

文章编号: 1000-7423(2012)-04-0301-04

【实验研究】

感染隐孢子虫奶牛血液免疫和抗氧化指标的变化

周庆新, 李锦春, 徐前明, 赵长城, 王希春, 王菊花, 刘维, 李培英*

【摘要】 目的 检测感染隐孢子虫奶牛血液免疫和抗氧化体系指标。方法 对安徽省某奶牛场 325 头奶牛粪样采用饱和蔗糖溶液漂浮法检测隐孢子虫感染情况。选择隐孢子虫感染强阳性的 7 头奶牛作为感染组, 同时取 7 头隐孢子虫粪检阴性奶牛作为对照组, 早晨饲喂前从奶牛颈静脉采血, 分别测定总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、免疫球蛋白(IgG、IgM 和 IgA)、中性粒细胞吞噬率、T 淋巴细胞转化率、白细胞介素-2 (IL-2)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛(MDA)、一氧化氮 (NO)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、血糖 (GLU)、甘油三脂 (TG)、Cl⁻和 Ca²⁺等 19 项指标。结果 325 头奶牛隐孢子虫感染率为 31.7%(103/325), 根据卵囊的形态和大小, 初步鉴定为安氏隐孢子虫 (*Cryptosporidium andersoni*)。与对照组相比, 感染组奶牛血清中 TP、ALB、IgM、IgA、GSH-Px、ALT、AST、ALP 和 Cl⁻含量无显著变化 ($P>0.05$); 血清中 MDA 和 NO 含量分别升高 59.9%和 28.1% ($P<0.05$ 或 0.01); 而血清中 IgG、SOD、GLU、TG、Ca²⁺和 IL-2 含量, 以及 T 淋巴细胞转化率和中性粒细胞吞噬率分别降低了 32.9%、11.1%、18.6%、78.9%、14.5%、7.0%、22.0%和 20.2% (均 $P<0.05$)。结论 感染隐孢子虫奶牛部分免疫指标下降, 抗氧化酶活性降低, 清除体内自由基的能力减弱。

【关键词】 隐孢子虫; 奶牛; 免疫指标; 抗氧化指标

中图分类号: R382.3 文献标识码: A

Detection of Immunity and Antioxidant Indexes in Dairy Cows Infected with *Cryptosporidium*

ZHOU Qing-xin, LI Jin-chun, XU Qian-ming, ZHAO Chang-cheng, WANG Xi-chun, WANG Ju-hua, LIU Wei, LI Pei-ying*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

【Abstract】 **Objective** To detect the immune status and antioxidant system indexes of cows infected with *Cryptosporidium*. **Methods** Fecal samples of 325 dairy cows were collected at a farm in Anhui and examined by floating saturated solution. 7 positive cows and 7 negative cows from the farm were selected as infection group and non-infection group, respectively. Blood samples were taken from cow's jugular vein before feeding in the morning. 19 indexes of total protein (TP), albumin (ALB), IgG, IgM, IgA, phagocytic rate of white blood cells, T lymphocyte transformation rate, IL-2, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), NO, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glucose (GLU), triglyceride (TG), Cl⁻, and Ca²⁺ were tested, respectively. **Results** The infection rate of 325 cows was 31.7% (103/325). The *Cryptosporidium* was identified as *C. andersoni* according to the morphology and size of oocysts. Compared with the non-infection group, there was no significant difference in the concentration of TP, ALB, IgM, IgA, GSH-Px, ALT, AST, ALP and Cl⁻ ($P>0.05$). The concentration of MDA and NO in the infection group increased by 59.9% and 28.1% ($P<0.05$ or 0.01), and that of IgG, SOD, GLU, TG, Ca²⁺, IL-2 and the activities of T lymphocyte transformation rate, phagocytic rate of white blood cells decreased by 32.9%, 11.1%, 18.6%, 78.9%, 14.5%, 7.0%, 22.0%, and 20.2%, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** The change of antioxidant and immune indexes shows that the capability of eliminating free radicals and the immune function have decreased in the *Cryptosporidium andersoni*-infected cows.

