

善表层土壤的物理性状,与不种草对照区相比,套种高羊茅、鸭茅、多年生黑麦草平均降低土壤容重 1.12%、2.06%、2.94%。土壤容重的变化规律与各类牧草的根系分布和更新有密切关系。果林套种高羊茅、鸭茅、多年生黑麦草后土壤中有效 N、P、K 的含量不但没有减少,反而增加,其中速效磷含量分别比不种草对照增加 0.26、0.07、0.52 mg/kg;碱解氮含量分别比对照区增了 6.97、12.15、19.22 mg/kg,速效钾含量增加了 29.0、34.5、131.0 mg/kg。

3 讨论

利用果林行间套种生产饲草,建立果林与牧草套种复合生产体系^[10-11],不仅可以充分利用果地的空闲地扩大饲草饲料生产,而且能缓和农区的饲草饲料短缺问题,同时促进农区养殖业的发展,从而增加林果业的有机肥源,有助于建立果-草-畜-肥生态农业生产体系,为提高综合经济效益提供机遇。

一般在大田人工种植鸭茅、高羊茅、黑麦草等多年生牧草,其鲜草产量可达 45 000 kg/hm²^[12]以上,北方的苏丹草鲜草产量可达到 45 000~60 000 kg/hm²^[13-14]。本研究在库尔勒香梨园套种多年生和一年生牧草高羊茅、黑麦草、鸭茅、苏丹草,每年刈割 2 次,鲜草最高年产量分别达到 28 399.5、27 949.5、36 229.5、34 017.0 kg/hm²,虽然年产量低于人工草地的最低标准,但在林草的管理上能够优先照顾果树,从 2012 年第一茬的变化可以发现,在没有灌水的情况下,高羊茅和鸭茅只是产量减少,并没有出现死亡现象;一年生牧草虽然在干草产量上是多年生牧草的 2~3 倍,但是牧草草质却比不上多年生牧草,同时第二年必须对一年生牧草种草区进行重建。

香梨根系分布因树龄、栽植密度而不同,一般情况下,香梨根系分布在深 100 cm 左右土层内^[15]。本研究结果表明,香梨套种的各种牧草根系分布主要集中在 0~20 cm 土层,与果树根系在空间尺度上不重叠,不会与果树出现营养竞争。董素钦认为果园套种牧草形成覆盖,减少土壤水分蒸发,保持土壤水分,有利于土壤含水量的提高,而且能有效地提高果园土壤有机质、速效氮、速效磷、速效钾的含量,从而改良土壤性状,提高土壤肥力^[16]。郝淑英等在果园种草覆盖对土壤物理性状的研究中也得到类似的结果^[17]。本研究中表层土壤容重低于不种草对照区,说明套种牧草后果园地表土壤的物理性状发生了变化,种草区土壤含水量以及土壤中碱解氮、速效钾、速效磷的含量均比不种草对照区高。这一变化不仅达到保持土壤水分的目的,而且能够改善土壤库中 N、P、K 实际供给能力,活化土壤中有机关 N、P、K,有利于果树对 N、P、K 营养元素的吸收利用,保证果树的生长。套种一年生苏丹草对

土壤养分的影响有待进一步研究。

本研究结果表明,多年生黑麦草因在南疆气候条件下无越冬能力,不适合套种利用。鸭茅和高羊茅的干草产量可达 4 000 kg/hm²,可以在香梨果园套种生产利用。一年生牧草苏丹草与香梨套种后的鲜草产量可达 30 000 kg/hm²以上,虽然产量低于大田生产标准,但通过及时刈割,限制牧草生长高度,使收获的牧草正处于营养生长阶段,可生产品质较高的牧草产品。

参考文献:

- [1] 高启明,侯江涛,李 疆. 库尔勒香梨生产现状与研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(2):233-236.
- [2] 蒋光毅,史东梅,刘玉民,等. 2 种果草模式根系生态学特征研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(2):128-131.
- [3] 孟 林,俞立恒,毛培春,等. 苹果园间种鸭茅和白三叶对园区小环境的影响[J]. 草业科学,2009,26(8):132-136.
- [4] 王有年,邢广宏,张铁强,等. 间种牧草枣园害虫与天敌群落优势种的演替与 IPM 决策[J]. 生态学报,2007,27(4):1530-1541.
- [5] 李会科,赵政阳,张广军. 种植不同牧草对渭北苹果园土壤肥力的影响[J]. 西北林学院学报,2004,19(2):31-34.
- [6] 李会科,张广军,赵政阳,等. 黄土高原旱地苹果园生草对土壤贮水的影响[J]. 草地学报,2007,15(1):76-81.
- [7] 张先来,李会科,张广军,等. 种植不同牧草对渭北苹果园土壤水分影响的初步分析[J]. 西北林学院学报,2005,20(3):56-59,61.
- [8] 李建刚,王继和,蒋志荣. 庄浪县林农和林草间作模式经济效益评价[J]. 中国水土保持科学,2007,5(4):56-61.
- [9] 朱进忠. 草业科学实践教学指导[M]. 北京:中国农业出版社,2009:375-391.
- [10] 孟 林. 果园生草技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [11] 李国怀,章文才,刘继红,等. 柑桔园生草栽培的生态效应研究[J]. 生态学杂志,1997,16(6):7-12.
- [12] 兰吉勇,李学森,张学洲,等. 8 个多年生禾本科牧草引种试验[J]. 草食家畜,2011(2):68-70.
- [13] 翟振萍,史丰疆,郭红涛,等. 优良高产牧草引种及栽培技术研究[J]. 中国种业,2011(5):50-52.
- [14] 孙吉茹,杨青林,桑利民,等. 国内外牧草引种试验总结报告[J]. 种子世界,2012(3):27-28.
- [15] 武 阳,王 伟,黄兴法,等. 亏缺灌溉对成龄库尔勒香梨产量与根系生长的影响[J]. 农业机械学报,2012,43(9):78-84.
- [16] 董素钦. 果园套种牧草对生态环境、培肥地力的影响[J]. 现代农业科技,2006(23):11-12.
- [17] 郝淑英,刘蝴蝶,牛俊玲,等. 黄土高原区果园生草覆盖对土壤物理性状、水分及产量的影响[J]. 土壤肥料,2003(1):25-27.

郭凡溪,钱林东,刘腾飞,等. 恩诺沙星联合脂多糖致复合式鸡肝损伤模型的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):212-214.

恩诺沙星联合脂多糖致复合式鸡肝损伤模型的建立

郭凡溪¹, 钱林东², 刘腾飞¹, 耿智霞¹, 蒋 凡¹, 余祖功¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 云南农业职业技术学院, 云南昆明 650212)

摘要:旨在建立恩诺沙星联合脂多糖诱发鸡肝的损伤模型,从而为家禽用护肝药物提供研究基础。先分别给予海蓝蛋鸡不同浓度的恩诺沙星(E_1 至 E_7 组,浓度分别设为 50、80、100、200、300、400、500 mg/kg,1 次/d,连续灌服 3 d)、脂多糖粗提液(LPS, L_1 至 L_7 组,浓度设为 1、2、4、6、8、10、15 mL/kg,腹腔注射 1 次)处理,初步筛选出二者各自致肝损伤的剂量;在此基础上确定使用 100 mg/kg 恩诺沙星(1 次/d,连续灌服 3 d)联合腹腔注射 2、4、6 mL/kg 脂多糖(腹腔注射 1 次)进行处理,以 48 h 鸡存活率、血清生化指标及肝组织病理学变化为筛选依据。结果表明: E_4 至 E_7 和 L_5 至 L_7 组鸡出现死亡, E_3 和 L_2 至 L_4 组鸡全部成活,但谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性水平上升明显,肝细胞病变明显, E_1 、 E_2 和 L_1 组变化不明显;100 mg/kg 恩诺沙星联合 4 mL/kg 脂多糖组细胞病变明显,使得谷丙转氨酶、谷草转氨酶、球蛋白升高,总蛋白、白蛋白、白球比显著降低,因此可作为新型复合式肝损伤模型用于家禽肝损伤机制和护肝药物作用机理的研究。

