

感染新型鸭肝炎病毒雏鸭的 SOD 活性和 MDA 含量变化

郑艳华, 胡薛英, 程国富, 谷长勤, 周诗其, 汤 芹, 赵雅心

(华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 用新型鸭肝炎病毒人工感染雏鸭, 对感染雏鸭血液、肝、脑中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量进行了检测。结果显示: 血清和肝组织中 MDA 含量在感染后第 24 h 极显著高于对照组($P < 0.01$), 脑组织中 MDA 含量无显著变化。血清中 SOD 活性第 24 h 极显著高于对照组($P < 0.01$), 第 96 h 极显著低于对照组($P < 0.01$); 肝组织 SOD 活性于感染后第 24 h 显著低于对照组($P < 0.05$); 脑组织中 SOD 活性无显著变化。提示: 自由基参与了新型鸭肝炎的发生、发展过程。

关键词: 新型鸭肝炎病毒; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S 858.325.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6419(2004)12-0006-04

已有研究证实, 炎症、肿瘤、缺血再灌注损伤、衰老等疾病, 都与自由基损伤有关。氧自由基不但能

通过生物膜中多种不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤, 而且还能通过脂质过氧化引起细胞损伤, 造成细胞代谢紊乱, 结构和功能异常^[1,2]。鸭病毒性肝炎(DVH)是雏鸭的一种急性、高度致死性和接触传染性病毒病。本病最早发生于美国, 目前世界上主要流行 I、II、III 型鸭病毒性肝炎, 其病理变化均以肝炎为主要特征。新型鸭肝炎病毒为 1999 年苏敬

收稿日期: 2004-07-15

基金项目: 湖北省自然科学基金资助(2000J103)

作者简介: 郑艳华(1972-), 女, 湖北省京山县人, 硕士。
程国富为通讯作者。

Expression of porcine circovirus type 2 ORF2 gene in *Escherichia coli*

ZHU Wei-guo^{1,2}, SONG Chang-xu², WANG Gui-ping², YANG Zeng-qi¹,
HUANG Zhong², LI Chun-ling², WANG Xu-rong^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A pair of primers was designed according to the sequence of GD strain in order to express ORF2 gene of porcine circovirus type 2 (PCV-2). The ORF2 gene, which was amplified by using the primers having *Hind* III and *Kpn* I site digested by PCR, was subcloned into prokaryotic expressing vector pBAD/g and then the recombinant plasmid pBAD/g III-ORF2 was constructed. The pBAD/g III-ORF2 was transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells and induced by *L*-arabinose. The results of SDS-PAGE and Western-blotting indicated that the ORF2 gene had been expressed and the molecular weight of the expressed fusion protein was about 28 ku.

Key words: porcine circovirus type 2; ORF2 gene; *Escherichia coli*; expression

良等自疑似鸭肝炎病死鸭体内分离出的1株类似于I型鸭肝炎的病毒,与I型、III型鸭肝炎病毒无血清学交叉免疫反应。病鸭表现突然发病,抽搐并很快死亡,死亡率为20%~80%,给养鸭业造成了极大危害^[3]。因此,对疾病过程中雏鸭血清脂质过氧化物和抗氧化能力的测定,有助于反映疾病发生、发展过程中机体的损伤与抗损伤变化,为进一步防治新型鸭病毒性肝炎提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 毒株

本试验接种材料为新型鸭肝炎病毒。将新型鸭肝炎病毒用生理盐水做1:10稀释,经尿囊腔接种10日龄鸭胚,每枚0.2 mL,收集48~96 h死亡鸭胚的尿囊液,经测定鸭胚尿囊液ELD₅₀为 $10^{-1.32}/0.1$ mL。于-20℃冻存备用。接种前,将此尿囊液用灭菌生理盐水做1:100稀释,并加双抗。

1.2 实验动物及处理

1日龄健康樱桃谷雏鸭180只,购自武汉市某养鸭场。自由饮水采食,饲喂8 d后,将健康雏鸭180只随机分成2组,感染组120只,腿部肌肉注射新型鸭肝炎病毒,0.2 mL/只;对照组60只,相同部位注射等量生理盐水。饲养于隔离器内,于第12、

24、48、72、96、168和336 h分批剖杀,试验组及对照组各8只,采集血液和病料,分离血清待检。

1.3 肝、脑匀浆的制备

滤纸吸干肝、脑组织表面的血液,准确称取1 g肝、脑组织块,用冷生理盐水冲洗,加入10 mL冰冻磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,制成100 g/L组织匀浆,3 000 r/min离心15 min,取上清液,-20℃保存待用。

1.4 测定方法

MDA含量测定采用硫代巴比妥酸法,SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法。所有试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.5 数据处理

