

# 毒害艾美尔球虫感染对雏鸡肠组织热休克蛋白-70 表达的影响

翟杰<sup>1</sup>, 吕志慧<sup>1,2</sup>, 马春霞<sup>1,3</sup>, 高雪丽<sup>1</sup>, 刘超男<sup>1</sup>, 王全杰<sup>1</sup>, 吕晓萍<sup>1</sup>, 郑世民<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 遵义医学院珠海校区, 珠海 519041;

3. 广西兽医研究所, 南宁 530001)

**摘要:** 将 90 只海兰褐雏鸡分为对照组、毒害艾美尔球虫(*E. necatrix*) 1 次感染组和 2 次感染组, 应用 SP 免疫组化法, 通过对热休克蛋白(HSP)-70 表达的检测, 较全面系统地研究了 *E. necatrix* 感染雏鸡后, 其肠组织 HSP-70 表达的动态变化。研究发现, 雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后第 5~9 天, 其肠组织 HSP-70 表达均不同程度的低于对照雏鸡, 其中十二指肠、空肠和盲肠显著或极显著低于对照雏鸡( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 之后迅速上升, 于第 14 天高于对照雏鸡并达峰值; *E. necatrix* 二次攻击性感染雏鸡后, 其十二指肠、空肠 HSP-70 表达呈现“先显著低于对照雏鸡, 随后上升”, 并逐渐高于对照雏鸡。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后, 其肠组织 HSP-70 表达则于第 6、10、15 天高于对照雏鸡。表明 *E. necatrix* 初期感染雏鸡肠组织 HSP-70 表达受到一定程度的抑制, 而 *E. necatrix* 大剂量感染雏鸡后, HSP-70 表达的增高与 *E. necatrix* 对机体的损害程度密切相关。该项研究为进一步探讨球虫的致病机制提供了重要参考依据。

**关键词:** 雏鸡; *E. necatrix*; 肠组织; HSP-70

中图分类号: S855.9

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)06-1004-07

## Effect of Infection of *E. necatrix* on Heat Shock Protein (HSP)-70 Expression in Intestinal Tissue of Broiler Chickens

ZHAI Jie<sup>1</sup>, LYU Zhi-hui<sup>1,2</sup>, MA Chun-xia<sup>1,3</sup>, GAO Xue-li<sup>1</sup>,

LIU Chao-nan<sup>1</sup>, WANG Quan-jie<sup>1</sup>, LYU Xiao-ping<sup>1</sup>, ZHENG Shi-min<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China;

3. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

**Abstract:** Ninety chickens were divided into *E. necatrix* one time infection group, *E. necatrix* twice infection group, and control group. We researched dynamic change of HSP-70 expression in intestinal tissue of chickens infected with *E. necatrix* applying immunohistochemical method. The results showed that the HSP-70 expression in intestinal tissue of twice infection chickens were lower than the control chickens by different degrees at the 5th to 9th days after primer infection, the HSP-70 expression of duodenum, jejunum and caecum were significant or very significant lower than control chickens ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), later rising rapidly, higher than control chickens at the 14th day and reached the peak; the HSP-70 expression in duodenum and jejunum of chickens showing a trend of significantly lower than control chickens at first, then gradually rising and higher than control chickens after the second challenge infection. But, the HSP-70 expression in

收稿日期: 2013-12-09

基金项目: 黑龙江省教育厅项目(12531015)

作者简介: 翟杰(1989-), 男, 河南延津人, 硕士生, 主要从事动物免疫病理研究, E-mail: blzhaijie@163.com

\* 通信作者: 郑世民, E-mail: zhengshiminbl@sohu.com

intestinal tissue of *E. necatrix* one time infection chickens was higher than control chickens at the 6th, 10th, 15th day. These indicate that the primer infection have a certain degree of inhibition of HSP-70 expression in intestinal tissue of chickens, and the increase of HSP-70 expression is closely related with the degree of damage on the body with *E. necatrix* infection. This study provides important reference for the further study of pathogenic mechanism of coccidian.

