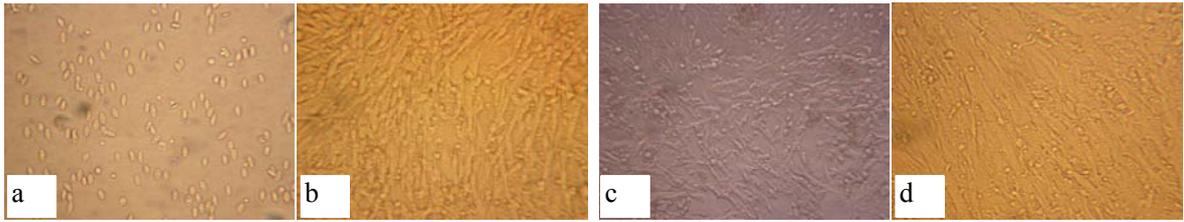
2.2.3 免疫细胞化学染色

Desmin在肌卫星细胞中强阳性表达，部分细胞可见细胞间拉网形成（图2-4a,b）。免疫组化计数阳性细胞，细胞纯化率可达到98%。

α -sarcometric action染色结果显示卫星细胞的胞浆呈阳性，胞核不染色，成纤维细胞的胞浆不染色，肌管染色明显（图2-4c,d）。卫星细胞爬片在100倍显微镜下纪录1000个细胞，胞浆阳性细胞为卫星细胞，胞浆不染色的为成纤维细胞，成纤维细胞胞浆有长的突起，卫星细胞没有，计数结果显示阳性率为99%。

2.2.4 细胞的冻存和复苏

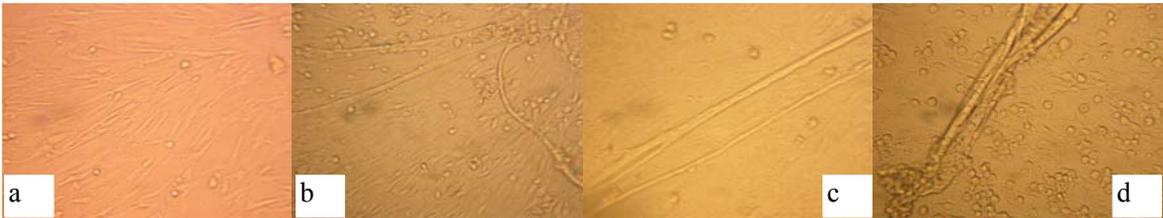
冻存细胞复苏后，有部分细胞死亡，细胞状态良好（图2-5）。复苏生长3d后细胞出现脂肪颗粒，有“空壳”现象，系细胞内脂肪沉积过多。



a、刚分离出来的细胞呈圆形或椭圆形；b、原代第3天腿肌骨骼肌细胞，呈扁梭状；c、原代第3天胸肌骨骼肌细胞，细胞比较密集，呈扁梭状；d、原代第5天腿肌骨骼肌细胞，有肌管样结构。

a, SC just separated liberated from muscles, rotundity or ellipse; b, SC liberated from breast muscle after 3 days cultured, flat shuttle; c, SC liberated from thigh muscle after 3 days cultured, flat shuttle;

图 2-1 原代培养肌肉卫星细胞形态 Fig. 2-1 The shape of satellite cells after 0, 3 and 5 days cultured



