

NO 在雏鸡球虫感染过程中的作用

申兆菊, 朱蓓蕾, 蒋金书

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 研究以腹腔注射途径给予试验雏鸡 cNOS 抑制剂 L-NAME、L-NA 以及 iNOS 抑制剂 L-AG, 通过测定血浆 NO₂ 水平、肠道粘膜 NOS 活性、雏鸡日增重以及肠道病变计分、肠道组织切片中球虫数量、O. P. G 值、异常粪便百分率等指标, 研究了 NO 在雏鸡感染 *E. tenella* 或 *E. acervulina* 过程中的作用。试验结果表明, 在雏鸡感染 *E. tenella* 或 *E. acervulina* 后, 每日连续给予 L-AG 或 L-NAME, 不但加重了雏鸡的肠道组织显微病变, 而且使肠道组织切片中的球虫数量增多。此外 L-AG 或 L-NAME 处理还使感染雏鸡的 O. P. G 值和肠道病变计分等指标出现不同程度的升高, 但与感染对照组的相比未见显著性影响。另外, 无论是 NO₂ 测定结果, 还是 NOS 活性测定结果均表明, 3 种 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡体内 NO 的生成均有较好的抑制作用, 其中以 L-AG 的抑制作用最为理想, L-AG 处理组雏鸡血浆 NO₂ 水平或肠道粘膜 NOS 活性值均与给予的 L-AG 剂量之间呈现较好的剂量依赖性递减关系。结果提示, 在雏鸡感染球虫过程中, 体内大量生成的 NO 对球虫具有一定的毒性作用。NO 可能是在雏鸡 *E. tenella* 和 *E. acervulina* 感染过程中发挥作用的一种效应分子。

关键词: 一氧化氮(NO); 雏鸡; *E. tenella*; *E. acervulina*; 一氧化氮合成酶抑制剂

中图分类号: S852.72⁺ 3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)04-0395-05

一氧化氮(Nitric oxide, NO) 研究中常用的一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthase, NOS) 选择性抑制剂有 N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N^G-硝基-L-精氨酸(L-NA) 和 L-氨基胍(L-AG) 等 3 种, 其中 L-AG 对机体毒性较低, 并对诱导型 NOS(iNOS) 具有选择性抑制作用; L-NAME 在机体内经酯酶水解后, 主要抑制血管内皮细胞的 NOS 活性; L-NA 既能抑制神经元内原生型 NOS(cNOS) 活性, 又能抑制 iNOS 活性, 但对 cNOS 活性的抑制是以不可逆方式进行的, 而对 iNOS 活性的抑制是以可逆方式进行的。已有的试验表明, 用 *Eimeria tenella* 或 *Eimeria acervulina* 人工感染雏鸡后, 其血浆 NO₂ 水平很快升高, 并在第 5 d(118 h) 末(*E. tenella*) 或第 4 d(96 h) 末(*E. acervulina*) 达到最高值, 此时间与感染鸡的肠粘膜和微血管损害最严重的时间相符合^[1]。结果提示, 推测在球虫感染过程中, 雏鸡体内 NO 生成量的增加可能是由于入侵球虫激活了雏鸡机体的免疫系统, 导致大量炎症因子释放, 诱导宿主多种类型细胞内的 iNOS 活性及表达, 从而催化大量 NO 的生成。由于 NO 具有活泼的化学性质,

极容易与细胞内含铁化合物发生化学反应, 所以在球虫感染过程中, 大量生成的 NO 即可能对球虫具有毒杀作用, 也可能对球虫寄生的宿主细胞、甚至宿主机体具有毒副作用^[2,3]。倘若 NO 仅对球虫具有毒杀作用, 那么抑制 NO 的生成, 便会使感染雏鸡体内寄生球虫的数量增多、病情加重; 而如果 NO 仅对宿主细胞具有毒副作用, 那么抑制其生成便会缓和受感染雏鸡的病情和/或改善雏鸡的临床感染症状。试验目的是确定对感染球虫雏鸡具有最佳抑制效果的 NOS 抑制剂种类及其剂量, 然后利用肠道病变计分、组织切片等技术, 观察抑制 NO 的合成对感染球虫雏鸡病情的影响, 进而为研究 NO 在球虫感染过程中的作用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物 1 日龄黄羽肉鸡购自中国农科院畜牧所, 在恒温、恒湿的试验室饲养, 雏鸡自由采食和饮水。