**Key words:** chicken; *E. necatrix*; intestinal tissue; HSP-70

鸡球虫病(coccidiosis)是一种影响全球养鸡业的主要寄生虫病<sup>[1-3]</sup>。艾美尔球虫侵入鸡体内,可引起机体肠上皮细胞的损伤,造成家禽的营养不良,严重影响鸡的生长,降低饲料转化率及生产性能,给养殖业带来巨大经济损失<sup>[4-5]</sup>。生理情况下,HSP-70 作为细胞内的分子伴侣参与蛋白质的正确折叠、组装和转运等生物过程<sup>[6-7]</sup>。当细胞受到病理压力时,如原生寄生虫感染等,HSP-70 会激活自然杀伤细胞、树突状细胞等抗原递呈细胞,介导 T、B 淋巴细胞的激活,从而提高机体对外来病原侵害的抵抗力<sup>[8-11]</sup>。目前,对于鸡球虫侵染引起机体免疫反应已做了大量的研究,并取得一定的成绩,但鸡球虫感染与 HSP-70 之间的关系,尤其是球虫感染对雏鸡肠道 HSP-70 表达的影响,迄今未见报道。本试验以 *E. necatrix* 为病原,对雏鸡感染 *E. necatrix* 后其肠道不同组织 HSP-70 表达的动态变化进行了较系统研究,以探讨球虫感染与雏鸡肠道 HSP-70 表达的相互关系,为鸡球虫病的免疫防治提供重要的参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原

*E. necatrix* 强毒株,由中国农业大学寄生虫教研室惠赠。

### 1.2 实验动物

1 日龄健康海蓝褐商品混合雏鸡,购自哈尔滨市某孵化场。经新城疫病毒、传染性法氏囊病毒、马立克病病毒、大肠杆菌、沙门菌、球虫卵囊分离检测均为阴性。

### 1.3 主要生物制剂和化学试剂

鼠抗鸡 HSP-70 单克隆抗体(MAC-HSP70) United States Biological, Inc. 产品;过氧化物酶标记的链酶卵白素(streptavidin/Peroxidase, SP)免疫组织化学试剂盒,购自北京中山金桥生物技术有限公司;胰蛋白酶,购自上海化学试剂站分装厂;3,3'-二氨基联苯二胺盐酸盐,购自上海试剂一厂;甲基

绿,北京化学试剂厂进口分装。

### 1.4 动物分组及处理

90 只雏鸡随机分为 3 组:对照组(C 组,35 只),*E. necatrix* 1 次感染组(Ⅱ组,20 只)和 2 次感染组(I 组,35 只)。其中,I 组雏鸡于 14 日龄经口初次感染 *E. necatrix*  $1 \times 10^3$  个卵囊·只<sup>-1</sup>,并于 28 日龄经口攻击性感染  $8 \times 10^4$  个 *E. necatrix* 卵囊·只<sup>-1</sup>;Ⅱ组雏鸡于 28 日龄经口 1 次大剂量感染  $8 \times 10^4$  个 *E. necatrix* 卵囊·只<sup>-1</sup>;C 组雏鸡未感染球虫。3 组雏鸡严格隔离,在相同条件下进行饲养管理。

### 1.5 被检材料采取及处理

C 组和 I 组雏鸡分别于第一次感染 *E. necatrix* 球虫卵囊后第 0、5、9、14、20、24 和 29 天,Ⅱ组雏鸡于 *E. necatrix* 球虫卵囊感染后第 0、6、10 和 15 天(对应 I 组第 14、20、24 和 29 天),每组随机抽取 5 只雏鸡。心脏采血处死,快速采取十二指肠、空肠、回肠和盲肠,置于 4 ℃冰箱预冷的 10%中性福尔马林缓冲溶液中,于 4 ℃冰箱中固定 24~26 h。常规水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,制片。

### 1.6 检测指标及方法

采用 SP 法检测 HSP-70 的表达。主要步骤:组织切片常规脱蜡、水化,再经 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶,0.1%胰蛋白酶 37 ℃抗原修复 15 min,滴加正常羊血清(试剂 A),37 ℃孵育 15 min,滴加一抗,4 ℃冰箱过夜,PBS 液洗涤,5 min×3 次,滴加生物素标记的二抗(试剂 B),37 ℃孵育 15 min,PBS 液洗涤,5 min×3 次,滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液(试剂 C),37 ℃孵育 15 min,PBS 液洗涤,5 min×3 次,DAB 显色,甲基绿复染,常规封片。每次染色均设一抗和二抗对照。

