

酮病复方制剂对奶牛酮病抗氧化性能的影响研究

宿孝奇, 黄云飞, 阮氏青海, 左宗辉, 李潇, 杨蓉, 何宝祥* (广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

摘要 [目的] 研发治疗奶牛酮病的新方法、新药物, 从抗氧化性能方面揭示广西大学动物科学技术学院临床实验室自主研发的酮病治疗复方制剂——“酮康”对奶牛酮病的疗效。[方法] 2013年6月, 采用改良水杨醛比色法检测广西南宁某规模化奶牛场围产期奶牛46头, 其中9头为酮病牛, 并将其分为治疗组(6头)和阳性对照组(3头), 另从37头中选取6头与治疗组奶牛体况相似、胎次相近、产奶量接近的奶牛作为健康对照组。试验期间, 治疗组每天灌服“酮康”400 ml, 连续治疗5 d, 阳性对照组、健康对照组均不灌服。分别采血检测试验前后奶牛各抗氧化酶活性(CAT、GPX、MDA、SOD、TAC、 V_E)。[结果] 治疗后治疗组奶牛血酮含量明显降低, 血糖明显上升, SOD和GPX的活性明显升高, 差异极显著($P < 0.01$)。CAT活性明显低于对照组, 差异显著($P < 0.01$)。MDA含量稍有下降, 差异不显著($P > 0.05$), 虽稍低于健康对照组和阳性对照组, 但差异也不显著($P > 0.05$)。 V_E 含量明显低于健康对照组, 差异极显著($P < 0.01$), 而对照组治疗后 V_E 含量均比治疗前高。治疗组在治疗后TAC和CAT活性均低于阳性对照组, 差异极显著($P < 0.01$)。[结论] “酮康”对降低酮病奶牛的血酮含量、提高血糖含量和改善抗氧化性能的作用明显, 效果良好。若不进行治疗和科学的饲养管理, 酮病将持续伤害奶牛。

关键词 奶牛酮病; 治疗; 抗氧化

中图分类号 S823 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)28-09783-03

Effects of Ketosis Compound Preparations on Oxidation Resistance in Ketosis Cows

SU Xiao-qi, HUANG Yun-fei, NGUYEN Thi-thanh-hai, HE Bao-xiang* et al (College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] To find new methods and new medicine in the treatment of ketosis, reveal the compound preparation Tongkang's treatment effect, which was developed by clinical laboratory of College of Animal Science and Technology of Guangxi University. [Method] In June 2013, to detect the ketosis of 46 perinatal cows which came from a large-scale dairy farm in Guangxi Nanning by the method of Salicylaldehyde Colorimetry, result by 9 cows were diagnosed ketosis, and 6 cows were divided into the treatment group, 3 cows were divided into the positive controls, 6 cows were selected from 37 cows left as healthy control which conditions, time, milk production were similar to the treatment group. During the test, the treatment group was filled Tongkang 400 ml every day and five days in a row, positive controls and healthy controls were not filled. Antioxidant indicators (CAT, GPX, MDA, SOD and TAC, V_E) were tested before and after the treatment. [Result] The results showed that after the treatment, treatment group's ketone content decreased significantly, glucose content increased significantly, the activity of SOD and GPX increased significantly, and the difference is extremely significant ($P < 0.01$). CAT activity significantly lower than the positive controls and healthy controls, the difference is extremely significant ($P < 0.01$). MDA content in a slight decline, the difference was not significant ($P > 0.05$), although slightly lower than that of healthy controls and positive controls, no significant difference ($P > 0.05$). V_E content of treatment group is significantly lower than healthy controls, the difference is extremely significant ($P < 0.01$), while positive controls and healthy controls' V_E after the treatment were higher than before. Treatment group's TAC activity and CAT activity were significantly lower than that of positive controls after the treatment, the difference is extremely significant ($P < 0.01$). [Conclusion] This experiment showed that Tongkang do well in reducing ketosis cows' blood ketone content and increasing glucose content, and improving the effect of oxidation resistance. Without good treatment and scientific breeding management, cows could be hurt by ketosis sostenuto.