1.2 试验虫株 *E. tenella* 及 *E. acervulina* 虫株由中国农业大学动物医学院寄生虫学教研组保存。

1.3 试剂和试液 L-NAME(N^G-nitro-L-arginine-methylester): Sigma 公司生产, 批号为 N-5751; L-AG(L-aminoguanidine): Sigma 公司生产, 批号为 A-7259; NOS 活性测定试剂盒: 北京邦定生物医学公司提供, 科研试剂; 其余所用试剂均为国产分析纯。

试液: 配制 1% L-AG 溶液, 然后再用生理盐水

收稿日期: 2000-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970564)

作者简介: 申兆菊(1971-), 女, 满族, 辽宁省清原县人, 讲师, 博士, 主要研究方向为兽医毒理学及药理学。

将其作 1:2 及 1:9 稀释得到 0.3% 及 0.1% L-AG 溶液; 配制 2% L-NAME 生理盐水溶液, 然后再用生理盐水将其作 1:2 及 1:9 稀释得到 0.6% 及 0.2% L-NAME 生理盐水溶液; 配制 1.5% L-NA 生理盐水溶液, 然后按 5 法稀释得到 0.5% 及 0.15% L-NA 生理盐水溶液; 称取 50 mg 考马斯亮蓝 G-250, 将其溶于 25 ml 95% 乙醇中, 然后加入 50 ml 85% 磷酸, 混匀, 加蒸馏水定容至 500 ml, 过滤后室温存放。

1.4 试验方法

1.4.1 卵囊计数: 用血球计数板计数重铬酸钾悬液中所含的 *E. tenella* 或 *E. acervulina* 孢子化卵囊数。取含一定量卵囊的重铬酸钾悬液, 离心后用水洗涤 2~3 次, 以去除重铬酸钾溶液。再用水重新悬浮卵囊, 并定容至 2.0×10^5 个卵囊/ml, 根据接种剂量的大小, 用取样器定量吸取含需要量卵囊的水悬浮液, 经口接种鸡只。

1.4.2 组织切片制备: 扑杀试验鸡只, 剪取约 2 cm 长的十二指肠中段样品, 用生理盐水冲洗干净, 置 4% 甲醛溶液中固定数日后, 修剪组织块, 并用常水冲去组织块内的甲醛溶液, 按常规方法进行脱水、包埋、切片及 H. E. 染色。

1.4.3 NO_2^- 标准曲线的制备: 按周恒铎方法^[4]分别测定不同浓度(0.25、0.5、1.2、4 和 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) NO_2^- 溶液经 Griess 反应生成物的 OD_{540} 值, 以不同 NO_2^- 溶液的浓度作纵坐标、以其相应的 OD_{540} 值作横坐标, 绘制标准曲线, 并计算出回归方程。

1.4.4 NO_2^- 水平的测定: 以 10% 柠檬酸三钠作抗凝剂, 从羽下静脉采血, 立即以 3 000r/min 的速度离心血样 10 min, 以分离血浆。取 100 μl 血浆按周恒铎方法^[4]测定其经 Griess 反应生成物的 OD_{540} 值, 然后利用标准曲线, 计算血浆 NO_2^- 水平。