用 Olympus 生物显微镜观察切片并摄片,用 Image Proplus 5.0 图像系统测量软件对每张切片随机 5 个视野单位面积内 HSP-70 阳性细胞染色强度进行检测。

### 1.7 数据处理及统计分析

用 SPSS 11.5 软件对数据进行处理,用方差分

析比较组间差异,结果以平均值和标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 *E. necatrix* 感染雏鸡肠组织病理变化

*E. necatrix* 初次感染雏鸡,其小肠前段黏膜充血、肿胀;盲肠未见异常。*E. necatrix* 攻击性感染及大剂量感染雏鸡后,其小肠各段均呈现不同程度的气肿、长度变短,肠壁增厚,黏膜表面有大小不等的

出血点,肠腔内可见血性黏液性渗出物,十二指肠、空肠前段有大量淤血点和坏死灶,坏死灶周围黏膜呈暗红色;盲肠肿大,呈现典型的炎症反应。对照雏鸡肠组织未见异常。小肠病变及其计分结果详见表 1。

病理组织学检测发现:Ⅰ组雏鸡盲肠充血、肠管内有渗出物、但肠壁结构部分完整;空肠出血、黏膜结构完整、肠壁未见异常。Ⅱ组雏鸡盲肠黏膜受损,肠管肌层断裂坏死;空肠黏膜变性坏死,肠壁轻度受损。而对照组雏鸡上述被检组织未见异常(图 1)。

表 1 *E. necatrix* 感染雏鸡小肠病变记分

Table 1 Pathological changes score in small intestine of chickens infected with *E. necatrix*

| 感染后时间<br>Days after infection | 对照组<br>Control group |   |   | <i>E. necatrix</i> 2 次感染组<br><i>E. necatrix</i> twice infection group |    |    | <i>E. necatrix</i> 1 次感染组<br><i>E. necatrix</i> one time infection group |    |    |
|-------------------------------|----------------------|---|---|---|----|----|--|----|----|
| 第 0 天 The 0 day               | 0                    | 0 | 0 | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 第 5 天 The 5th day             | 0                    | 0 | 0 | +1  | +1 | +1 | 0  | 0  | 0  |
| 第 9 天 The 9th day             | 0                    | 0 | 0 | +2  | +1 | +1 | 0  | 0  | 0  |
| 第 14 天 The 14th day           | 0                    | 0 | 0 | +2  | +2 | +1 | 0  | 0  | 0  |
| 第 20 天 The 20th day           | 0                    | 0 | 0 | +2  | +3 | +2 | +2   | +3 | +3 |
| 第 24 天 The 24th day           | 0                    | 0 | 0 | +1  | +2 | +1 | +2   | +1 | +2 |
| 第 29 天 The 29th day           | 0                    | 0 | 0 | +2  | +2 | +2 | +1   | +2 | +3 |

记分:0 分,无肉眼病变;+1 分,小肠中部浆膜面有散在针尖状出血点或白色斑点,但黏膜损伤不明显;+2 分,小肠中部浆膜面有多量出血点,并中部肠管稍充气;+3 分,小肠肠腔大量出血,浆膜面见有红色或白色斑点,黏膜粗糙,增厚,有多量针尖状出血点;+4 分,小肠呈暗红色、褐色,大部分肠管气胀明显,黏膜增厚加剧,死亡鸡只病灶为白色和黑色,呈“盐与黑胡椒”状外观

score;0 score,no visible lesion;+1 score,the serosal surface of central section have needle like bleeding points or white spots but no obvious mucosal injury;+2 score,the serosal surface of central section have many bleeding points and intestinal canal of central section were slightly inflatable;+3 score,enteric cavity have massive bleeding,serosal surface have bleeding points or white spots,mucosal injury changes rough,thick and have many needle like bleeding points;+4 score,the small intestine were dull red or brown,obvious flatulence,mucosal thickening were aggravated,foci of died chickens were white,black and salt and black pepper like appearance