Key words Ketosis cow; Treatment; Antioxidant

酮病是奶牛由于摄食不足、大量泌乳、饲养管理不当或胎衣不下等其他疾病继发等原因造成的比较高发的一种碳水化合物及脂质代谢紊乱性营养代谢病。奶牛发病时不仅会表现出精神沉郁、消瘦、泌乳量下降等临床症状, 而且会造成免疫力降低、繁殖性能下降、乳房炎和子宫内膜炎等继发疾病发病率升高, 导致奶牛淘汰率大大增加, 从而给牛场造成巨大的经济损失。研发一种高效、低价的酮病治疗药物具有重大意义。近年来, 对奶牛酮病发病机理的研究不胜枚举, 对围产期奶牛因采食减少、能量摄入不足而又大量泌乳, 从而导致机体出现能量负平衡, 引起体脂动员, 造成肝损伤, 机体内环境抗氧化酶活性低下的研究备受关注^[1]。国内外不少学者尝试通过改善饲料成分^[2]、补充添加剂^[3]等方式来改善酮病奶牛的氧化代谢, 提高抗氧化酶活性来降低自由基等对组织细胞的伤害, 以达到改善和治疗酮病的目的。笔者通过灌服广西大学动物科

学技术学院临床实验室研制的酮康复方制剂“酮康”, 监测酮病奶牛及其对照组奶牛治疗前后血糖、血酮以及抗氧化酶活性的变化, 检验“酮康”的酮病治疗效果。

1 材料与方法

1.1 试验动物 2013年6月, 在广西壮族自治区南宁市某规模化奶牛场选取体况、胎次、产奶量相近的分娩后10 d左右的奶牛46头, 清晨空腹颈静脉采血12 ml, 加入肝素钠混匀, 立即以3 500 r/min离心, 取血浆5 ml, 置于冷冻样品箱中, 立刻送回广西大学动物科学技术学院临床实验室, -20℃下保存, 48 h内进行相关指标的测定: KET(血酮)、GLU(血糖)、TAC(总抗氧化能力)、MDA(丙二醛)、GPX(谷胱甘肽过氧化物酶)、CAT(过氧化氢酶活性)、SOD(超氧化物歧化酶活性)、 V_E (维生素E)。参照学者普遍认可的标准^[4]对试验动物进行酮病定量检测: 临床型酮病牛(血酮含量 ≥ 20 mg/dl, 血糖含量 ≤ 50 mg/dl); 亚临床型酮牛(10 mg/dl \leq 血酮含量 ≤ 20 mg/dl, 血糖含量 ≤ 50 mg/dl); 健康牛(血酮含量 ≤ 10 mg/dl, 血糖正常)。临床型酮病牛7头, 亚临床型酮病牛2头, 健康牛37头。选取5头临床型酮病奶牛和1头亚临床型酮病奶牛作为治疗组, 2

基金项目 国家自然科学基金项目(31260631); 广西教改工程项目(GXTSZY141)。

作者简介 宿孝奇(1988-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 动物营养代谢疾病学。*通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事动物生殖代谢疾病研究。

收稿日期 2014-08-25

头临床型酮病奶牛和1头亚临床型酮病奶牛作为阳性对照组,从37头健康牛中选取与治疗组的体况、胎次、产奶量等情况相近的6头牛作为健康对照组。

1.2 试验材料 CAT试剂盒:可见光法,批号为20130510; GPX试剂盒:二硫代二硝基苯甲酸(Dithiodinitrobenzoic acid, DTNB)显色法,批号为20130512; MDA试剂盒:硫代巴比妥酸(Thio barbituric acid, TBA)法,批号为20130521; SOD试剂盒:羟胺法,批号为20130515; TAC试剂盒:菲啉比色法,批号为20130512; VE试剂盒:比色法,批号为20130518。以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,严格按照说明书操作。

KET:改良水杨醛比色法,所用的丙酮、水杨醛等试剂均为分析纯; GLU:葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法;“酮康”,由广西大学内科学试验室提供; WFJ2100型可见分光光度计(龙尼柯上海仪器有限公司); TG16-WS台式高速离心机(湖南湘仪仪器实验室仪器开发公司)。

1.3 试验方法 分组后第2天起,治疗组奶牛每天采食后灌服“酮康”400 ml/头,连续灌服5 d(1个疗程),阳性对照组试验牛和健康对照组牛均不灌服用药,每天观察记录奶牛的临床表现。灌药治疗开始前1天和治疗后第2天,颈静脉处采血15 ml,加入肝素钠混匀后现场立即以3 500 r/min离心10 min,取血浆,分装于EP管中,保存在低温样品箱中立即送回广西大学动物科学技术学院临床实验室, -20℃下保存,48 h内检测完毕。