1.4.5 十二指肠粘膜 NOS 活性的测定: 断头处死雏鸡, 迅速取出全部十二指肠, 将其游离侧剪开, 并以预冷的生理盐水冲洗 3 遍后, 用手术刀片轻轻刮取肠道粘膜, 以预冷的 0.04 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4) 将刮取的粘膜样品按 1:3(g/ml) 比例混合, 然后在冰水浴条件下匀浆 2 min。匀浆液经 12 000 r/min 的速度离心 20 min 后, 取 1 ml 上清液按 Knowles 方法测定 NOS 活性^[5]; 其余部分置 4℃ 冰箱内保存, 以供测定其蛋白浓度用。

1.4.6 蛋白浓度测定: 按考马斯亮蓝 G-250 蛋白定量法测定^[6]。BSA 溶液标准曲线的绘制: 用 0.04 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4) 分别配制 0.1、0.5、1、

2.5、7.5 及 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 BSA 溶液, 按考马斯亮蓝 G-250 蛋白定量法测定不同浓度 BSA 溶液的 OD_{595} 值。以蛋白浓度作为纵坐标, OD_{595} 值作为横坐标, 绘制标准曲线并求出回归方程。

样品测定: 从冰箱中取出经 2.5.5 所提及方法处理过的十二指肠粘膜匀浆的上清液, 在室温下放置 10 min 后, 取 100 μl 加到比色杯中, 按考马斯亮蓝 G-250 蛋白定量法测定其 OD_{595} 值, 然后依据标准曲线算出蛋白浓度。

1.5 试验设计

1.5.1 不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡体内 NO 生成的影响: 取健康雏鸡, 在试验条件下饲养 13 d 后, 随机分成 11 组(每组 6 只鸡)。即: (1) 空白对照组, (2) 感染对照组, (3) 0.1% L-AG 组, (4) 0.3% L-AG 组, (5) 1% L-AG 组, (6) 0.2% L-NAME 组, (7) 0.6% L-NAME 组, (8) 2% L-NAME 组, (9) 0.15% L-NA 组, (10) 0.5% L-NA 组, (11) 1.5% L-NA 组。

从 14 日龄开始直至扑杀当日, 连续以腹腔注射途径给予第 1 组和第 2 组雏鸡生理盐水, 给予第 3~11 组雏鸡相应浓度的 NOS 抑制剂溶液, 0.5 ml/次, 2 次/日。然后于 14 日龄时对第 2~11 组雏鸡进行感染, 剂量为 2.7×10^4 个卵囊/只鸡。在感染后第 4 d 末从每组中随机取 5 只鸡, 测定其血浆 NO_2^- 的水平; 在感染后第 5 d 末扑杀全部试验鸡只。从每组中取 3 只鸡, 剖检, 刮取十二指肠粘膜, 测定其 NOS 活性, 各组剩下的 3 只鸡用于组织切片制备。

1.5.2 NO 在雏鸡球虫感染过程中的作用: NO 在雏鸡感染 *E. acervulina* 过程中的作用: 取健康雏鸡, 在试验条件下饲养 13 d 后, 随机分成 4 组(每组 10 只鸡), 即 (1) 空白对照组, (2) 感染对照组, (3) 0.3% L-AG 组; (4) 0.6% L-NAME 组。对各组的处理同 1.5.1。然后于 14 日龄时对 2~4 组雏鸡进行感染, 感染剂量为 2.7×10^4 个卵囊/只鸡。在感染后第 4 d 末从各 *E. acervulina* 感染组中随机取 5 只鸡, 测定其血浆 NO_2^- 水平; 在感染后第 5 d 末扑杀全部试验鸡, 计算 O. P. G 值, 从每组中随机抽取 5 只鸡, 剖检, 刮取十二指肠粘膜用于测定其 NOS 活性, 取 5 只鸡的十二指肠中段样本用于组织切片制备。