### 2.2 *E. necatrix* 感染雏鸡肠组织 HSP-70 表达变化

2.2.1 *E. necatrix* 感染雏鸡肠组织 HSP-70 表达的免疫组织化学染色 雏鸡肠组织 HSP-70 表达在阳性部位呈棕黄色颗粒。阳性颗粒大多出现在肠绒毛内,胞质、胞核均有阳性表达,以胞质表达为主,感染组和对照组均有表达。由图 2、3 显示 *E. necatrix* 感染雏鸡肠组织 HSP-70 阳性表达强于对照雏鸡,其强度分析结果详见表 2。

2.2.2 *E. necatrix* 感染雏鸡十二指肠 HSP-70 表达变化 *E. necatrix* 初次感染雏鸡,其十二指肠

HSP-70 表达下降,于第 5 天显著低于对照雏鸡( $P < 0.05$ ),之后开始上升,于第 14 天极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ ),并达峰值;*E. necatrix* 攻击性感染雏鸡后,其十二指肠 HSP-70 表达开始下降,于第 24 天显著低于对照雏鸡( $P < 0.05$ ),之后开始上升,第 29 天(按第 1 次感染计,下同)虽然高于对照雏鸡,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后,其十二指肠 HSP-70 表达上升,于第 10 天(对应Ⅰ组第 24 天)极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ ),之后逐渐下降,但依然高于对照雏鸡。