【Key words】 *Cryptosporidium*; Cow; Immunity; Antioxidant index

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31001019) and the Natural Science Fund of Anhui Province (No. 070411018)

* Corresponding author, E-mail: anhuilipeiying@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31001019); 安徽省自然科学基金 (No. 070411018)

作者单位: 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

* 通讯作者, E-mail: anhuilipeiying@yahoo.com.cn

隐孢子虫病是由隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 感染引起的呈世界性分布的人兽共患原虫病^[1]。隐孢子虫宿主范围广泛,除人类以外,还可寄生于哺乳类、鸟类、爬行类和两栖类等 240 余种动物,其中牛是公认的人类隐孢子虫病的最重要传染源^[2]。目前,隐孢子虫病已被世界卫生组织(WHO)列入为新发传染病,2003 年该病被列为中国重点防范的 2 种重要寄生虫病之一^[3]。

自 1976 年中国首次报道人感染隐孢子虫病以来,有关人和动物隐孢子虫病的研究在全国范围内广泛开展^[2]。然而,关于隐孢子虫病的研究多集中在病原学、流行病学和诊断学等方面,隐孢子虫致病机制的资料较少,且至今尚无公认的治疗隐孢子虫病的有效药物^[4]。

本研究通过检测安徽省某奶牛场奶牛的隐孢子虫感染情况,以隐孢子虫感染强阳性的奶牛为研究对象,检测并分析其免疫和抗氧化体系等指标,旨在探索隐孢子虫致病机制。

材料与方法

1 奶牛隐孢子虫感染情况调查

1.1 粪样采集 从安徽省某奶牛场随机抽取 325 头奶牛作为检测对象,从每头牛的直肠采集新鲜粪便 50~60 g,放入塑料袋内,置 4℃冰箱中保存待检。

1.2 粪检 粪检参照文献^[5]的方法,采用饱和蔗糖溶液漂浮法,取其表面液膜涂片,每个粪样制作 3 张涂片显微镜下($\times 400$)观察。隐孢子虫卵囊的鉴定参考文献^[3,5],每张涂片观察 10 个视野,发现卵囊即为阳性。平均每个视野 1~20 个卵囊表示为“+”,21~50 个卵囊表示为“++”,51~100 个卵囊表示为“+++”,100 个以上卵囊表示为“++++”,未发现卵囊者表示为“-”。

2 血样采集

根据奶牛粪检结果,选择隐孢子虫感染“++++”的奶牛作为感染组,取相同数量的粪检阴性的奶牛作为对照组。在早晨奶牛饲喂前经颈静脉采集血样,感染组和对照组奶牛均分别采集非抗凝血 10 ml 和抗凝血 10 ml。非抗凝血分离血清,-20℃保存备用。

3 免疫指标检测

3.1 中性粒细胞吞噬率检测

3.1.1 金黄色葡萄球菌菌液制备 用接种环挑取金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 接种于肉汤培养基中,37℃培养 12 h。再置于沸水中 10 min 杀死细菌,取无菌生理盐水将菌液稀释成 6×10^8 /ml,分装后,4℃保存备用。

3.1.2 测定 吸取抗凝血 60 μ l,放入培养管中加入

上述制备的葡萄球菌菌液 20 μ l,充分混匀。将培养管置于铺有湿布的有盖平皿内,置于 37℃ 30 min,其间每隔 10 min 摇匀一次。30 min 后,吸取一小滴液体于洁净载玻片上,推成薄片,待干后用甲醇固定,吉氏染色,油镜观察。计数 200 个中性粒细胞,记录吞噬葡萄球菌的细胞数,计算中性粒细胞吞噬率 = $200 \text{ 个中性粒细胞中吞噬细菌的细胞数} / 200 \times 100\%$ 。

3.2 T 淋巴细胞转化试验

3.2.1 淋巴细胞转化用培养管 RPMI 1640 培养基,过滤除菌后加入 20%胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和植物血凝素(PHA) 50 μ g/ml,按 1.9 ml/管分装。

3.2.2 测定 吸取肝素抗凝血 0.1 ml 加至淋巴细胞转化管中,摇匀,置 37℃培养 72 h,此间每天振摇 2 次。终止培养后,800 \times g 离心 5~10 min,去上清,加低渗液。每管 3 ml,再离心,去上清,取沉淀涂片。吉氏染色镜检,转化的淋巴细胞体积增大,约为原细胞的 3 倍,细胞核核膜清晰,核内染色质疏松呈网状,可见 1~3 个核仁,胞浆丰富,呈嗜碱性染色。记数 200 个淋巴细胞中发生转化的细胞数,计算 T 淋巴细胞转化率 = $200 \text{ 个淋巴细胞中转化的细胞数} / 200 \times 100\%$ 。