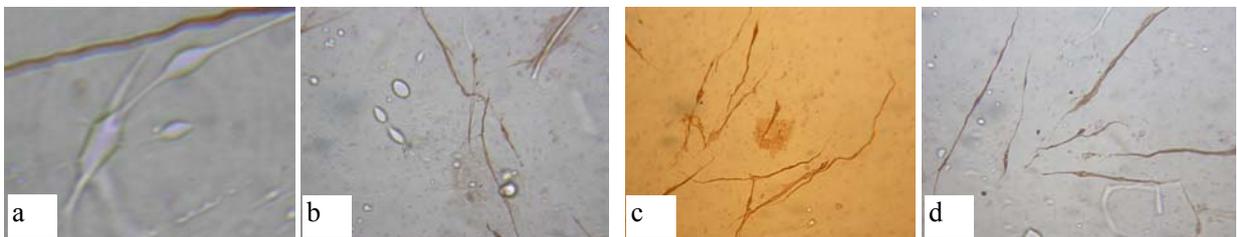
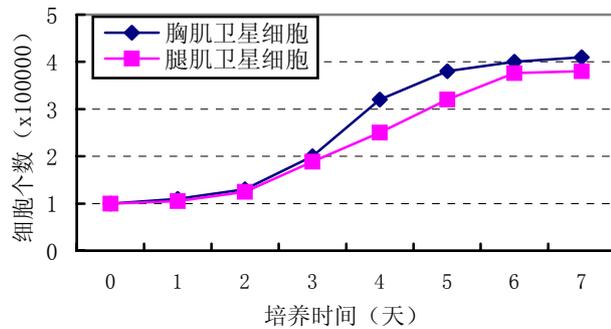
a、培养2代3天的骨骼肌卫星细胞，细胞向着一个方向排列；b、二代第6天腿肌骨骼肌细胞，有明显的肌管形成；c、二代细胞培养8天胸肌骨骼肌细胞，肌管变粗，有分枝；d、二代细胞培养10天分枝进一步变粗，图上显示用胰酶消化后肌管及其根部细胞结构。a, the second generation SC after 3 days cultured, SCs arrange at same direction; b, the second generation SC liberated from thigh muscle after 6 days cultured, obvious myotubes can be seen; c, the second generation SC liberated from breast muscle after 8 days cultured, myotubes became larger; d, the second generation SC liberated from breast muscle after 10 days cultured, myotubes and its base SC after digested by trypsin.

图 2-2 二代培养的肌肉卫星经过一定时间培养后的细胞形态

Fig. 2-2 The shape of the second generation satellite cells (SC) after 3 to 10 days cultured

图 2-3 肌细胞生长曲线

Fig. 2-3 The growth curve of the neonatal broiler skeletal muscle satellite cells

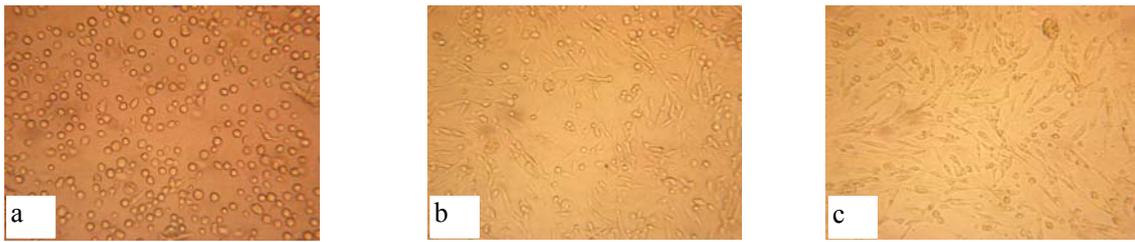


a, b: 卫星细胞和成纤维细胞Desmin免疫组化染色；c, d: 肌管 α -sarcometricaction免疫组化染色

a, b: the result of the SC and fibroblast cell of the cellular immunochemical stain with Desmin (method of DAB); c, d: the result of the myotubes of the cellular immunochemical stain with α -sarcometricaction (method of DAB)

图 2-4 肌肉卫星细胞, 成纤维细胞和肌管细胞的Desmin和 α -sarcometricaction免疫染色 (DAB法)

Fig. 2-4 Broiler skeletal muscle satellite cells, fibroblast cell and myotubes of the cellular immunochemical stain with Desmin and α -sarcometricaction (method of DAB)



a: 细胞复苏后的涂片, 细胞圆形, 与刚消化下来的细胞类似; b: 培养一天后, 有些细胞已经贴壁生长, 有些在悬浮, 还可见细胞碎片; c: 培养到第3天, 细胞中有脂肪滴沉积。a, shape of the SC just after anabiosis, rotundity, as the SC of just digested by trypsin; b, undergoing 1-day's cultured, many SC stucked to the wall; c, after 3-days' cultured, fat aggradations can be seen.

图 2-5 冻存复苏0, 1, 3天后细胞的形态

Fig. 2-5 Shapes of the SC undergoing freeze keep, anabiosis, and cultured for 0, 1 and 3 days.