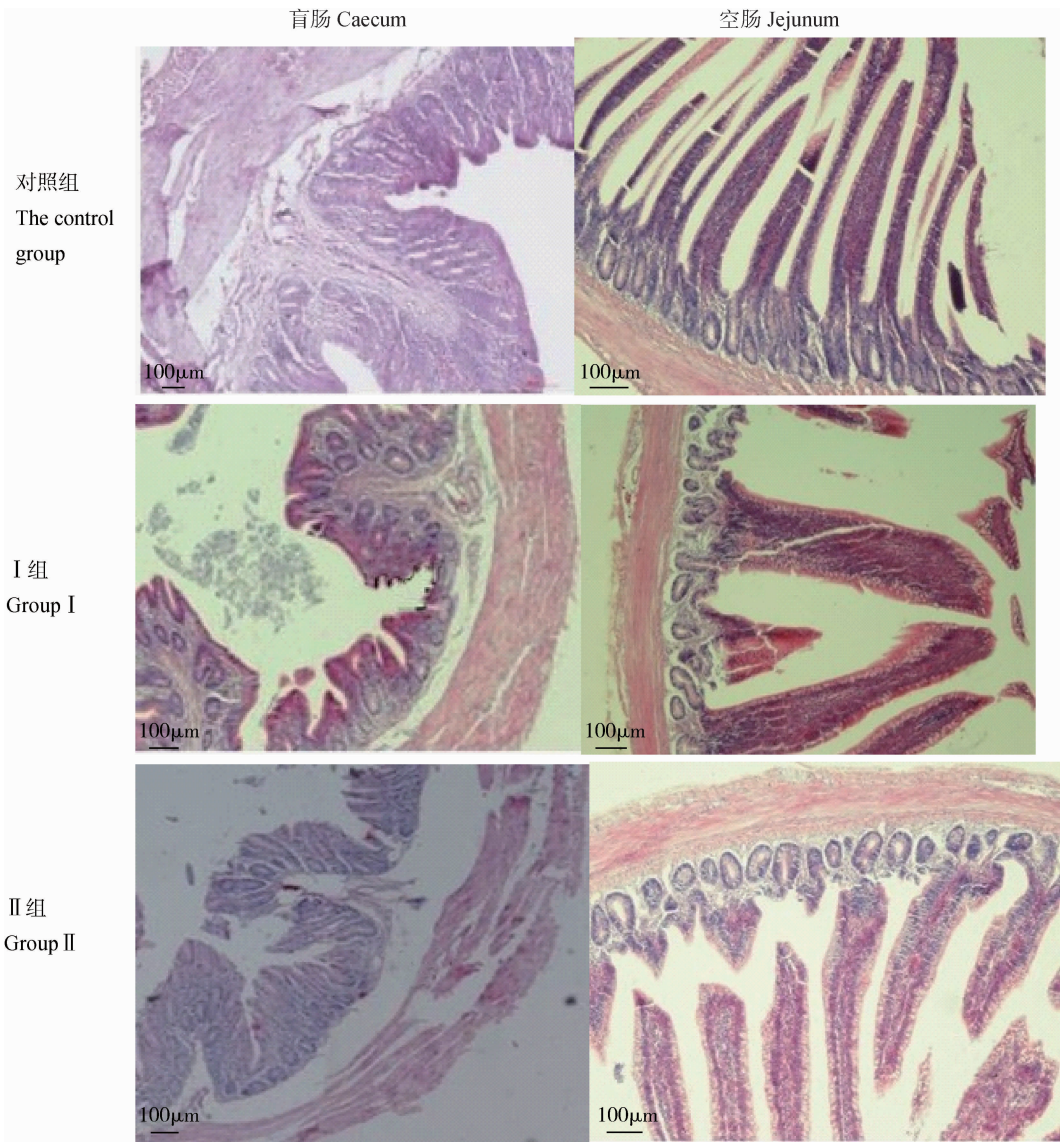


图 1 *E. necatrix* 感染及对对照雏鸡盲肠和空肠的组织病理变化(HE 10×10)

Fig. 1 The histopathological change of caecum and jejunum of chicken (HE 10×10)

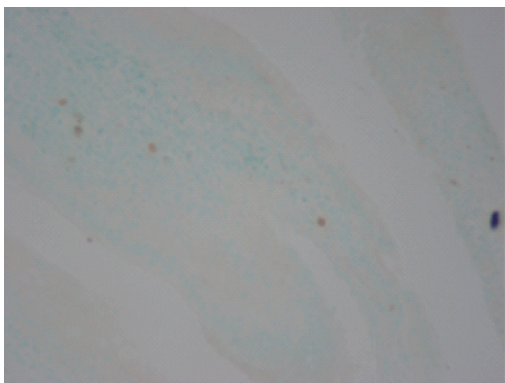


图 2 *E. necatrix* 感染雏鸡肠 HSP-70 阳性表达细胞(SP, 400×)

Fig. 2 The positive cells expressing HSP-70 in intestinal tissue of chickens infected with *E. necatrix* (SP, 400×)

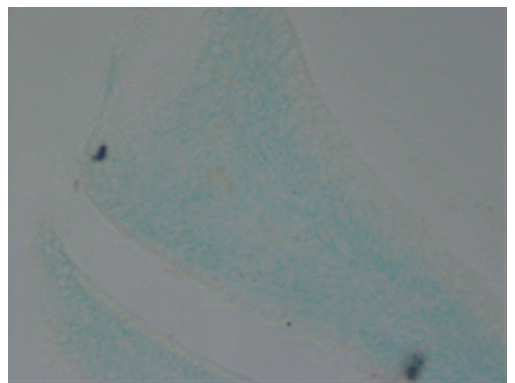


图 3 对照雏鸡肠 HSP-70 阳性表达细胞(SP, 400×)

Fig. 3 The positive cells expressing HSP-70 in intestinal tissue of control chickens (SP, 400×)

表 2 雏鸡各肠段 HSP-70 阳性表达染色强度分析结果

Table 2 The analysis result of the positive expression strength of intestinal tissue in chicken