1.4 数据处理 使用Excel 2010软件对试验数据进行统计与分析,使用SPSS 18.0软件进行一般线性分析, $P > 0.05$ 表示差异不显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,结果均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果与分析

治疗组奶牛在治疗的第2天临床症状开始减轻,第3天部分消失,采食量、产奶量与阳性对照组相比均明显恢复,而阳性对照组奶牛临床症状稍有缓解或持续不变。治疗第4天,治疗组奶牛所有临床症状基本消失,采食量、产奶量稳步上升;而阳性对照组奶牛临床症状消失缓慢,采食量、产奶量变化不明显;健康对照组奶牛治疗前后均未出现酮病临床症状,采食量、产奶量等情况正常。继续进行稳定治疗,共5 d。

2.1 应用“酮康”前后对血酮和血糖的影响 由表1可知,治疗前,治疗组和阳性对照组的血糖含量明显低于健康对照组,血酮则明显高于健康对照组,差异均极显著($P < 0.01$)。治疗后,治疗组与健康组的血糖接近,均在正常范围以内,差异不显著,血酮则存在一定差距,差异显著,但小于亚临床酮病范围(Ket > 10 mg/dl)。阳性对照组在治疗后的时间点上,其血糖明显低于健康对照组,血酮明显高于健康对照组,并都在正常范围之外,差异均极显著。治疗组在治疗后其血糖和血酮均明显好转,治疗前后差异极显著;阳性对照组的血糖在治疗后的时间点上明显升高,差异极显著,但仍低于健康对照组,其升高可能与机体自我代偿性调节有关;血酮则变化不明显,差异不显著。健康对照组的血糖和血酮在治疗

前后的变化都不明显,差异不显著。

表1 治疗组血酮和血糖含量的变化

组别	血糖含量//mmol/L		血酮含量//mg/dl	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	17.11 ± 4.57Aa	43.25 ± 2.23Ab	34.95 ± 9.30AB	6.06 ± 1.44AC
阳性对	15.10 ± 2.15Aa	26.95 ± 1.41Bb	13.55 ± 3.07Ba	13.15 ± 1.72Ba
健康对	43.96 ± 6.87Ba	43.21 ± 6.98Aa	2.33 ± 0.66Ca	1.70 ± 0.96Aa
总计	27.45 ± 14.84	39.97 ± 8.06	17.62 ± 16.28	5.73 ± 4.51

注:同列不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

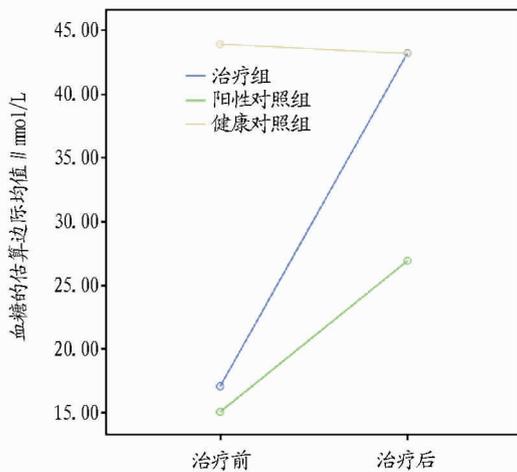


图1 血糖的 MEASURE -1 的估算边际值

从图1可以看出,治疗前治疗组和阳性对照组的血糖相近,均低于健康对照组;治疗后,治疗组的血糖升高,与健康对照组基本一致;阳性对照组血糖含量虽然有所上升,但仍与健康对照组相差甚远。

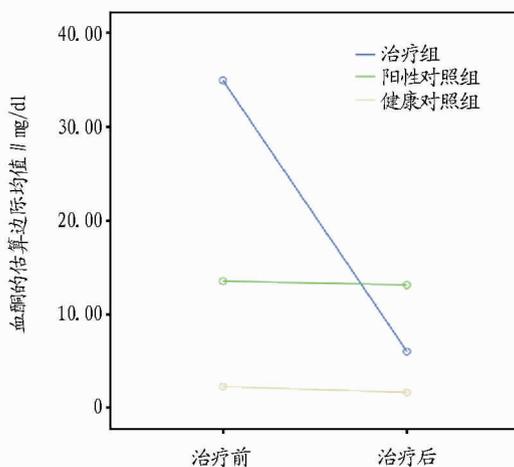


图2 血酮的 MEASURE -1 的估算边际值

从图2可以看出,治疗前治疗组和阳性对照组的血酮均高于健康对照组,并都在10 mg/dl以上,且治疗组明显比阳性对照组高,但治疗后治疗组已经低于10 mg/dl,并且很接近健康对照组水平,而阳性对照组则前后变化不大。