所有数据结果均以 $\bar{X} \pm S$ 表示,用 t 检验法分析对照组和试验组间的差异显著性。

2 结果

2.1 血清中的MDA含量和SOD活性变化

雏鸭感染新型鸭肝炎病毒后第24 h,感染组血清中的丙二醛(MDA)含量极显著高于对照组($P < 0.01$),第72 h时基本恢复正常;超氧化物歧化酶(SOD)活性于第24 h显著上升,第72 h开始下降,第96 h极显著低于对照组($P < 0.01$),结果见表1。

表1 新型鸭肝炎鸭血清中的SOD活性及MDA含量测定($n=8$)

时间	SOD活性/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		MDA含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	试验组	对照组	试验组	对照组
第12 h	173.10±15.67	165.37±16.51	7.17±1.46	6.17±0.87
第24 h	207.85±20.60 ¹⁾	150.56±23.75	11.52±1.96 ¹⁾	6.56±1.62
第48 h	152.10±23.76	156.45±23.59	7.43±2.35	5.64±1.88
第72 h	130.91±14.91	152.20±10.82	4.60±0.53	5.42±0.82
第96 h	117.80±21.32 ¹⁾	155.19±15.22	5.07±1.65	5.06±1.16
第168 h	159.20±17.68	155.79±15.53	4.92±1.13	5.34±1.50
第336 h	161.38±14.90	150.88±11.30	5.07±0.88	5.40±0.55

注:与对照组相比,1)表示差异极显著($P < 0.01$);2)表示差异显著($P < 0.05$);下表同。

2.2 肝组织中的MDA含量和SOD活性变化

肝组织中的SOD活性于感染后第24 h显著下降,第48 h极显著低于对照组($P < 0.01$),MDA含量于感染后第24 h极显著上升($P < 0.01$)。结果见

表2。

2.3 脑组织中的SOD活性和MDA含量变化

脑组织中的MDA含量和SOD活性无较明显变化,结果见表3。

表2 肝组织中的MDA含量和SOD活性测定($n=8$)

时间	SOD 活性/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		MDA 含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	试验组	对照组	试验组	对照组
第 12 h	185.70 \pm 9.05	190.42 \pm 8.55	4.49 \pm 2.07	5.64 \pm 1.57
第 24 h	180.53 \pm 20.95 ²⁾	200.12 \pm 9.10	9.22 \pm 1.44 ¹⁾	5.90 \pm 1.40
第 48 h	177.86 \pm 8.46 ¹⁾	195.86 \pm 6.11	5.69 \pm 1.99	5.43 \pm 1.10
第 72 h	187.76 \pm 6.05	189.97 \pm 4.27	5.71 \pm 2.64	5.62 \pm 2.50
第 96 h	181.75 \pm 6.39	189.22 \pm 4.63	6.93 \pm 1.54	6.42 \pm 1.43
第 168 h	184.85 \pm 6.78	182.16 \pm 3.72	5.21 \pm 1.50	4.56 \pm 0.67
第 336 h	195.97 \pm 4.23	190.85 \pm 5.95	6.71 \pm 1.90	6.83 \pm 1.90

表3 脑组织中的SOD活性和MDA含量变化($n=8$)

项目	组别	第 24 h	第 48 h	第 72 h	第 96 h	第 168 h	第 336 h
SOD 活性/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	对照组	90.30 \pm 8.62	109.77 \pm 21.32	98.38 \pm 9.05	102.22 \pm 13.24	118.22 \pm 5.21	113.58 \pm 13.06
	试验组	105.50 \pm 22.67	100.15 \pm 10.98	101.66 \pm 5.13	108.98 \pm 12.15	117.30 \pm 7.15	113.35 \pm 5.77
MDA 含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	对照组	6.30 \pm 1.90		7.11 \pm 1.58		7.22 \pm 2.45	8.50 \pm 1.27
	试验组	4.98 \pm 1.11		6.73 \pm 1.41		7.23 \pm 2.36	7.33 \pm 0.96

3 讨论

自由基是机体正常生化过程的产物,参与生物体许多病理、生理过程。正常情况下,自由基的产生与清除保持着动态平衡。任何增强氧化作用和(或)降低抗氧化能力的因素均可打破这一平衡,致氧自由基增加^[4]。氧自由基介导以肝损害为主的全身性损害,导致疾病的发生、发展,造成对机体的损害。生物体内产生的自由基主要是超氧阴离子,它与过氧化氢反应所产生的羟自由基可引发脂类过氧化,导致细胞的损伤,使细胞膜破坏,通透性增加,蛋白质及DNA变性^[5]。

