

尹柏双,王秋竹,付连军,等. 隐性乳房炎奶牛乳清中部分酶活性变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):276-277.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.080

隐性乳房炎奶牛乳清中部分酶活性变化

尹柏双^{1,2}, 王秋竹¹, 付连军¹, 郝景锋¹, 沙万里¹, 王 奔¹

(1. 吉林农业科技学院动物科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林吉林 132101)

摘要:选取 18 头患不同程度隐性乳房炎奶牛和 6 头健康奶牛为试验动物,采集乳汁,分离乳清,利用比色法检测乳清中 LDH、NAG 活性,研究奶牛隐性乳房炎发病与乳清中 LDH、NAG 活性的关系。结果表明,随着隐性乳房炎病情加重,乳清中 LDH、NAG 活性呈升高的趋势。乳清中 LDH、NAG 活性与奶牛隐性乳房炎发病严重程度呈正相关性,随着体细胞数增加和乳腺炎症的加剧,乳清中 LDH、NAG 活性随之升高。

关键词:奶牛;隐性乳房炎;乳清;乳酸脱氢酶

中图分类号: S858.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0276-02

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最严重的疾病之一,其中隐性乳房炎发生率最高。隐性乳房炎可引起泌乳奶牛产奶量下降、牛奶品质降低、养殖成本增加、产后发情延长、妊娠时间推迟,给奶牛养殖业带来巨大经济损失^[1]。乳酸脱氢酶(LDH)和 *N*-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)广泛存在于动物组织及体液中,白细胞和乳腺上皮细胞损伤会引起乳中 LDH 活性改变^[2],炎症时白细胞释放 NAG,病原菌破坏乳腺组织也可使 NAG 释放^[3]。研究表明,奶牛乳房炎发病时引起乳汁体细胞数(SCC)增加,SCC 作为监测奶牛乳房炎发病情况的可靠指标^[4],奶牛隐性乳房炎发病与乳中 LDH、NAG 酶活性相关,乳中 SCC 变化与乳酶活性呈正相关^[5-6]。本研究探讨不同发病阶段的奶牛隐性乳房炎与乳汁中 LDH、NAG 酶活性的关系,旨在为该病的临床诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

乳汁体细胞计数监测后选择年龄、胎次、产奶量、泌乳期等指标相近的 6 头健康奶牛和 18 头患不同程度奶牛隐性乳房炎奶牛,由吉林市某奶牛场提供。

1.2 主要试剂与仪器

收稿日期:2015-05-17

基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号:20130206040NY);吉林省教育厅“十二五”科学技术项目(编号:吉教科合字 2013339);吉林市科技局杰出青年培育专项(编号:2013625019);吉林农业科技学院重点学科培育项目(编号:吉农科合字 2013X021)。

作者简介:尹柏双(1978—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,从事奶牛乳腺疾病研究。E-mail:ybs3421@126.com。

LDH 检测试剂盒、NAG 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Fossmatic 5000 体细胞计数仪(丹麦 FOSS 公司);Varioskan 酶标仪(美国 Thermo 公司);离心机(美国 Sigma 公司)。

1.3 试验动物分组

乳汁体细胞计数监测后将试验奶牛分成健康对照组(6 头, $SCC \leq 10 \times 10^4$ 个/mL)、轻度隐性乳房炎组(6 头, 50×10^4 个/mL $< SCC \leq 150 \times 10^4$ 个/mL)、中度隐性乳房炎组(6 头, 150×10^4 个/mL $< SCC \leq 500 \times 10^4$ 个/mL)、重度隐性乳房炎组(6 头, $SCC > 500 \times 10^4$ 个/mL)。

1.4 乳样采集

采集试验奶牛的乳汁,采样前对乳区进行清洗,用 75% 乙醇消毒乳区,弃掉头 3 把乳汁,分别采乳 10 mL 装入无菌试管中,将乳样放入冰盒中,带回实验室检测。

1.5 乳清制备

将采集的乳样 3 000 r/min 离心 5 min,除去上层乳脂,于 16 000 r/min 高速离心机中离心 10 min,去除沉淀,保留上清,4 ℃ 保存,待测。

1.6 检测方法

采用体细胞计数仪测定乳汁体细胞数,采用 LDH 试剂盒测定 LDH 活性,采用 NAG 试剂盒测定 NAG 活性,在酶标仪上 440 nm 处比色测定 *D* 值,根据试剂盒说明书计算酶活性。

1.7 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 奶牛乳清中 LDH 活性变化

如表 1 所示,患轻度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 LDH 活

[6] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655-671.