2.3 讨论

近年来随着居民生活水平的不断提高, 对禽肉产品的品质要求也越来越高。国内外学者已经在加快肉仔鸡生长速度、改善肉质方面做了一些工作。然而, 肉质的好坏直接与动物遗传特性、屠宰时肌肉的代谢等有关。肌肉细胞的具体代谢情况不明是无法进行肉质调控的根本原因。供人们食用的肌肉主要是骨骼肌的肌细胞, 成熟个体的心肌与平滑肌组织均不含成肌细胞, 而骨骼肌组织中的成肌细胞则是以骨骼肌卫星细胞 (SCs) 的形式存在。SCs的分化过程为: SCs首先分化为成肌细胞, 随后成肌细胞逐渐平行排列, 相互融合形成具有中心核链、肌丝在周边的肌小管, 肌小管不断接受新生的成肌细胞, 或者与相邻肌小管相互融合而进一步生长发育为肌原纤维, 细胞核则逐渐靠向周边, 从而形成肌纤维, 动物屠宰后的肌纤维就是人们所说的肌肉。

骨骼肌SCs是骨骼肌细胞的干细胞, 可发育成为成肌细胞。成熟的骨骼肌细胞本身不具备分裂能力, 在体外不能长时间培养, 因此, 对骨骼肌细胞的研究主要是通过对骨骼肌SCs的体外培养来实现 (Webster等, 1988)。肌SCs最早于1961年由Mauro在蛙的肌肉中发现, 1974年由Bischoff从大鼠骨骼肌中分离出来并进行体外培养。动物生长发育过程中, SCs不断增殖并补充到成长的肌纤维中。成体肌组织中SCs处于有丝分裂休眠期 (即G0期), 形成潜在的生肌细胞库。当受到应激因素 (牵拉、损伤、化学药物或其它刺激) 作用时, SCs被激活, 表现为细胞一极或两极出现胞质突起、核质比提高以及细胞器增多 (Bischoff, 2004), 它们在肌纤维损伤时能迁移至受损肌组织处, 彼此相互融合或与原有的肌纤维融合, 因此骨骼肌SCs被认为是维持骨骼肌生长和损伤后肌纤维再生的主要来源 (Schultz和McCormick, 1994)。

动物肌组织中的SCs可通过酶消化、体外培养而富集, 肌SCs的体外培养是研究骨骼肌细胞增殖、分化、再生机理和应激对肉的代谢的关键技术。出雏后肉仔鸡的肌纤维数相对恒定, 骨骼肌的生长主要表现为肌纤维的肥大 (主要来源于肌SCs的增殖和与原有肌纤维的融合)。为进一步研究调控物质对肉仔鸡骨骼肌生长的作用机制, 有必要建立肉仔鸡SCs的体外培养方法, 同时, 对于现在普遍使用的体细胞核移植技术, 骨骼肌SCs以其稳定的遗传性和可培养性, 可以通过改造成为核供体细胞。本研究采用胶原酶消化法, 建立了肉仔鸡骨骼肌SCs分离、培养和鉴定技术, 为鸡骨骼肌发育调控机理和肉仔鸡骨骼肌应激模型的研究提供了基础。

肌SCs分离 骨骼肌肌纤维膜外面有一种分裂能力很强的肌细胞叫SCs，因紧贴肌细胞表面呈卫星状排列而得名，可分化为骨骼肌和平滑肌纤维，甚至软骨细胞，是目前公认的骨骼肌成肌干细胞（Bischoff和Heintz，1994）。无法通过机械分离方法获得肌肉SCs，必须依赖消化酶的作用，使SCs从基膜上释放出来。胰酶适于消化细胞间质较少的软组织，如胚胎、肝、肾等组织，对纤维性组织及较硬的癌组织效果差，钙离子和镁离子及血清均对胰酶活性有抑制作用，浓度较高的胰酶作用强烈，对细胞生长也有一定的影响；而胶原酶则对细胞间质有消化作用，它适合消化分离纤维性组织、上皮及癌组织（鄂征，1992）。本试验采用酶消化和机械消化相结合的方法，获得了较好的分离效果。分别用胰酶和胶原酶进行消化，因为胰酶对细胞有破坏作用，设立10 min、15min、20 min的时间梯度，发现胰酶在15min+胶原酶30 min时消化效果最好。

SCs来源 生长中的肌组织含有大量的骨骼肌SCs，故体外培养骨骼肌细胞一般取材于胚胎动物或新生动物肌组织。已有SCs的培养研究，多采用老鼠肌肉组织、猪、产蛋鸡、兔的骨骼肌、心肌等，本研究选取1d（出壳12h以内）肉仔鸡的胸肌和腿肌分别取样，研究表明来自胸肌和腿肌的SCs，生长良好，均可作为SCs的来源。