3.3 免疫球蛋白水平检测 免疫球蛋白(IgG、IgM 和 IgA)检测试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司,采用半自动生化分析仪(GF-D200 型,山东高密彩虹分析仪器有限公司)测定。

3.4 白细胞介素 2 (IL-2)水平检测 IL-2 放射免疫试剂盒购自北京福瑞生物工程公司。按照操作说明进行,使用智能放免测量仪(SN-695B 型,上海原子核研究所日环仪器一厂)进行检测。

4 抗氧化酶活性和 NO 水平检测

超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,按照操作说明进行,使用紫外可见分光光度计(UV-2501PC 型,日本岛津)测定吸光度值。

5 血液生化指标检测

血清中总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)、甘油三脂(TG)、氯离子(Cl⁻)和钙离子(Ca²⁺)检测试剂盒购自长春汇力生物技术有限公司,按照说明书操作,使用半自动生化分析仪测定。

6 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 奶牛隐孢子虫检测结果

采用饱和蔗糖溶液漂浮法共检测粪样 325 份，隐孢子虫感染率为 31.7% (103/325)。其中，感染度为“+”、“++”、“+++”和“++++”分别有 89、4、3 和 7 头，分别占阳性总数的 86.4%、3.9%、2.9%和 6.8%。

在生物显微镜下 (×400)，隐孢子虫卵囊呈椭圆或卵圆形，卵囊壁光滑，内无孢子囊，隐约可见 4 个香蕉形的子孢子和 1 团残体。随机测量 100 个卵囊，其大小为 (6.24~7.49) μm×(4.16~5.72) μm，平均为 (6.92±0.04) μm×(5.14±0.03) μm，卵形指数(长/宽)为 1.20~1.55，平均为 1.35。根据卵囊的形态和测量结果，初步鉴定为安氏隐孢子虫(*C. andersoni*) (图 1)。

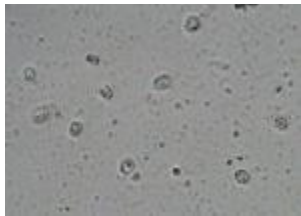


图 1 安徽奶牛源隐孢子虫卵囊 (×400)
Fig. 1 Oocysts of *Cryptosporidium* sp. from cow (×400)

2 免疫指标检测结果

检测 2 组奶牛血清中 IgG、IgM 和 IgA 的结果显示，感染组奶牛血清 IgG 水平 [(0.49±0.18) g/L] 较对照组 [(0.73±0.12) g/L] 降低了 32.9% ($P<0.05$)，2 组之间 IgM 和 IgA 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

感染组奶牛 T 淋巴细胞转化率、中性粒细胞吞噬率和 IL-2 含量分别比对照组降低了 22.0%、20.2%和 7.0% (均 $P<0.05$) (表 1)。

3 抗氧化酶活性和 NO 水平

检测 2 组奶牛血清抗氧化酶活性和自由基水平的结果显示，感染组血清 SOD 水平 [(131.33±5.49) U/ml] 比对照组 [(147.77±3.81) U/ml] 降低了 11.13%，MDA 和 NO 含量分别比对照组升高了 59.9% 和 28.1% (均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)，GSH-Px 含量 2 组之间差异无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 2)。

4 血液生化指标的检测结果

检测 2 组奶牛血清若干生化指标结果显示，感染组血清中 GLU、TG 和 Ca²⁺ 的含量分别较对照组升高了 11.1%、18.6% 和 78.9% (均 $P<0.05$)，2 组之间 TP、ALB、ALT、AST、ALP 和 Cl⁻ 含量差异无统计学

意义 (均 $P>0.05$) (表 3)。

表 1 奶牛免疫指标检测结果
Table 1 Detection of humoral immunity indexes in cows

检测项目 Item detected	对照组 Control group	感染组 Infection group
IgG/g·L ⁻¹	0.73±0.12	0.49±0.18*
IgM/g·L ⁻¹	0.50±0.03	0.42±0.84
IgA/g·L ⁻¹	0.21±0.01	0.19±0.03
T 淋巴细胞转化率/% T lymphocyte transformation rate/%	68.20±5.98	53.20±1.94*
中性粒细胞吞噬率/% Phagocytic rate of white blood cells/%	50.40±1.85	40.20±1.72*
IL-2/pg·ml ⁻¹	178.01±7.65	165.50±6.97*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。Note: Compared with control, * $P<0.05$ 。

表 2 奶牛血清抗氧化酶活性和自由基水平检测结果
Table 2 Detection of serum antioxidase activity and free radical level in cows