关键词:肝损伤;恩诺沙星;脂多糖;鸡;动物模型

中图分类号: S859.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0212-03

合适的肝损伤动物模型是研究肝损伤病理、评价护肝药物作用及机制的基础。目前已有多种肝损伤动物模型,单独诱导常用的有脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、 CCl_4 、对乙酰氨基酚、刀豆蛋白 A、乙醇等^[1-2];复合式诱导常用的有脂多糖联合卡介苗或 D-半乳糖胺、乙醇、 CCl_4 联合刀豆蛋白等^[2-4],但是未有关于脂多糖联合抗菌药物诱导肝损伤模型的报道。已有报道表明,氟喹诺酮类药物和内毒素皆具有肝毒性^[1,5-6],均可致肝损伤,且氟喹诺酮类药物在杀灭革兰氏阴性菌时会诱发内毒素增加释放^[7-8]。由于在集约化家禽养殖实践中,细菌感染较为多见,而抗菌药物的大量使用甚至滥用现象普遍,因此临床家禽的肝损伤较为常见,其诱发原因也较为复杂。本研究模拟了家禽的养殖实践,尝试用恩诺沙星联合脂多糖来诱发鸡肝损伤,以期研究家禽肝损伤病理演变、丰富肝损伤的动物模型、研究家禽护肝药物的作用机制奠定模型基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与仪器 恩诺沙星($\geq 99.0\%$,浙江国邦药业有限公司);鸡致病性大肠杆菌(临床分离株,由江苏省农业科学院李银研究员惠赠);超声波细胞粉碎机(XO-650D,南京先欧仪器制造有限公司);低速大容量多管离心机(LD-II B,无锡市瑞江分析仪器有限公司),分光光度计(Smart-Spec3000, BIO-RAD)。

收稿日期:2013-01-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31172282)。

作者简介:郭凡溪(1988—),女,河南焦作人,硕士研究生,从事新兽药研发工作。E-mail:sensen12205@163.com。

通信作者:余祖功,副教授,主要从事新兽药药理研究及兽药新制剂的研发工作。E-mail:yuzugong@njau.edu.cn。

1.1.2 试验动物 1 日龄海蓝蛋鸡 200 羽,雌雄各半,购自南京汤泉鸡场。饲喂不含任何药物的饲料,至 5 月龄时体重(1 ± 0.2) kg 时备用。

1.2 试验方法

1.2.1 脂多糖粗提液的制备 参照霍晓青等的方法^[9-10],脂多糖粗提液的制备过程为:(1)将鸡致病性大肠杆菌复苏后接种于营养肉汤中,于 37℃ 扩大培养 24 h 后收集细菌悬液;(2)3 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 pH 值 7.4、0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,稀释为细菌数为 2.0×10^9 个/mL 的浓菌液;(3)浓菌液用超声波细胞粉碎机($\varphi 10$, 75%)粉碎 40 min 后于 5 000 r/min 离心 10 min;(4)上清液用微孔滤膜($0.22 \mu m$)过滤,滤液煮沸 10 min 即得脂多糖粗提液,取适量溶液于显微镜下观察无完整菌体即可,4℃ 保存备用。

1.2.2 恩诺沙星、脂多糖诱导肝损伤剂量的筛选 取健康鸡 150 羽,雌雄各半,平均分成 15 组,每组 10 羽。按照不同的剂量将恩诺沙星损伤试验分为 7 组(E_1 至 E_7),对应的灌胃剂量分别为 50、80、100、200、300、400、500 mg/kg,1 次/d,连续 3 d。按照不同的剂量将脂多糖损伤试验分为 7 组(L_1 至 L_7),对应的脂多糖粗提液量分别为 1、2、4、6、8、10、15 mL/kg,腹腔注射 1 次。对照组用生理盐水代替药物作相同处理。观察给药后鸡的精神状态、死亡情况,并于最后一次给药后 48 h 采血检测鸡血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性水平的变化,剖检,苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织的病理变化。

1.2.3 确定恩诺沙星联合脂多糖诱导肝损伤模型的建立方法 取健康鸡 40 羽,雌雄各半,平均分成 4 组,每组 10 羽,其中 3 组连续灌服恩诺沙星(100 mg/kg,1 次/d),第 3 天灌药时再分为 3 组(EL_1 至 EL_3)进行腹腔注射 LPS 粗提液,注射剂量分别为:2、4、6 mL/kg;对照组用生理盐水代替药物作相同处理。观察鸡的精神状态、存活情况,并于腹腔注射脂多糖粗提液后 48 h 采血,检测血清 ALT、AST、总蛋白(TP)、白蛋白

(ALB)、球蛋白(GLB)、白球比(A/G)水平的变化,剖检肝脏。

1.2.4 数据分析 所得数据使用统计学软件 SPSS 19.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 试验鸡投药后的临床表现