2.2 “酮康”对抗氧化酶活性的影响 由表2可知,治疗组奶

牛对比治疗前后其血浆 GPX 和 SOD 的活性均明显上升,差异极显著($P < 0.01$),但与健康对照组差异不显著($P > 0.05$);治疗后治疗组奶牛的 MDA 含量稍有下降,但差异不显著($P > 0.05$),比健康对照组奶牛稍高,差异也不显著($P > 0.05$), V_E 含量明显低于健康对照组奶牛,差异极显著($P < 0.01$),表明“酮康”对酮病牛的抗氧化性能有一定的提高作用;健康对照

组奶牛和阳性对照组奶牛在治疗组治疗后的时间点上 GPX 活性、CAT 活性和 V_E 含量均明显比治疗前高,差异极显著($P < 0.01$)。阳性对照组奶牛在治疗组治疗后的时间点上其 TAC 和 CAT 活性均明显高于治疗组奶牛,差异极显著($P < 0.01$),而 MDA、GPX、SOD 和 V_E 则差异不大,差异不显著($P > 0.05$)。这表明阳性牛虽然转归顺利,但体内抗氧化应激依然持续。

表 2 治疗前后抗氧化酶活性的变化

指标	治疗组		阳性对照组		健康对照组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
CAT//U/ml	5.51 ± 0.59	0.75 ± 0.40	6.11 ± 1.13	1.15 ± 0.76	9.67 ± 5.24	3.10 ± 4.11
GPX//U/ml	186.63 ± 32.41	384.60 ± 72.58 *	134.59 ± 36.04	317.95 ± 55.33 *	160.28 ± 95.51	301.80 ± 92.11 *
MDA//nmol/ml	2.83 ± 1.08	2.50 ± 0.90	2.36 ± 0.79	2.00 ± 0.39	2.94 ± 1.79	1.91 ± 0.44
SOD//U/ml	72.02 ± 8.65	82.35 ± 3.57 *	66.44 ± 16.84	84.37 ± 8.87 *	71.54 ± 21.87	84.85 ± 9.53 *
TAC//U/ml	3.33 ± 1.37	2.96 ± 2.92	2.84 ± 2.32	2.84 ± 1.42	3.41 ± 2.03	4.15 ± 0.43 *
V_E // μ g/ml	0.71 ± 0.64	0.67 ± 0.29	0.58 ± 0.20	1.35 ± 1.75 *	0.59 ± 0.71	0.65 ± 0.50 *

注: * 表示治疗前后差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 酮病奶牛在治疗前后的血糖、血酮和临床症状变化 奶牛产后酮病发生的原因是机体糖、脂代谢紊乱,摄入的能量不及产出,从而造成能量代谢负平衡,进而出现消瘦、产奶量下降、疾病高发等情况^[5]。临床型酮病牛的食欲减少、产奶量下降、瘤胃蠕动迟缓、精神沉郁麻木等典型症状在试验治疗组和阳性对照组奶牛中都得到一定体现。治疗组中有 1 个酮病牛(血酮含量高达 46.76 mg/dl)治疗前每日产奶量甚至不足 8 kg,极度消瘦,灌服“酮康”治疗并减少挤奶一段时间后体况才有所改善。

亚临床病牛治疗前采食较少、不愿活动,产奶量也不高,灌药治疗后产奶量逐步提高,3 d 后临床症状基本消失,采食量增加,活动性提高。阳性对照组病牛瘤胃蠕动迟缓延续数日后才逐步改善(平均每 3 min 1 次),精料摄入依然较少,并且嗜睡,但消瘦逐步得到控制,试验期间因奶牛场全场加强护理,酮病症状基本得到控制,发病状态缓慢,处于发病初期的奶牛因严重能量负平衡而表现有所恶化的状况。所有健康对照组奶牛采食正常,产奶量日渐增加,并无异常发病情况出现;治疗组奶牛经过治疗后酮病病症都得到改善,阳性对照牛缓慢逐步转归正常,这表明灌服“酮康”对奶牛酮病治疗临床效果明显,预后理想。另外,增加产后奶牛食量、适当限制挤奶等措施是科学的,对奶牛酮病的治疗起着重要作用。