| 感染后时间<br>Days after infection | 组别<br>Group | 十二指肠<br>Duodenum        | 空肠<br>Jejunum           | 回肠<br>Ileum             | 盲肠<br>Caecum            |
|-------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 第 0 天<br>The 0 day            | C           | 28 565±286 <sup>a</sup> | 25 506±721 <sup>a</sup> | 15 452±229 <sup>a</sup> | 24 901±501 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 28 565±286 <sup>a</sup> | 25 506±721 <sup>a</sup> | 15 452±229 <sup>a</sup> | 24 901±501 <sup>a</sup> |
| 第 5 天<br>The 5th day          | C           | 28 745±793 <sup>a</sup> | 26 598±532 <sup>a</sup> | 18 055±734 <sup>a</sup> | 25 502±545 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 28 564±746 <sup>b</sup> | 23 375±118 <sup>c</sup> | 18 216±582 <sup>a</sup> | 24 773±821 <sup>c</sup> |
| 第 9 天<br>The 9th day          | C           | 28 793±457 <sup>a</sup> | 29 637±590 <sup>a</sup> | 18 739±828 <sup>a</sup> | 26 475±347 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 28 720±106 <sup>a</sup> | 23 308±418 <sup>c</sup> | 18 603±423 <sup>a</sup> | 26 316±232 <sup>a</sup> |
| 第 14 天<br>The 14th day        | C           | 29 074±39 <sup>a</sup>  | 30 821±118 <sup>a</sup> | 18 980±725 <sup>a</sup> | 27 889±722 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 29 359±586 <sup>c</sup> | 31 009±278 <sup>a</sup> | 20 027±224 <sup>c</sup> | 28 543±556 <sup>c</sup> |
|                               | II          | 29 074±39 <sup>a</sup>  | 30 821±114 <sup>a</sup> | 18 980±725 <sup>a</sup> | 27 889±562 <sup>a</sup> |
| 第 20 天<br>The 20th day        | C           | 29 234±505 <sup>a</sup> | 29 265±225 <sup>a</sup> | 17 239±675 <sup>a</sup> | 27 315±589 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 29 285±267 <sup>a</sup> | 29 474±196 <sup>a</sup> | 17 192±471 <sup>a</sup> | 27 227±809 <sup>a</sup> |
|                               | II          | 26 264±520 <sup>a</sup> | 31 087±137 <sup>c</sup> | 17 415±401 <sup>b</sup> | 27 278±874 <sup>a</sup> |
| 第 24 天<br>The 24th day        | C           | 29 215±442 <sup>a</sup> | 28 048±699 <sup>a</sup> | 16 507±302 <sup>a</sup> | 27 184±459 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 29 060±706 <sup>b</sup> | 25 857±379 <sup>c</sup> | 18 215±916 <sup>c</sup> | 28 601±757 <sup>c</sup> |
|                               | II          | 29 385±534 <sup>c</sup> | 28 105±148 <sup>a</sup> | 18 180±519 <sup>c</sup> | 27 398±860 <sup>a</sup> |
| 第 29 天<br>The 29th day        | C           | 28 436±188 <sup>a</sup> | 23 217±205 <sup>a</sup> | 15 141±900 <sup>a</sup> | 26 338±739 <sup>a</sup> |
|                               | I           | 28 615±191 <sup>a</sup> | 25 618±636 <sup>c</sup> | 17 377±128 <sup>c</sup> | 27 990±428 <sup>c</sup> |
|                               | II          | 28 590±146 <sup>a</sup> | 24 759±714 <sup>c</sup> | 17 604±864 <sup>c</sup> | 27 019±681 <sup>c</sup> |

C. 对照组; I. *E. necatrix* 2 次感染组; II. *E. necatrix* 1 次感染组。两组数据之间, 字母相同者表示差异不显著 ( $P>0.05$ ); 字母相邻者表示差异显著 ( $P<0.05$ ); 字母相隔者表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。感染后时间统一按 I 组时间处理

C. The control group; I. The *E. necatrix* twice infection group; II. The *E. necatrix* one time infection group. Two sets of data which have the same letter show no significant difference ( $P>0.05$ ), which have the adjacent letter show significant difference ( $P<0.05$ ), which have the apart letter show highly significant difference ( $P<0.01$ ). Days after infection were processed according to that of the group I

### 2.2.3 *E. necatrix* 感染雏鸡空肠 HSP-70 表达变化

*E. necatrix* 初次感染雏鸡后第 5~9 天, 其空肠 HSP-70 表达极显著低于对照雏鸡 ( $P<0.01$ ), 随后逐渐增加, 于第 14 天高于对照雏鸡, 但无统计学差异 ( $P>0.05$ ); *E. necatrix* 攻击性感染雏鸡后, 其空肠 HSP-70 表达逐渐下降, 并于第 24 天极显著低于对照雏鸡 ( $P<0.01$ ), 之后迅速上升, 至第 29 天极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.01$ )。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后, 其空肠 HSP-70 表达迅速上升, 于第 6 天极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.01$ ), 随后有所下降, 但第 10 天时仍高于对照雏鸡, 之后至第 15 天极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.01$ )。