与空白组相比,给药 48 h 后,恩诺沙星损伤试验组中: E₁、E₂ 组鸡无明显症状;E₃、E₄ 组存活鸡的精神沉郁,采食饮水下降,出现缩头现象,羽毛无光泽,E₄ 组鸡症状表现更重且有死亡;E₅ 至 E₇ 组鸡全部死亡。脂多糖损伤试验组中,L₁ 组全部成活,但精神不好;L₂ 至 L₄ 组全部成活,但不进食,排白色稀粪,羽毛蓬松,站立不稳;L₅ 组存活 3 羽,L₆、L₇ 组鸡全部死亡。

2.2 恩诺沙星、脂多糖诱导肝损伤鸡血清 ALT 和 AST 活性水平变化

由表 1 可以看出,与空白组相比,E₁ 组鸡血清 ALT、AST 活性上升不显著;E₂、E₃、E₄ 组上升显著(除了 E₂ 组的 ALT 活性);2 种酶活性均随着恩诺沙星剂量的加大而升高。

表 1 不同剂量恩诺沙星处理鸡存活率及 ALT 和 AST 活性的影响

组别	存活率 (%)	ALT 活性 (U/L)	AST 活性 (U/L)
空白组	100	3.62 ± 0.79a	143.06 ± 11.91a
E ₁	100	3.79 ± 0.69a	145.28 ± 23.47ab
E ₂	100	3.90 ± 0.76ab	159.10 ± 16.41b
E ₃	100	4.66 ± 1.01b	181.44 ± 15.82c
E ₄	70	6.04 ± 1.08c	190.80 ± 33.37c
E ₅	0		
E ₆	0		
E ₇	0		

注:同列数据后不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)。表 2、表 3 同。

由表 2 可以看出,与空白组比,L₁ 组 ALT、AST 活性升高不显著;L₂、L₃、L₄ 组 ALT、AST 显著升高(除了 L₂ 组的 AST 活性);2 种酶活性均随着脂多糖剂量的加大而升高。

表 2 不同剂量脂多糖处理鸡存活率及 ALT 和 AST 活性的影响

组别	存活率 (%)	ALT 活性 (U/L)	AST 活性 (U/L)
空白组	100	3.62 ± 0.79a	143.06 ± 11.91a
L ₁	100	4.04 ± 0.89ab	145.55 ± 13.44a
L ₂	100	4.67 ± 0.74b	153.11 ± 22.46a
L ₃	100	5.50 ± 0.93c	187.90 ± 27.71b
L ₄	100	6.74 ± 1.27c	196.82 ± 25.48b
L ₅	30		
L ₆	0		
L ₇	0		

2.3 鸡肝组织的病理学变化

由图 1 可见,与空白组比,E₁、E₂ 组鸡肝细胞略为肿胀;E₃ 组鸡肝细胞普遍肿胀,并且有坏死;E₄、E₅ 组鸡肝细胞结构紊乱,血细胞淤积;结合这些指标,初步选择恩诺沙星诱导鸡肝损伤的最适剂量为 100 mg/kg。此外可见,L₁ 组鸡肝细胞有肿大现象;L₂、L₃、L₄ 组鸡肝细胞普遍肿大,并可见胞浆

空泡、炎性浸润及坏死,并且随脂多糖剂量的升高而加重;L₅ 组鸡肝细胞胞浆空泡聚集,坏死广泛,结构紊乱;结合这些指标,初步筛选出脂多糖的 3 种剂量为:2、4、6 mL/kg。

2.4 恩诺沙星联合脂多糖诱导肝损伤对鸡存活状况及血清生化指标的影响

由于 EL₃ 组在 48 h 内仅存活 2 羽,不便进行深入研究,EL₁、EL₂ 组全部成活,因此不统计 EL₃ 组的血清生化指标。由表 3 可见,与空白组比,EL₁、EL₂ 组 ALT、AST、GLB 水平均显著升高(P<0.05),ALB、TP、A/G 则显著下降(P<0.05),以 EL₂ 组最明显。