该试验中在灌服酮康前,治疗组和阳性对照组的血酮均高于健康对照组,并都在 10 mg/dl 以上,且治疗组明显比阳性对照组高,但灌服酮康后治疗组已经低于 10 mg/dl,并且很接近健康对照组水平,而阳性对照组则在灌服酮康前后的时间点上变化不大。综上所述,没有采取灌服酮康等治疗措施的酮病牛其病情没有明显好转,有些甚至病情加重,灌服酮康确能使酮病牛的血糖升高,血酮降低。

3.2 灌服“酮康”对酮病奶牛抗氧化能力的影响 奶牛通过体内的酶抗氧化系统(如 GPX、SOD、CAT 等)对抗、清除机体氧化代谢所产生的多余自由基,协同 V_C 、 V_E 和微量元素 Zn、Cu 等非酶抗氧化系统共同抑制活性氧的生成,保护机体组织不受损伤^[6]。自由基对细胞的氧化伤害最大,多不饱和脂肪

酸等脂质氧化代谢终产物 MDA 等的累积,又导致了过氧根离子等多余自由基的积聚^[7]。

GPX 是一种多存在于肝细胞和红细胞中的保护性酶,它催化 H_2O_2 和其他有机氧化物两分子 GSH(还原型谷胱甘肽)至 GSSG(氧化型谷胱甘肽)来保护细胞,防止脂质过氧化物进一步水解生成 MDA 等^[8]。SOD 歧化过氧根离子形成 H_2O_2 ,最后经存在于过氧化物酶体中的 CAT 分解成 H_2O 和 O_2 。SOD、CAT、GPX 协同清除氧化自由基,保护细胞免受过氧化损害。

试验前酮病牛外周血血浆抗氧化酶活性很低,氧化应激激烈,与雷金龙等的研究结果相一致;“酮康”不仅含有抗氧化类维生素,在酮病牛治疗后明显使血浆中 SOD、CAT、GPX 活性升高,而使 MDA 含量大幅下降。总之,“酮康”可以显著提高酮病奶牛的抗氧化能力,降低自由基等对细胞的损伤,改善氧化应激状态,治疗效果明显。

综上所述,灌服“酮康”明显起到升糖降酮和改善酮病奶牛的外周血抗氧化性能的作用,能明显降低自由基等对细胞的损伤,改善氧化应激状态,对酮病的治疗有良好效果。对于奶牛酮病,配合增加产后奶牛食量、适当限制挤奶等科学措施,再灌服“酮康”,能得到良好的转归。

参考文献

- [1] 牛淑玲,王哲,李秀菊. 围产期奶牛能量代谢障碍性疾病的防治进展[J]. 中国畜牧杂志,2004,40(12):36-39.
- [2] 侯志高,王振勇,柴同杰,等. 不同精粗比日粮对奶牛机体氧化应激和瘤胃内环境稳定性的影响[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(4):455-459.
- [3] 赵小伟,王加启,孙鹏,等. 日粮添加不同脂肪酸混合物对奶牛血液脂肪酸组成及抗氧化性能的影响[J]. 中国农业大学学报,2011,16(6):117-123.
- [4] 孙斌,赵凯,王洪,等. 奶牛酮病及其研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,1999,3(11):48-51.
- [5] 何生虎,晁向阳,王明成. 奶牛酮病的发病机理研究现状及其进展[J]. 草食家畜,2004,124(3):15-17.
- [6] 雷金龙,吴树清,王玲玲,等. 围产期奶牛血清中 GSH-Px、SOD、MDA 的比较研究[J]. 中国奶牛,2008(6):38-43.
- [7] VANDERLELIE J, VENARDOS V L, CLIFTON V L, et al. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae[J]. Placenta,2005,26:53-58.
- [8] 吴永霞,董国忠,贾亚伟. 氧化应激对奶牛的危害及其防治[J]. 中国饲料,2011(4):32-35.