检测项目 Item detected	对照组 Control group	感染组 Infection group
超氧化物歧化酶 SOD/U·ml ⁻¹	147.77±3.81	131.33±5.49*
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/U·mg prot ⁻¹	169.22±15.82	124.25±9.78
丙二醛 MDA/nmol·ml ⁻¹	3.04±0.22	4.86±0.29*
一氧化氮 NO/μmol·L ⁻¹	34.40±1.02	44.07±5.63**

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。Note: Compared with control, * $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

表 3 奶牛血清生化指标检测结果
Table 3 Detection of other biochemistry indexes in cows

检测项目 Item detected	对照组 Control group	感染组 Infection group
总蛋白 TP/g·L ⁻¹	78.34±2.86	78.75±2.40
白蛋白 ALB/g·L ⁻¹	19.70±0.67	19.02±0.48
丙氨酸转氨酶 ALT/U·L ⁻¹	35.41±3.58	28.24±3.55
天冬氨酸转氨酶 AST/U·L ⁻¹	39.84±2.02	33.67±5.73
碱性磷酸酶 ALP/U·L ⁻¹	30.94±3.01	28.51±3.79
血糖 GLU/mmol·L ⁻¹	2.42±0.07	1.97±0.16*
甘油三酯 TG/mmol·L ⁻¹	0.71±0.02	0.15±0.04*
钙离子 Ca ²⁺ /mmol·L ⁻¹	2.48±0.05	2.12±0.07*
氯离子 Cl ⁻ /mmol·L ⁻¹	97.14±0.63	94.57±1.31

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。Note: Compared with control, * $P<0.05$ 。

讨 论

本实验采用饱和蔗糖溶液漂浮法检测了安徽省某奶牛场共 325 头奶牛粪样，其中 103 头奶牛的粪样中检出隐孢子虫卵囊，其感染率为 31.7%。所获隐孢子虫卵囊与梁楠等^[3]报道的安氏隐孢子虫形态特征一致，初步鉴定为安氏隐孢子虫。将未检出隐孢子虫卵囊的奶牛作为对照与高感染度的奶牛进行对比，发现两者

血液的部分指标存在差异。

据报道,血清 TP 和 ALB 低于正常值表明奶牛营养不良或吸收障碍,而高于正常值则表明有感染的发生^[6,7]。武林等^[4]研究发现,隐孢子虫感染奶牛的血清 ALB 浓度下降,但本研究显示,隐孢子虫感染奶牛血清 TP 和 ALB 变化不显著,表明该奶牛场隐孢子虫感染对奶牛机体可能尚未引起严重损伤。

IL-2 是由活化的 T 淋巴细胞产生并促进 T 淋巴细胞生长的因子,它是保障机体正常免疫功能的关键环节^[8]。本实验结果发现,感染组奶牛免疫球蛋白 IgG、T 淋巴细胞转化率、中性粒细胞吞噬率和 IL-2 等指标显著降低,表明感染隐孢子虫后,奶牛的免疫系统受到影响,机体免疫力降低。

SOD 和 GSH-Px 在机体的抗氧化方面起着重要的作用,SOD 主要功能是对氧自由基起歧化作用而分解生成 H₂O^[9],GSH-Px 中的巯基能与活性氧结合以终止脂质过氧化物的生成而保护组织细胞^[10]。体内 MDA 含量可反映出机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出组织细胞所受到的损伤^[11]。NO 作为一种自由基气体,可与超氧阴离子反应生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸盐,后者不仅自身具有毒性,引起脂质过氧化,抑制细胞线粒体氧化呼吸,而且能进一步形成多种毒性产物,继发组织损伤^[12]。实验结果显示,隐孢子虫感染奶牛血清中 SOD 和 GSH-Px 活性均降低(GSH-Px 变化无统计学意义),而 MDA 和 NO 含量显著升高,说明感染隐孢子虫使奶牛体内抗氧化系统衰竭而无法有效地清除过量产生的自由基。这也许是机体感染隐孢子虫后,临床症状持续加重的一个重要原因。

肝脏是动物含酶最丰富的脏器,酶含量约占肝总蛋白含量的 2/3。通过测定血清酶的活性变化能反应肝脏的病理状态。本研究发现,感染隐孢子虫奶牛血清 AST、ALT 和 ALP 等指标无显著性变化,而与武林等^[4]报道的结果有所差异。