NO 在雏鸡感染 *E. tenella* 过程中的作用: 取健康鸡, 在试验条件下饲养 13 d 后, 随机分成 4 组(每

组 10 只), 即: (1) 空白对照组; (2) 感染对照组; (3) 0.3% L-AG 组; (4) 0.6% L-NAME 组。

对各组的处理同 1.5.1。然后于 14 日龄时对第 2~4 组雏鸡进行感染, 感染剂量为 2.0×10^4 个卵囊/只鸡。在感染后第 5 d 末从各组中随机抽取 5 只鸡, 测定其血浆 NO_2^- 的水平; 在感染后第 6 d 末扑杀试验鸡只, 对盲肠进行肠道病变计分和计算 O. P. G 值(每克粪便中球虫数), 另取 5 只鸡的盲肠中段样本用于组织切片制备。

1.6 数据处理 试验结果以 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示, 以 t -检验法比较各组间统计学差异。

2 试验结果

2.1 NO_2^- 标准曲线的制备 见表 1

表 1 不同浓度 NO_2^- 溶液经 Griess 反应生成物的 OD_{540} 值
Table 1 The OD_{540} result of product of different NO_2^- solution reacted with Griess reagent

NO_2^- 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	1	2	4	8	16	32
OD_{540}	0.057	0.096	0.114	0.216	0.129	0.367	0.619

2.2 不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡体内 NO 生成的影响

2.2.1 不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡血浆 NO_2^- 水平的影响情况见表 2。从结果可看出感染对照组雏鸡血浆 NO_2^- 水平比对照组明显升高($p < 0.05$)。各抑制剂处理组雏鸡的血浆 NO_2^- 水平未见显著差异($p \geq 0.05$), 但均明显低于感染对照组($p < 0.05$)。各 NOS 抑制剂处理组中 0.6% 和 2% L-NAME 处理组, 0.5% L-NA 处理组以及 0.1% L-AG 处理组雏鸡血浆 NO_2^- 水平比空白对照组的明显升高($p < 0.05$), 其余各组的 NO_2^- 水平与空白对照组的相比, 未出现显著差异($p \geq 0.05$)。从表 2 看出, L-AG 处理组随着 L-AG 剂量的加大, 雏鸡血浆 NO_2^- 水平逐渐降低, 呈现出一定的剂量-效应关系。结果表明, L-NAME 处理组和 L-NA 处理组的雏鸡日增重随着给予不同 NOS 抑制剂剂量的加大而逐渐下降, 提示 L-NAME 和 L-NA 具有降低雏鸡日增重的作用趋势。

2.2.2 不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡肠道 NOS 活性的影响见表 2。感染对照组雏鸡肠道粘膜 NOS 活性明显高于空白对照组($p <$

0.05)。各个抑制剂处理组雏鸡肠道粘膜 NOS 活性均低于感染组, 其中 2% L-NAME 处理组、1% L-AG 处理组以及 0.15% 和 1.5% L-NA 处理组的 NOS 活性与感染组的相比有显著差异($p < 0.05$), 而不同抑制剂组之间以及抑制剂组与空白对照组之间则均未出现显著差异。

表 2 不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡体内 NO_2^- 水平及 NOS 活性的影响

Table 2 The effect of different NOS inhibitors on NO production in broilers challenged with *E. acervulina*

组别 Group	血浆 NO_2^- 水平* 1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	NOS 活性* 2 ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot.}$)
空白对照组 Control	1.5 ± 1.59^e	1.26 ± 1.24^b
感染对照组 Infective	5.52 ± 1.27^a	7.63 ± 8.14^a
0.1% L-AG	3.61 ± 0.38^b	4.92 ± 4.38^{ab}
0.3% L-AG	2.76 ± 1.57^{bc}	2.94 ± 2.15^{ab}
1% L-AG	2.15 ± 0.84^{bc}	0.16 ± 0.15^b
0.2% L-NAME	2.70 ± 0.55^{bc}	2.34 ± 0.63^{ab}
0.6% L-NAME	3.54 ± 1.05^b	1.81 ± 2.16^{ab}
2% L-NAME	3.40 ± 1.07^b	0.77 ± 0.50^b
0.15% L-NA	2.88 ± 1.76^{bc}	1.27 ± 1.14^b
0.5% L-NA	3.42 ± 1.87^b	2.20 ± 1.84^{ab}
1.5% L-NA	1.93 ± 1.09^{bc}	0.95 ± 1.37^b