MDA为脂类过氧化的最终产物之一,它可反映脂类的过氧化程度,间接反映自由基变化程度。本试验结果发现,血清和肝中的MDA含量在第24 h即上升到最高值。新型鸭肝炎的一个病变特征为肝出血性坏死性炎症,可能由于病毒侵入机体后,作用于肝,使吞噬细胞激活,产生大量自由基,机体脂质过氧化反应增强,致血管通透性增加,免疫细胞过量积聚,加重肝细胞损伤。有研究表明MDA含量

与肝功能水平呈正相关^[6],笔者所在实验室同时检测的转氨酶水平也于第24 h升高,结果与此一致。

SOD为清除超氧阴离子的重要酶类,能催化氧阴离子自由基歧化生成过氧化氢和氧气,再由过氧化氢酶和过氧化物酶转化成水和氧或氧化物,从而有效的清除自由基,防止自由基的连锁反应,防御活性氧对生物体的损害,保护机体^[7]。本试验采用人工感染雏鸭新型鸭肝炎病毒后,感染组血清中的SOD活性在第24 h上升至最高值,肝组织的SOD活性在第24 h下降。与赵海全等^[8,9]用不同毒力株1型鸭肝炎病毒感染雏鸭后,血浆和肝中MDA含量上升,SOD和GSH-Px活性均下降稍有差异。血清中SOD活性上升的原因可能是:①肝组织中的SOD活性于第24 h显著下降,第24~48 h肝细胞变性、坏死最为严重。肝组织中含大量的Cu-SOD、Zn-SOD,在肝损伤时,从肝释放进入血液。大量的SOD进入血液,引起血清中的SOD活性上升。②随着自由基含量的上升,机体抗氧化能力出现代偿性增强,酶活性升高。当超过机体代偿能力时,自由基在体内蓄积,脂类过氧化作用加剧,组织和细胞损

伤加重。同时,机体清除氧自由基的能力减弱,SOD合成原料不足,酶活性下降^[10]。由本试验结果可知,血清SOD于第96h下降至最低。

随着机体抗氧化能力的下降,自由基对机体的损伤作用加强。临床表现为雏鸭死亡集中于第24~72h,肝出血和坏死明显。脑中SOD和MDA变化不大,可能与病毒组织的亲和性有关。随着疾病的恢复,自由基含量和酶活性逐渐回复,96h以后,自由基和抗氧化酶活性基本恢复正常,雏鸭剖检无明显病变。结果表明,自由基的变化与鸭病毒性肝炎的发病、转归是密切相关的。

参考文献:

- [1] Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer [J]. *Biochemistry*, 1998, 63(7): 854-865.
- [2] 陈瑗,周玫. 自由基医学 [M]. 广州:人民军医出版社,1991.
- [3] 苏敬良,黄瑜,贺荣莲,等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定 [J]. *中国兽医科技*, 2002, 32(1): 15-16.
- [4] Grisham M B, Granger D N, Lefer D J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen; relevance to ischemic heart disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(4-5): 404-433.
- [5] Leibovitz B E, Siegel B V. Aspects of free radical reactions in biological systems: Ageing [J]. *Gerontol*, 1980, 35(1): 45-46.
- [6] 周助权,包六第. 肝炎患者血清丙二醛和超氧化物歧化酶水平观察 [J]. *实用医学杂志*, 1996, 12(9): 632-633.
- [7] Kanner J, German J B, Kinsella J E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems [J]. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 1987, 25: 317-325.
- [8] 赵海全,王丙云,冯军,等. 雏鸭感染鸭肝炎病毒后血液中SOD活性和丙二醛含量的变化 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2001, (1): 2-4.
- [9] 赵海全,王丙云,冯军. 人工感染鸭肝炎病毒对雏鸭肝组织的损伤作用 [J]. *中国兽医科技*, 2002, 32(5): 22-24.
- [10] 郭定宗,杨世锦,李家奎,等. 伪狂犬病猪脑组织MDA和SOD活性的变化 [J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(4): 385-387.

Changes of SOD activity and MDA level in young ducks infected with new type duck hepatitis virus

ZHENG Yan-hua, HU Xue-ying, CHENG Guo-fu, GU Chang-qin,

ZHOU Shi-qi, TANG Qin, ZHAO Ya-xin

(College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The content of MDA and activity of SOD in serum, liver and brain of young ducks infected with new type duck hepatitis virus (DHV) were measured. It was found that MDA contents in the serum and liver of young ducks infected with new type DHV at 24th hour post-infection were significantly higher than that of the control group, and the MDA content in the brain was not significantly different from that of the control group and the SOD activity in the serum of the infected ducks was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). At 96th hour post-infection the SOD activity was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$), its activity in liver at 24th hour post-infection was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), but the activity in the brain was not significantly different from that of the control group.

Key words: new type duck hepatitis virus; MDA; SOD