### 2.2.4 *E. necatrix* 感染雏鸡回肠 HSP-70 表达变化

*E. necatrix* 初次感染雏鸡后 5~9 天, 其回肠 HSP-70 表达与对照雏鸡无统计学差异 ( $P>0.05$ ), 随后迅速上升, 至第 14 天极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.01$ ); *E. necatrix* 攻击性感染雏鸡后, 其回肠 HSP-70 表达于第 20 天虽然低于对照雏鸡, 但无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 随后迅速上升, 第 24、29 天均极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.01$ )。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后, 其回肠 HSP-70 表达于第 6、10、15 天均显著或极显著高于对照雏鸡 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

### 2.2.5 *E. necatrix* 感染雏鸡盲肠 HSP-70 表达变化

*E. necatrix* 初次感染雏鸡后盲肠 HSP-70 表

达于第 5、9 天均低于对照雏鸡,且第 5 天差异极显著( $P < 0.01$ ),随后逐渐上升,至第 14 天极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ );*E. necatrix* 攻击性感染雏鸡后,其盲肠 HSP-70 表达于第 20 天低于对照雏鸡,之后迅速上升,第 24、29 天极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ )。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后 6~10 天,其盲肠 HSP-70 表达尽管高于对照雏鸡,但无统计学差异( $P > 0.05$ ),至第 15 天极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ )。

### 3 讨 论

热休克蛋白(HSP)-70 普遍存在于原核和真核细胞中,发挥分子伴侣的作用,其结构具有高度保守性<sup>[12]</sup>。HSP-70 的基本功能是参与蛋白质的折叠和非折叠,维持蛋白质的正常结构以发挥蛋白质的正常功能<sup>[13]</sup>。当某些因素(如细胞损伤)及环境压力作用于机体后,HSP-70 表达及分泌可升高<sup>[14]</sup>,其通过旁分泌和自分泌机制<sup>[15]</sup>由细胞内游离到细胞外参与机体的免疫功能。

本研究发现,*E. necatrix* 未感染对照雏鸡,其肠上皮中有一定量的 HSP-70 基础表达,以发挥保护性分子伴侣的功能,不但使新生蛋白正确折叠,而且可使已变性的蛋白发生再折叠,以维护细胞功能与生存。雏鸡于 14 日龄经口初次感染 *E. necatrix*  $1 \times 10^3$  个卵囊·只<sup>-1</sup>后第 5、9 天,其肠组织 HSP-70 表达均不同程度低于对照雏鸡(回肠除外),其中,空肠和盲肠 HSP-70 表达明显低于对照雏鸡,随后升高,于第 14 天均高于对照雏鸡,十二指肠、回肠和盲肠 HSP-70 表达极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ )。贾长河等<sup>[16]</sup>研究发现,HSP-70 在大鼠诱导性急、慢性胃溃疡、慢性萎缩性胃炎及人胃癌的胃黏膜中均有过度表达,而且以病变部位最明显。而陈国裕等<sup>[17]</sup>发现,HSP 的过度表达,可增加胃黏膜血流量、促进细胞增殖、抑制胃黏膜细胞凋亡、保护细胞免受氧自由基损伤、加强胃黏膜细胞蛋白合成和细胞修复等,从而达到保护细胞的作用以促进溃疡愈合。本研究结果显示,雏鸡感染 *E. necatrix* 后,其肠 HSP-70 表达呈现先下降后上升并过表达的趋势。这与贾长河等<sup>[16]</sup>研究结果中大鼠胃黏膜 HSP-70 过表达不完全一致,表明 HSP-70 在热盐水所致胃黏膜损伤与其在球虫感染中发挥作用的机制有所不同。W. Y. Yu 等<sup>[18]</sup>研究发现,鸡 HSP-70 DNA 疫苗可以抑制犬癌症模型肿瘤的生长,而在 *E. ne-*

*catrix* 感染雏鸡初期,其 HSP-70 基因或者其转录产物 mRNA 会起到反义寡核苷酸的作用与鸡 HSP-70 基因作用导致其 HSP-70 基因沉默,这可能与 *E. necatrix* 入侵及其定植到细胞内的机制有关。之后 *E. necatrix* 卵囊从细胞内释放导致细胞损伤,HSP-70 的表达增加,一方面可以促进肠黏膜血流量、促进细胞增殖、抑制肠黏膜细胞凋亡、保护细胞免受氧自由基损伤、加强肠黏膜细胞蛋白合成和细胞修复等,从而达到保护细胞的作用以促进溃疡愈合;另一方面介导 T、B 淋巴细胞的激活从而提高机体抵抗球虫感染的能力。