血糖的测定对于判断糖代谢的情况及其代谢紊乱与相关疾病的诊断具有重要意义^[4]。TG 是血脂成分之一,测定血液中甘油三酯的浓度可用于诊断高脂血症。血钙浓度通过骨骼、肾脏和肠道之间进行调节,当骨骼和细胞外液钙的动态平衡被破坏时,就呈现出病态。本研究结果显示,感染隐孢子虫的奶牛会出现一定程度的低血糖、低血脂及吸收不良性低血钙。

由此可见,奶牛感染隐孢子虫以后,会引起抗氧化酶活性降低,清除体内自由基的能力减弱,机体免

疫力降低及相关营养物质代谢障碍。

参 考 文 献

[1] Liu H, Yuan ZY, Sheng YJ, *et al* Isolation of two strains of *Cryptosporidium* from bovines by 18S rRNA gene nested PCR-RFLP[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(2): 115-118. (in Chinese)
(刘晖, 袁忠英, 沈玉娟, 等. 18S rRNA 基因巢式 PCR-RFLP 分析两株牛源隐孢子虫分离株[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(2): 115-118.)

[2] Sun T, Liu W, Wang JH, *et al*. Isolation and identification of cow-origin *Cryptosporidium* isolates in Hefei[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2011, 29(6): 447-452. (in Chinese)
(孙涛, 刘维, 王菊花, 等. 合肥地区奶牛源隐孢子虫的分离与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(6): 447-452.)

[3] Liang N, Jian FC, Li JC, *et al*. Species identification of *Cryptosporidium* isolated from dairy cattle by PCR-RFLP and phylogenetic analysis[J]. Chin Vet Sci, 2009, 39(1): 22-28. (in Chinese)
(梁楠, 菅复春, 李家诚, 等. 乳牛源隐孢子虫种类的 PCR-RFLP 和分子种系发育分析鉴定[J]. 中国兽医学, 2009, 39(1): 22-28.)

[4] Wu L, Li PY, Xu QM, *et al*. The influence of some serum biochemical indexes on cows infected with *Cryptosporidium* [J]. Anim Husb Vet Med, 2009, 41(6): 59-61. (in Chinese)
(武林, 李培英, 徐前明, 等. 隐孢子虫感染对奶牛血清若干生化指标的影响[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(6): 59-61.)

[5] Li PY, Liao SF, Lu FL, *et al*. Cryptosporidial infection of cow and its regional distribution in Anhui Province [J]. Chin J Vet Sci, 1999, 19(3): 275-277. (in Chinese)
(李培英, 廖圣法, 陆凤琳, 等. 安徽省奶牛隐孢子虫感染情况及分布特点[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 275-277.)

[6] Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, *et al*. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* [J]. J Bacteriol, 2005, 187(8): 2715-2726.

[7] Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, *et al*. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species[J]. J Bacteriol, 2004, 186(15): 5040-5051.

[8] Chen XW. The influence of Chinese traditional herbal drugs on milking cow's immunity[J]. China Dairy Cattle, 2010, (7): 44-46. (in Chinese)
(陈现伟. 中草药制剂对泌乳奶牛机体免疫性能的影响[J]. 中国奶牛, 2010, (7): 44-46.)

[9] Sahoo SS, Patra RC, Behera PC, *et al*. Oxidative stress indices in the erythrocytes from lactating cows after treatment for subclinical ketosis with antioxidant incorporated in the therapeutic regime[J]. Vet Res Commun, 2009, 33(3): 281-290.

[10] Wang LY, Li ZH. Influence of heat stress on antioxidant index in peripheral blood of Holstein cow[J]. Hubei Agr Sci, 2010, 49(6): 1419-1421. (in Chinese)
(王丽袁, 李忠浩. 热应激对荷斯坦奶牛外周血抗氧化指标的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(6): 1419-1421.)

[11] Kwon OY, Lee JS, Choi HS, *et al*. Antioxidant and anticytokine effects of bovine colostrums in intestinal ischemia/reperfusion injured rat model[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(5): 1295-1301.

[12] Li DJ, Guo DZ, Pei XY. Relationship between NO of plasma and uterine secretion and morphological structure of uterine tissue in Holstein cow with endometritis[J]. Chin J Vet Sci, 2010, 30(5): 681-684. (in Chinese)
(李德军, 郭定宗, 裴小英. NO 与子宫内皮炎奶牛子宫形态结构变化的关系[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(5): 681-684.)

(收稿日期: 2012-02-20 编辑: 瞿麟平)