肌肉SCs的纯化培养 在分离肌肉SCs培养时，经常混杂有少量非肌源性细胞（如成纤维细胞），以往采用Percoll不连续等密度梯度离心来分离非肌源性细胞和SCs，但获得细胞数量明显减少，采用流式细胞仪筛选法，所得SCs纯度虽然很高，但需要针对某种动物SCs的单克隆抗体，且受到仪器的限制，而影响其使用。骨骼肌细胞的贴壁速度较非肌源性细胞慢，本试验表明采用差速贴壁法对骨骼肌细胞进行选择纯化，在接种2h后成纤维细胞已经贴壁，此时将悬浮细胞取出进行第2次接种，可以获得大量均一的肌肉SCs。经过此法处理过的细胞，纯度可达90%以上。此法较其它纯化方法方便、有效，在原代培养和传代培养时均可使用。

细胞早期鉴定 结蛋白（Desmin）是动物肌SCs的早期标志（Baroffio等，1995），是肌细胞内细胞骨架中间丝的构成成分之一，是较早表达的肌源性标志蛋白，类似于SC的成纤维细胞不表达这种标志蛋白。本试验证实其在肉仔鸡SCs中也能强阳性表达，这种鉴定方法比较简单。

骨骼肌细胞体外培养特性：肌SCs不易贴壁，细胞必须在多聚赖氨酸处理的塑料培养瓶中生长，若不处理，则原代细胞将很难贴壁生长。本研究采用1%明胶处理培养瓶，发现传代细胞（早期）在培养瓶中贴壁明显加快，细胞很快伸展。

骨骼肌SCs的分化与鉴定：骨骼肌SCs首先分化为成肌细胞，随后逐渐平行排列，相互融合形成细胞核在中央、肌丝在周边的肌管；随着分化过程的深入，肌丝不断生长并形成肌原纤维，细胞核则逐渐靠向周边，从而形成肌纤维。虽然细胞的高密度培养能促进分化，但为便于试验条件的控制，必须使用客观、易行的促分化培养方法。在体外培养条件下，主要是通过降低培养基中血清含量来实现。因此，本研究中采用1%胎牛血清作为促进骨骼肌SCs分化的分化培养基。肌管形成是骨骼肌SCs分化的标志，除形态上的变化外，部分骨骼肌特异性蛋白的合成与表达，也是分化的重要标志，可将此作为骨骼肌SCs的鉴定指标。 α -sarcomericactin和Desmin为骨骼肌的结构蛋白和功能蛋白，也是骨骼肌所特有的蛋白。本研究中，使用这两种蛋白单克隆抗体进行细胞免疫化学染色，单个细胞为弱阳性，说明分化的初始阶段特异性蛋白的表达量少；而肌管为强阳性，表明分化后期，特异性蛋白表达明显增加。这表明，所培养的细胞确实是骨骼肌SCs。

体外培养骨骼肌SCs的应用价值：体外培养的骨骼肌SCs主要用于组织工程和基因治疗两方面。骨骼肌SCs属组织干细胞，其体外培养的优点是取材方便、产量大，具有较强的增殖、分化

能力，在适当条件下可向成肌细胞、成软骨细胞和成骨细胞等多方向分化。因此，骨骼肌SCs在这些组织工程研究中具有广阔的应用前景（Rowley等，1999）。本试验所建立的肉仔肌骨骼肌SCs系和培养方法可用于对骨骼肌细胞生长、增殖、模型建立等进一步的体外试验研究。

2.4 小结

建立了肉仔鸡胸肌和腿肌骨骼肌卫星细胞分离、培养的方法，并在细胞形态学和分子表达水平对分离培养的SCs进行了鉴定。体外培养的骨骼肌SCs分化为成肌细胞，融合成肌管，SCs纯度为90%，肌管 α -sarcomeric actin和肌SCs desmin抗体鉴定为阳性。鸡骨骼肌SCs分离和体外培养技术的建立为研究肉仔鸡骨骼肌肌肉品质形成、调控机理等提供了技术平台和理论基础。

附录3 免疫组织化学鉴定步骤

6孔培养板中置过酸盖玻片，加标准培养基培养2天、4天、8天、16天后取出盖玻片，4%多聚甲醛固定5min，70%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水(各5min)后置于-20℃冰箱中冷冻保存，若干天后分别行抗结蛋白、抗肌动蛋白免疫组织化学染色鉴定。

抗结蛋白免疫组织化学染色步骤:

- 1、固定盖玻片于载玻片上，0.01M PBS (PH7.4) 冲洗3次，每次3min (3×3')；
- 2、3%过氧化氢 50 ul 室温孵育 10 min、以阻断内源性过氧化物酶的活性；
- 3、0.01M PBS 冲洗3次，每次3 min (3×3')；
- 4、除去 PBS，每张切片加 50ul 结蛋白抗体工作液，置室温孵育 60min 或 4℃冰箱内过夜；
- 5、0.01M PBS 冲洗 5 min，3 次 (3×5')；
- 6、除去 PBS，每张切片加 50ul 聚合物增强剂 (试剂 A)，室温孵育 20min；
- 7、0.01M PBS 冲洗 3min，3 次 (3×3')；
- 8、除去 PBS，每张切片加 50ul 酶标抗鼠/兔聚合物 (试剂 B)，室温孵育 30min；
- 9、0.01M PBS 冲洗 3min，3 次 (3×3')；
- 10、除去 PBS，每张切片加 50ul 新鲜配制的 DAB 溶液 (0.85ml 水+DAB 缓冲液、DAB 底物和 DAB 显色剂各 50ul)，显微镜下观察 3-5min (室温下显色时间为 3-10min，棕色)；
- 11、自来水充分冲洗，苏木素复染；
- 12、切片经梯度酒精脱水干燥，中性树胶固定封片。

注：为防止滴加试剂时 PBS 未滴干而使试剂稀释，而引起的染色强度变弱或假阳性的发生，每步滴加试剂前应将组织片上的 PBS 液除干，但又必须预防干片。

抗肌动蛋白免疫组织化学染色步骤:

- 1、固定盖玻片于载玻片上，0.01M PBS (PH7.4) 冲洗3次，每次3min (3×3')；
- 2、3%过氧化氢 50 ul 室温孵育 10 min、以阻断内源性过氧化物酶的活性；
- 3、0.01M PBS 冲洗3次，每次3 min (3×3')；
- 4、除去 PBS，每张切片加 50ul 肌动蛋白抗体工作液，置室温孵育 60min 或 4℃冰箱内过夜；
- 5、0.01M PBS 冲洗 5 min，3 次 (3×5')；
- 6、除去 PBS，每张切片加 50ul 聚合物增强剂 (试剂 A)，室温孵育 20min；
- 7、0.01M PBS 冲洗 3min，3 次 (3×3')；
- 8、除去 PBS，每张切片加 50ul 酶标抗鼠/兔聚合物 (试剂 B)，室温孵育 30min；
- 9、0.01M PBS 冲洗 3min，3 次 (3×3')；
- 10、除去 PBS，每张切片加 50ul 新鲜配制的 DAB 溶液 (0.85ml 水+DAB 缓冲液、DAB 底物和 DAB 显色剂各 50ul)，显微镜下观察 3-5min (室温下显色时间为 3-10min，棕色)；
- 11、自来水充分冲洗，苏木素复染；
- 12、切片经梯度酒精脱水干燥，中性树胶固定封片。

注：为防止滴加试剂时 PBS 未滴干而使试剂稀释，而引起的染色强度变弱或假阳性的发生，每步滴加试剂前应将组织片上的 PBS 液除干，但又必须预防干片。

致 谢

本论文是在我的导师齐广海研究员的悉心指导下完成的，从论文的选题和试验的设计、研究的实施和论文的撰写都凝聚着导师的辛勤汗水和真知灼见。三年中，齐老师对我的生活、学习和工作都给予了无微不至的关怀。齐老师渊博的知识、严谨的科学作风和高尚的人格情操，是我学习的楷模，永远激励我奋进。齐老师言传身教，不但教给了我知识，更教给了我许多做人的道理，将使我受益终生。在此，谨向恩师表达我最崇高的敬意和最衷心的感谢！愿我的老师在今后的日子里培养更多更优秀的学生，师道永存，师恩永志！

本文课题得到国家“973”项目，环境应激影响肉品质的信号传导通路（2004CB117507）和国家“十一五”科技支撑计划，家禽健康养殖新型模式研究与示范（2006BAD14B06）的支持。

在攻读学位期间，有幸得到中国农业科学院饲料研究所各级领导和老师们的关心和大力支持。感谢导师组和论文开题小组以及中期考核小组的刁其玉研究员、高秀华研究员、佟建明研究员、王晓霞教授、姚斌研究员、王建华研究员、侯水生研究员、张萍研究员在试验设计方面给予的指导和建议。