14 日龄初次感染 *E. necatrix* 雏鸡在 28 日龄攻击性感染雏鸡后,其肠组织 HSP-70 表达均呈现先下降后上升趋势,其中,回肠和盲肠 HSP-70 表达于第 20 天(按第 1 次感染计,下同)低于对照雏鸡,之后迅速上升,于第 24、29 天极显著高于对照雏鸡( $P < 0.01$ ),而十二指肠和空肠则于第 24 天显著低于对照雏鸡,之后上升,并于感染后第 29 天高于对照组雏鸡。而 *E. necatrix* 1 次大剂量感染雏鸡后,其肠组织 HSP-70 表达于第 6、10、15 天均高于对照雏鸡。表明雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后,其体内产生了抵抗 *E. necatrix* 感染的免疫保护,当 *E. necatrix* 再次攻击性感染雏鸡时,并没有导致鸡肠组织的严重损伤,而只是 *E. necatrix* 在入侵及定植过程中造成 HSP-70 基因沉默,故 HSP-70 表达出现先降低之后表达升高。而 *E. necatrix* 大剂量感染雏鸡,可直接造成肠组织较为严重的损伤,导致 HSP-70 的表达直接升高。

综上所述,球虫入侵及定植细胞可导致 HSP-70 基因表达的暂时性沉默,而小剂量 *E. necatrix* 感染可给鸡带来一定的免疫保护,大剂量 *E. necatrix* 感染可导致鸡肠组织的直接损伤。

### 4 结 论

*E. necatrix* 入侵及定植细胞可导致 HSP-70 基因表达的暂时性沉默,小剂量 *E. necatrix* 感染对鸡有一定的免疫保护,大剂量 *E. necatrix* 感染可导致鸡肠组织的直接损伤。

### 参考文献:

- [1] ALLEN P C, FETTERER R H, Fetterer. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with



- these coccidian parasites of poultry [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(1): 58-65.
- [2] SHIRLEY M W, LILLEHOJ H S. The long view: a selective review of 40 years of coccidiosis research [J]. *Avian Pathol*, 2002, 41(2): 111-121.
- [3] WILLIAMS R B. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002) [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(4): 775-802.
- [4] 刘贤勇, 索 勋. 鸡球虫病及其控制策略 [J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(5): 31-37.
- [5] 杨雪峰, 钟 华, 赵东豪. 鸡球虫病及其防治措施 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(20): 5257-5258.
- [6] MAYER M P, BUKAU B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 670-684.
- [7] WEGELE H, MÜLLER L, BUCHNER J. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2004, 151: 1-44.
- [8] MULTHOFF G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance [J]. *Methods*, 2007, 43(3): 229-237.
- [9] STANGL S, WORTMANN A, GUERTLER U, et al. Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/Beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(10): 6270-6276.
- [10] BINDER R J, SRIVASTAVA P K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 593-599.
- [11] JOLESCH A, ELMER K, BENDZ H, et al. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system [J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(1): 48-52.
- [12] BONOMO J, WELSH J P, MANTHIRAM K, et al. Comparing the functional properties of the Hsp70 chaperones, DnaK and BiP [J]. *Biophys Chem*, 2010, 149(1-2): 58-66.
- [13] YOUNG J C, AGASHE V R, SIEGERS K, et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 781-791.
- [14] BENDZ H, RUHLAND S C, PANDYA M J, et al. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43): 31688-31702.
- [15] MAMBULA S S, STEVENSON M A, OGAWA K, et al. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader [J]. *Methods*, 2007, 43(3): 168-175.
- [16] 贾长河, 张 沥, 张玲霞, 等. 热盐水所致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜 HSP 及 p53 蛋白的表达 [J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(1): 29-32.
- [17] 陈国裕, 王志荣, 陈锡美. 热休克蛋白在胃黏膜保护中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(8): 969-971.
- [18] YU W Y, CHUANG T F, GUICHARD C, et al. Chicken HSP70 DNA vaccine inhibits tumor growth in a canine cancer model [J]. *Vaccine*, 2011, 29(18): 3489-3500.

(编辑 白永平)