注: 感染剂量为 2.7×10^4 个卵囊/只鸡; 右上角标有不同字母的数值间存在显著差异($P < 0.05$, t -检验)。

* 1 感染后第 4 d 采血样, $n = 5$; * 2 感染后第 5 d 刮取雏鸡肠道粘膜样品, $n = 3$ 。

2.3 NO 在雏鸡球虫感染过程中的作用

2.3.1 NO 在雏鸡 *E. acervulina* 感染过程中的作用:从表 3 看出, 0.3% L-AG 组及 0.6% L-NAME 组雏鸡血浆 NO_2^- 水平明显低于感染对照组($p < 0.05$); 0.6% L-NAME 组雏鸡的 NOS 活性与感染对照组的相比, 也有所降低, 但未出现显著差异; 0.3% L-AG 组雏鸡肠道 NOS 活性明显低于感染对照组($p < 0.05$); 0.3% L-AG 组球虫寄生数量明显比感染对照组及 0.6% L-NAME 组的增多; 但各组间的 O. P. G 等指标无显著差异($p \geq 0.05$)。显微病变结果表明, 0.3% L-AG 组雏鸡肠道病变最严重, 粘膜及肠腺内有大量球虫不同发育阶段虫体, 肠道组织结构不完整, 粘膜固有层充血。0.6% L-NAME 组雏鸡肠道切片中球虫数量多于感染对照组的水平, 组织病变程度也比感染组的严重, 但比 0.3% L-AG 组的缓和。

2.3.2 NO 在雏鸡感染 *E. tenella* 过程中的作用:

表 3 NO 在雏鸡感染 *E. acervulina* 过程中的作用
Tab. 3 The effect of NO on broilers challenged with *E. acervulina*

	血浆 NO ₂ 水平 (μg/ml) ^{*1}	NOS 活性 ^{*2} (nmol/min/mg prot.)	切片中球虫数量 (个) ^{*3}	O. P. G. ^{*4} (个/g)	异常粪便 (%) ^{*5}
空白对照组 Control	0.47 ± 0.11 ^{ab}	1.13 ± 1.01 ^{cd}	0	0	0
感染对照组 Infective group	0.83 ± 0.39 ^a	3.89 ± 1.29 ^c	22	9 × 10 ⁵	5
0.3% L-AG	0.57 ± 0.22 ^b	0.65 ± 1.12 ^d	210	8 × 10 ⁵	25
0.6% L-NAME	0.53 ± 0.21 ^b	3.52 ± 3.16 ^{cd}	27	1 × 10 ⁶	10

注: 感染剂量为 2.7 × 10⁴ 个卵囊/只鸡; 右上角标有不同字母的数值间存在显著差异 ($p < 0.05$, t 检验)。

* 1 感染后第 4 d 采血样, n= 5; * 2 感染后第 5 d 刮取肠道粘膜样品, n= 10; * 3 肠道组织切片在 10 × 40 视野内的球虫寄生数量, n= 5; * 4n= 10; * 5n= 10。

从表 4 可看出, 0.3% L-AG 组及 0.6% L-NAME 组雏鸡的血浆 NO₂ 水平明显低于感染对照组的值 ($p < 0.05$), 但这 2 组的肠道病变计分、肠道切片中的球虫数量等指标与感染对照组相比未见显著差异 ($p \geq 0.05$)。显微病变表明, 3 个感染组雏鸡的肠道

粘膜及肠腺内布满球虫不同发育阶段的虫体(裂殖体和配子体), 肠腺之间以及粘膜固有层内有较大的出血点, 粘膜上皮细胞脱落、崩解, 但比较而言, 0.3% L-AG 组及 0.6% L-NAME 组雏鸡的肠