3 结论与讨论

已有研究证实,恩诺沙星在杀菌的同时可促进大肠杆菌内毒素释放^[8],内毒素大量进入血液会加重肝脏负担,破坏肝脏细胞及线粒体,从而损害肝功能^[1]。恩诺沙星在肝内的主要代谢物环丙沙星已在医学临床上证实可诱发肝损伤^[5]。本试验对海蓝蛋鸡连续高剂量灌服恩诺沙星(≥100 mg/kg)发现,鸡肝细胞出现肿大、坏死现象,鸡血清中 ALT 和 AST 显著升高,并且呈剂量依赖性增长。由于 ALT 主要存在于肝细胞浆内,AST 主要存在于肝细胞的线粒体内,肝细胞受损,二者就会较多地释放到血液中,如果可以检测到血液中 ALT、AST 活性升高,即可证实恩诺沙星单独灌胃能引发鸡的肝损伤^[11]。研究还发现,单次腹腔注射脂多糖(≥2 mL/kg)组的 ALT、AST 均显著升高,同时可见鸡肝细胞肿胀、包浆空泡、炎性浸润及坏死,说明脂多糖同样可引发肝损伤。

在用 100 mg/kg 恩诺沙星处理(1 次/d,连续 3 d)的第 3 天同时腹腔注射 2、4、6 mL/kg 脂多糖粗提液,发现 2、4 mL/kg 脂多糖处理组的鸡虽然全部存活,但与对照相比血清中 TP、ALB、A/G 显著降低,ALT、AST、GLB 显著升高,4 mL/kg 脂多糖处理组比 2 mL/kg 处理组的变化更显著。肝脏作为蛋白质合成的主要场所,其受损会导致蛋白质合成障碍,使血清中 TP、ALB 和 A/G 明显降低,肝外球蛋白含量升高^[11]。

试验结果显示,在恩诺沙星和脂多糖联合诱导的情况下,ALT、AST 水平高于二者单独使用,且病理变化更明显,因此二者的联合诱导能够加重肝损伤。试验结果还显示,二者的联合使用能使鸡发生肝功能障碍,病理组织学观察也与本结论一致。本试验采用 100 mg/kg 恩诺沙星处理(1 次/d)灌胃 3 d,第 3 天腹腔注射 4 mL/kg 脂多糖,可见鸡肝损伤明显,因此该组合可作为复合式肝损伤模型用于进一步研究禽肝损伤病理机制及兽医临床护肝药物的研发。

参考文献:

[1] Fan J H, Feng G G, Huang L, et al. Role of naofen in apoptosis of hepatocytes induced by lipopolysaccharide through mitochondrial signaling in rats[J]. Hepatology Research, 2012, 42(7): 696 - 705.
[2] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1128 - 1134.
[3] Yoshida T, Abe K, Ikeda T, et al. Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and D - galactosamine - induced mouse liver injury [J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 576(1/2/3): 136 - 142.