[7] Kim Y, Cho J Y, Kuk J H, et al. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by Bacillus licheniformis isolated from fermented soybean, Chungkook - Jang [J]. Current

Microbiology, 2004, 48(4): 312-317.

[8] Cavazzoni V. Adami and castrovilli performance of broiler chickens supplemented with bacillus coagulans as probiotic [J]. Br Poultry Sci, 1998, 39: 526-529.

[9] 严佩峰, 张孔海, 李建芳. 乳酸菌培养液中活菌数与吸光度的关系研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2012, 22(1): 110-112.

性为 (184.15 ± 13.27) U/L, 与对照组差异极显著; 患中度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 LDH 活性为 (359.79 ± 19.49) U/L, 与对照组差异极显著; 患重度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 LDH 活性为 (829.63 ± 21.48) U/L, 与对照组差异极显著。随着奶牛隐性乳房炎病情加重, 乳清中 LDH 活性呈升高的趋势。

2.2 奶牛乳清中 NAG 活性变化

如表 2 所示, 患轻度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 NAG 活性为 (42.44 ± 8.55) U/L, 与对照组差异显著; 患中度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 NAG 活性为 (62.93 ± 13.45) U/L, 与对照组差异极显著; 患重度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 NAG 活性为 (91.61 ± 15.96) U/L, 与对照组差异极显著。随着奶牛隐性乳房炎病情加重, 乳清中 NAG 活性呈升高的趋势。

表 1 奶牛乳清中 LDH 活性

组别	样品数量(个)	LDH(U/L)
健康对照组	12	84.66 ± 4.16
轻度乳房炎组	12	$184.15 \pm 13.27^{**}$
中度乳房炎组	12	$359.79 \pm 19.49^{**}$
重度乳房炎组	12	$829.63 \pm 21.48^{**}$

注: 同列数据后“*”表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。表 2 同。

表 2 奶牛乳清中 NAG 活性

组别	样品数量(个)	NAG 活性(U/L)
健康对照组	12	34.63 ± 2.58
轻度乳房炎组	12	$42.44 \pm 8.55^{*}$
中度乳房炎组	12	$62.93 \pm 13.45^{**}$
重度乳房炎组	12	$91.61 \pm 15.96^{**}$

3 结论与讨论

3.1 奶牛隐性乳房炎与乳清中 LDH 相关性

LDH 是由 H 和 M 亚基聚合成 5 种不同形式的四聚体, 广泛存在于动物组织和体液中。研究表明, LDH 活性与奶牛隐性乳房炎发病存在一定的联系^[7]。Babaei 等报道, 患隐性乳房炎奶牛乳区乳汁中 LDH 活性显著高于正常乳区^[5]。Hortet 等报道, 疾病导致乳腺功能的改变引起乳汁中 LDH 活性发生相应变化^[8]。牛乳中 LDH 活性可作为监测隐性乳房炎的指标之一^[9]。在隐性乳房炎发病过程中, LDH 起着非常重要作用, 可作为诊断隐性乳房炎和乳腺损害的重要指标之一。研究表明, 乳房炎发病引起乳汁中 LDH 变化的主要原因是由于乳腺上皮细胞的破坏、炎症过程引起白细胞大量聚集, 使损害的上皮细胞和大量的乳汁细胞释放 LDH 增多^[10]。乳汁中 LDH 活性的增加量可以反映乳腺组织的损害程度^[11]。本研究表明, 奶牛隐性乳房炎发病引起乳汁中 LDH 活性升高, 随着乳房炎病情的加重, 乳汁中 LDH 活性呈逐渐升高趋势, LDH 活性与乳腺损伤程度呈正相关。