表 4 NO 在雏鸡感染 *E. tenella* 过程中的作用
Table 4 The effect of NO on broilers challenged with *E. tenella*

	血浆 NO ₂ 水平 (μg/ml) ^{*1}	肠道病变计分(分) ^{*2}	切片中球虫数量 (个) ^{*3}	O. P. G. ^{*4} (个/g)	异常粪便 (%) ^{*5}
空白对照组 Control	0.47 ± 0.11 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0	0	0
感染对照组 Infective	0.79 ± 0.29 ^a	1.70 ± 0.48 ^d	674	6 × 10 ⁵	10
0.3% L-AG	0.38 ± 0.11 ^b	1.63 ± 0.52 ^d	757	7 × 10 ⁵	25
0.6% L-NAME	0.44 ± 0.20 ^b	1.89 ± 0.78 ^d	767	7 × 10 ⁵	10

注: 感染剂量为 2.0 × 10⁴ 个卵囊/只鸡; 右上角标有不同字母的数值间存在显著差异 ($p < 0.05$, t 检验)。

* 1 感染后第 5 d 采血样, n= 5; * 2n= 10; * 3 肠道组织切片在 10 × 40 视野内的球虫寄生数量, n= 5; * 4n= 10; * 5n= 10。

道病变比感染对照组的严重, 其肠道组织切片中的球虫数量也比感染对照组的。

3 讨论

从表 2 可看出雏鸡血浆 NO₂ 水平与其十二指肠粘膜 NOS 活性的规律并不一致。这一结果可能是由于血浆 NO₂ 水平反映的是整个机体 NO 生成量的情况, 而十二指肠粘膜 NOS 活性是仅局限于部分粘膜内的酶活性; 其次, 球虫感染雏鸡后肠道 NOS 受到入侵球虫诱导, 活性增强, 从而催化机体 NO 生成增加, NO₂ 水平升高。由于是体内试验, 无法在测 NOS 活性后, 再采血测 NO₂ 水平, 所以血浆 NO₂ 水平只能间接反映采血前整个机体 NOS 活性状况, 而对于采血后 NOS 活性则无法精确反映。

不同 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡体内 NO 生成影响, L-NAME 组及 L-NA 组雏鸡日增

重均随着给予剂量加大而逐渐降低, 这提示 L-NAME 及 L-NA 对雏鸡有一定的毒副作用。因为由 cNOS 催化的 NO 在机体内起着舒血管、抑制血小板粘附和聚集的作用, 而 L-NAME 和 L-NA 作为 cNOS 选择性抑制剂, 可抑制 cNOS 活性, 干扰其正常的生理功能, 从而加重病情, 使雏鸡日增重降低。另外, 无论是 NO₂ 测定结果, 还是 NOS 活性测定结果均表明, 3 种 NOS 抑制剂对感染 *E. acervulina* 雏鸡有较好的抑制作用, 其中以 L-AG 的抑制作用最为理想。L-AG 处理组雏鸡血浆 NO₂ 水平和肠道粘膜 NOS 活性值均与 L-AG 给予剂量间呈现较好的剂量依赖关系。NO 在雏鸡感染 *E. tenella* 或 *E. acervulina* 过程中作用的研究结果表明, iNOS 抑制剂 L-AG 及 cNOS 抑制剂 L-NAME 处理不同程度地恶化了感染 *E. tenella* 或 *E. acervulina* 雏鸡的

肠道病变计分 *O.P.G* 值、异常粪便百分率等指标,但与感染对照组相比,未出现显著差异。

Allen(1997)曾以 5×10^4 个卵囊/只鸡的剂量感染雏鸡研究 L-AG 对感染 *E. tenella* 雏鸡作用。从感染当日直至试验结束,每日以腹腔注射途径给予每只鸡 0.5 ml 0.25% L-AG 溶液。结果表明, L-AG 组雏鸡体内虫体的发育状况等指标与未用 L-AG 处理的感染组相比,没有出现显著差异^[7],但给予 NOS 抑制剂组雏鸡粪便卵囊排出量增多^[8]。