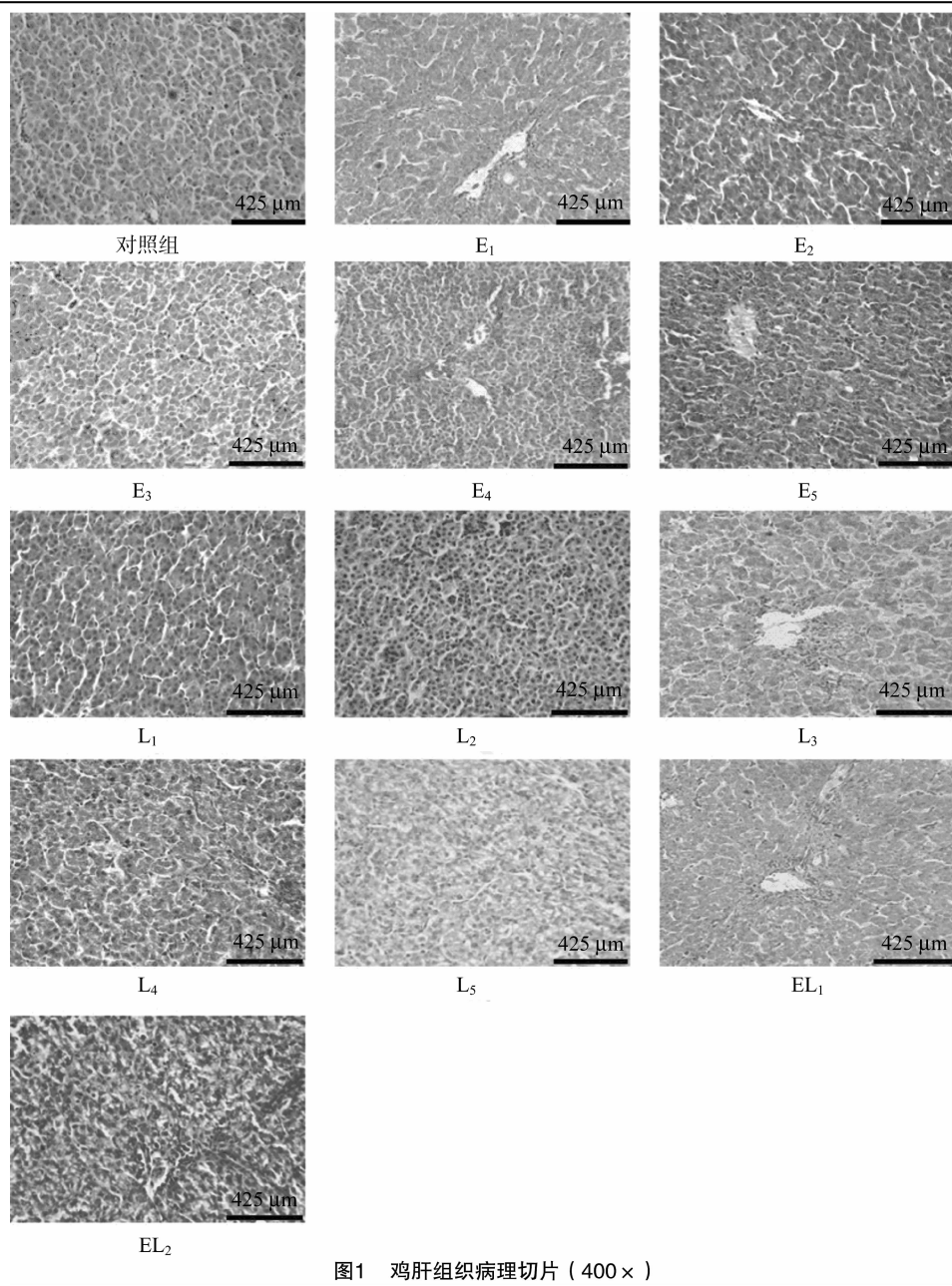


图1 鸡肝组织病理切片 (400 ×)

表 3 恩诺沙星联合不同剂量脂多糖对 ALT 活性、AST 活性、TP、ALB、GLB 和 A/G 的影响

组别	ALT 活性 (U/L)	AST 活性 (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	GLB (g/L)	A/G
空白组	3.57 ± 1.44a	151.53 ± 27.72a	41.28 ± 0.68a	25.78 ± 1.34a	15.50 ± 1.37a	1.68 ± 0.22a
EL ₁	8.03 ± 1.03b	259.98 ± 27.49b	39.80 ± 2.59b	16.14 ± 1.98b	21.43 ± 1.72b	0.75 ± 0.07b
EL ₂	9.26 ± 1.56c	323.43 ± 26.17c	37.57 ± 3.36b	14.08 ± 2.28b	25.71 ± 2.29c	0.55 ± 0.10c

[4]陶美玲,向娟,傅帅,等. 新型复合式肝损伤小鼠模型的建立[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2011,8(1):30-33.

[5]Orman E S,Conjeevaram H S,Vuppalanchi R,et al. Clinical and histopathologic features of fluoroquinolone - induced liver injury[J]. Clinical Gastroenterology Hepatology,2011,9(6):517-523.

[6]Licata A,Randazzo C,Morreale I,et al. Fluoroquinolone - induced liver injury:three new cases and a review of the literature[J]. European Journal of Clinical Pharmacology,2012,68(5):525-532.

[7]徐能武,袁建成,肖光夏,等. 抗生素诱导革兰阴性杆菌释放内毒素的实验研究(一)[J]. 中华烧伤杂志,2001,17(2):75-79.

[8]Shinozuka Y,Uematsu K,Takagi M,et al. Comparison of the amounts of endotoxin released from *Escherichia coli* after exposure to antibiotics and ozone;an *in vitro* evaluation[J]. J Vet Med Sci,2008,70(4):419-422.

[9]霍晓青,王迎春,王丽叶,等. 白头翁素对鸡内毒素性损伤的影响及其机制研究[J]. 河北农业大学学报,2011,34(2):107-110.

[10]康洁. 3 种方法提取大肠杆菌 *E. coli* 脂多糖的比较[J]. 中国农学通报,2010,26(21):12-15.

[11]王庸晋. 现代临床检验学[M]. 2 版. 北京:人民军医出版社,2007:274-276.