3.2 奶牛隐性乳房炎与乳清中 NAG 相关性

NAG 是一种溶菌酶, 可作为乳腺上皮细胞破坏的标志^[12]。乳房炎发病与 NAG 关系密切, 乳房炎发生时血清中 NAG 活性明显升高, 该酶可用作奶牛隐性乳房炎的诊断指标之一, 对于隐性乳房炎的早期诊断具有重要意义^[6]。研究发现, NAG 在隐性乳房炎奶牛乳中 NAG 活性会增加, 且与白细胞的增加有关^[13-14]。NAG 活性变化不仅与体细胞数量相

关, 且与不同细菌感染也有相关性^[15]。葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌感染时, NAG 活性与体细胞数相关系数较高^[16-17]。本研究结果表明, 奶牛隐性乳房炎发病引起乳汁中 NAG 活性升高, 随着乳房炎病情的加重, 乳汁中 NAG 活性呈逐渐升高的趋势。患隐性乳房炎奶牛乳清中 LDH、NAG 活性与奶牛隐性乳房炎发病程度呈正相关性, 随着体细胞数增加和乳腺炎症的加剧, 乳清中 LDH、NAG 活性随之升高。

参考文献:

- [1] 吴美玲, 付静涛, 王江涛, 等. 影响奶牛隐性乳房炎发病率的主要因素[J]. 黑龙江畜牧兽医: 下半月, 2014(2): 49-50.
- [2] 石 晶, 吕 英, 李庆章. 乳酶作为奶牛隐性乳房炎诊断指标的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(8): 28-31.
- [3] 王 斌, 靳亚平, 林炜明, 等. 奶牛乳腺炎分离细菌裂解菌免疫试验[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(6): 32-34.
- [4] Eyassu S, Dokin E F, Elna M, et al. Potential of lact operoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats[J]. Small Ruminant Research, 2007, 69(1/2/3): 154-158.
- [5] Babaei H, Mansouri - Najand L, Molaei M M, et al. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis[J]. Veterinary Research Communications, 2007, 31(4): 419-425.
- [6] Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis[J]. Veterinary Research, 2003, 34(5): 565-578.
- [7] 万善霞, 滑 静, 张淑萍. 牛初乳中几种重要酶及其生物功能的研究进展[J]. 北京农学院学报, 2006, 21(3): 77-80.
- [8] Hortet P, Seegers H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows[J]. Preventive Veterinary Medicine, 1998, 37(1/2/3/4): 1-20.
- [9] Symons D B, Wright L J. Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion[J]. Journal of Comparative Pathology, 1974, 84(1): 9-17.
- [10] Kitchen B J, Middleton G, Durward I G, et al. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(6): 978-983.
- [11] 易顺华, 吴显实, 黎 江, 等. 牛乳中酶活性与体细胞数的相关性分析[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(8): 67-69.
- [12] Kitchen B J, Middleton G, Salmon M. Bovine milk N -acetyl- β - D -glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions[J]. The Journal of Dairy Research, 1978, 45(1): 15-20.
- [13] Wilson D J, Herer P S, Sears P M. N -acetyl- β - D -glucosaminidase, etiologic agent, and duration of clinical signs for sequential episodes of chronic clinical mastitis in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(5): 1539-1543.
- [14] Berning L M, Shook G E. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N -acetyl- β - D -glucosaminidase, and lactose[J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(7): 1840-1848.
- [15] Pyörälä S, Pyörälä E. Accuracy of methods using somatic cell count and N -acetyl- β - D -glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80(11): 2820-2825.
- [16] 马保臣, 秦卓明, 李建基, 等. 奶牛隐性乳腺炎病原菌的分离鉴定和体细胞数及酶的相关性研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(2): 63-67.
- [17] 郭奇慧, 云振宇, 李 妍, 等. 牛乳体细胞数与内源酶的关系[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 37-41.