另外,试验的显微病变分析结果表明, L-AG 组及 L-NAME 组雏鸡的肠道显微病变比感染对照组的严重。此研究结果提示雏鸡感染球虫后,其体内大量生成的 NO 对球虫起着一定的毒害作用。

有关 NO 对血吸虫感染、疟原虫感染、锥虫感染作用的试验^[9,10]均已直接验证了 NO 对上述寄生虫的杀灭或抑制作用,而试验却未能得到这样的结果,这可能与球虫寄生部位、作用方式特殊等原因有关。

参考文献:

- [1] 申兆菊,朱蓓蕾,蒋金书. 雏鸡柔嫩艾美耳球虫感染与雏鸡体内 NO 的生成[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(3): 270~ 276.
- [2] Moncada S R, Palmer M J, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109~ 142.
- [3] Ovington K S, Smith N C. Cytokines, free radicals and resistance to *Eimeria*[J]. Parasitol, 1992, 8: 422~ 426.
- [4] 周恒铎主编. 职业中毒检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976, p. 529~ 530.
- [5] Knowles R G, Salter M, Brooks SL, et al. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990, 172(3): 1042~ 1048.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248~ 254.
- [7] Allen P C, Lillenhøj S. Genetic influence on nitric oxide production during *E. tenella* infections in broilers[J]. Avian Dis, 1998, 42(2): 397~ 403.
- [8] Allen P C. Effect of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in broilers[J]. Poult Sci, 1999, 78(11): 1506~ 1509.
- [9] Vincendeau P, Daulouede S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma muscili* involves an L-arginine-dependent mechanism[J]. J Immunol, 1991, 146: 4338~ 4343.
- [10] Taylor-robinson A W. Antimalarial activity of nitric oxide: cytostasis and cytotoxicity towards *Plasmodium falciparum*[J]. Biochem Soc Trans, 1997, 25(2): 262.

The Effect of NO During *E. tenella* or *E. acervulina* Infection of Broilers

SHEN Zhao-ju, ZHU Bei-lei, JIANG Jin-shu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: It is well identified that nitric oxide(NO), a labile and highly reactive radical, can be synthesized in most part of animal and human body. NO has been demonstrated to play different roles in organism. As a molecule of transmitter and effector, NO participates in the processes of microorganism infection. The effects of NO during *E. tenella* or *E. acervulina* infection processes using cNOS inhibitors such as L-NAME, L-NA, and iNOS inhibitor L-AG have been studied in this research. 14-day-old Huangyu broilers were challenged with *E. tenella* at the dose of 2.0×10^4 oocysts per broiler or *E. acervulina* at the dose of 2.7×10^4 oocysts per broiler. The 14-day-old broilers received NOS inhibitors continuously for 7 days after the day of challenge. The experimental results showed that the plasma levels of NO_2^- and NOS activity of broilers in infective control groups were significantly higher than those of control one ($P < 0.05$). The plasma levels of NO_2^- and NOS activity in broilers of each NOS inhibitors-treated group were decreased significantly than those in infective control one ($P < 0.05$). These results indicated that L-NAME, L-NA, and L-AG might successfully inhibit the NO production in broilers. The clinical signs, gross and histologic lesions and coccidiosis of broilers in L-NAME-treated group and L-AG-treated group were exacerbated. The experimental results imply that NO which is produced during *Eimeria* infection processes has some toxic effect on *Eimeria* parasite, and some beneficial effect on broilers organism. Come to the conclusion, as an effector, NO play an important role in *Eimeria* infection of broilers.

Key words: Nitric oxide; Broilers; *Eimeria tenella*; *Eimeria acervulina*; NOS inhibitors