本课题组的张海军和杜红方博士、李岩和岳洪源硕士在试验过程中给予了很多无私的帮助和建议；在试验的进行中，同门师弟高俊博士生，苗燕、李鹏、柏华（西北农林科技大学）、聂大娃、何涛等硕士研究生，均给予了很多帮助，还有河北科技师范学院的韩存莉、饲养员邢艳鹏也给予了很多帮助，在此向他们表示深深的谢意，愿他们学习进步，事业有成！感谢协和医科大学的孙兰教授为细胞试验提供了试验场地和指导，感谢该实验室的杨京女士，骆庆峰、阮灿军博士生；感谢华都肉鸡公司的王金宝经理不厌其烦地为本研究提供了鸡苗。

感谢饲料研究所、家畜营养研究室给予的学习机会。感谢饲料所马书宇处长、于会民博士、赵丽华副研究员等在工作 and 生活中给予的帮助和关心。感谢工程技术研究室的李军国研究员、中心实验室刘庆生老师、范志影老师、司进老师在试验样品分析过程中给予的帮助；感谢饲料所家禽营养室刘国华主任，张姝、常文环和郑爱娟老师在仪器使用中给予的方便；感谢饲料所微生物工程研究室的博士研究生石鹏君给予的帮助；感谢同一实验室屠焰、张乃峰、国春艳、李辉博士研究生，硕士研究生史良、杨威和杜红芳给予的帮助和关心。

在学业即将结束的时候，我深深地感谢我的父母给予我生命、智慧和勇气以及这么多年来给予我的鼓励和支持，祝他们在今后的日子里身体更加健康！感谢我的妻子在我这几年求学过程中给予的支持、鼓励和宽慰，为我安心学习和工作提供了巨大的精神支持；感谢我的女儿给予我的精神快乐，希望她能够茁壮成长；感谢我的弟弟、妹妹对我的支持和鼓励，愿他们生活幸福！

三年来还有许多老师、同学给了我无私的关心和热情的帮助，然中短情长，不能一一，但祝好人一生平安！

作者：武书庚

2007年6月15日

作者简介

姓名	武书庚	性别	男	民族	汉族
籍贯	河北省平乡县	出生年月	1972年5月	政治面貌	中共党员

教育背景

学位	博士（研究生）	硕士	学士
导师（辅导员）	齐广海 研究员		翟广运 教授
专业	动物营养与饲料科学		动物营养与饲料加工
培养单位	中国农业科学院研究生院		河北农业大学畜牧兽医系
时间	2004.9 - 2007.7	1998.9 - 2001.7	1991.9 - 1995.7
毕业论文题目	肉仔鸡氧化应激模型的 研究	日粮中不同硫酸铜和柠檬酸 铜添加水平及其组合对产蛋 鸡生产性能及蛋品质的影响	马鹿饲养及鹿茸加工技 术

工作经历

1995.7-1998.9 石家庄市石油化工经销开发总公司从事畜禽公司的饲料配方和原料采购，技术员；

2001.7-2002.7 中国农业科学院饲料研究所任研究实习员；

2002.7- 任中国农业科学院饲料研究所助理研究员。

博士研究生期间获奖及发表论文情况

博士在读期间发表文章 15 篇，参编书籍 3 部，获奖情况如下：

低胆固醇营养健康蛋饲料生产及蛋鸡规模化养殖技术，获 2006 年度湖北省科技进步奖叁等奖，第 2 名；获 2005 年度荆门市科学技术奖叁等奖（荆政发〔2006〕19 号），第 2 名。

棉籽粕“物—化”脱毒新工艺，获 2006 年度德州市科学技术奖一等奖，第 3 名。

果渣生物发酵与营养平衡的研究与应用，获 2006 年度北京市科学技术奖贰等奖（2005 农-2-004），第 9 名；获 2005 年度中国农业科学院科学技术成果奖二等奖（2005-13），第 7 名。

犊牛、羔羊配方代乳品的研制与应用，获 2006 年度中国农业科学院科学技术成果奖二等奖（2006-13），第 8 名。

“日粮中不同铜源及添加水平对产蛋鸡生产性能鸡蛋品质的影响”2005 年 12 月 18 日获中国林木渔业经济学会饲料经济专业委员会第二届学术交流大会 优秀论文奖。

2006 年接受 CCTV-7 科技苑节目专访一次，制作了饲料防霉有关的录像，并于 2006 年 8 月 4 日在 CCTV-7 科技苑节目播出。