乳酶作为奶牛隐性乳房炎诊断指标的研究

杨德英¹,姚学萍¹,曹随忠^{1,2},余树民¹,刘长松¹,杜立新²

(1 四川农业大学 动物医学院,四川 雅安 625014;2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所,北京 100094)

【摘要】【目的】定量实时检测奶牛牛乳中的乳酶活性,通过分析其变化规律为奶牛隐性乳房炎的诊断提供理论依据。【方法】随机选择 220 头荷斯坦泌乳奶牛,采集乳汁测定体细胞数(Somatic cell counts,SCC)和 5 种乳酶活性,研究乳酶活性在健康和患隐性乳房炎奶牛乳汁中的变化规律及与 SCC 的相关性。【结果】以乳汁体细胞数 $50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 作为判定乳房炎的标准,患隐性乳房炎奶牛乳汁中 N-乙酰基-1- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳过氧化物酶(LP)、碱性磷酸酶(ALP)和髓过氧化物酶(MPO)活性均显著高于健康奶牛($P < 0.05$),乳酶活性与 SCC(lg SCC)呈正相关,其中 NAG 活性与 SCC(lg SCC)的相关性系数 $R^2 = 0.98$,NAG 与 LDH 活性之间的相关性系数 $R^2 = 0.95$ 。【结论】奶牛隐性乳房炎对 LDH、NAG、LP、ALP 和 MPO 活性有显著影响($P < 0.05$),乳酶 NAG 和 LDH 可联合应用作为早期奶牛隐性乳房炎的诊断指标。

【关键词】 奶牛;隐性乳房炎;乳酶活性;体细胞计数

【中图分类号】 S858.237.2⁺6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)10-0043-04

Enzymes in cow milk as diagnostic indicator of subclinical mastitis

YANG De-ying¹, YAO Xue-ping¹, CAO Sui-zhong^{1,2}, YU Shu-min¹,

LIU Chang-Song¹, DU Li-xin²

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China)

Abstract: 【Objective】 To provide theoretical basis of diagnostic subclinical bovine mastitis, activity of enzyme was detected in quantization and real time. 【Method】 To study the variations of N-acetyl- β -D-glucosaminase(NAG), lactate dehydrogenase(LDH), myeloperoxidase(MPO), alkaline phosphatase(ALP) and lactoperoxidase(LP) between health and subclinical mastitis cows, the milk samples were collected from 220 lactating Holstein cows in one dairy farm randomly. Somatic cells were counted (SCC) and activities of five enzymes were measured in milk samples. 【Result】 A SCC threshold of $50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ in milk was used as the classification standard of subclinical mastitis. Activities of five milk enzymes in cows with subclinical mastitis were higher than the healthy significantly ($P < 0.05$) and were positively correlated with SCC (lg SCC). Correlation coefficient was 0.98 between lg SCC and activity of NAG, and 0.95 between activity of NAG and LDH. It was concluded that subclinical mastitis influenced the activities of five milk enzymes significantly ($P < 0.05$). 【Conclusion】 NAG and LDH could unite as the indicator in the earlier diagnosis of bovine subclinical mastitis.

Key words: cow; subclinical mastitis; activity of milk enzyme; somatic cell count (SCC)

* [收稿日期] 2009-02-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571329);教育部长江学者和创新团队发展计划创新团队项目(IRT0848);四川农业大学青年科技创新基金项目(00231800)

[作者简介] 杨德英(1982-),女,四川冕宁人,硕士,主要从事兽医产科学研究。E-mail:dnaydy@126.com

[通信作者] 曹随忠(1971-),男,甘肃岷县人,博士,副教授,主要从事兽医产科学研究。E-mail:caosuizhong@yahoo.com.cn

奶牛乳房炎是由各种病因引起的乳房炎症,不仅影响乳产量和乳品质,甚至可导致奶牛被淘汰,其中以隐性乳房炎的影响十分严重。到目前为止,从各种哺乳动物乳汁中已经鉴定出 60 种以上的乳酶,它们是乳房抗氧化过程和免疫系统的重要组成部分^[1]。乳房炎对乳酶活性影响很大,当发生乳房炎时,乳过氧化物酶(Lactoperoxidase,LP)^[2]、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase,ALP)^[3]和 N-乙酰基-1-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminase,NAG)^[4]等的生物化学活性明显升高,其中 N-乙酰基-1-β-D-氨基葡萄糖苷酶的活性可用作奶牛隐性乳房炎的诊断指标^[4]。乳汁体细胞计数(Somatic cell counts,SCC)能有效反映乳腺健康程度,是一个可靠的监测奶牛乳房炎的指标,国际乳业联盟(IDF)将乳中体细胞数 $50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 作为判定隐性乳房炎的标准^[2]。有研究表明,奶牛隐性乳房炎与乳酶活性相关,其中 N-乙酰基-1-β-D-氨基葡萄糖苷酶、酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenises,LDH)、过氧化物酶、碱性磷酸酶和髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)活性随着 SCC 的增加而升高^[2-5]。

目前,常用的奶牛乳房炎诊断方法有乳汁病原菌培养和乳汁电导率测定等,这些检测方法在临床使用时都存在不能实时诊断的缺陷^[6]。因此,寻找和筛选一种乳房炎早期实时诊断和普遍适用的方法具有非常重要的实际意义,特别是在提高诊断的灵敏性和特异性方面。乳酶活性的变化为奶牛隐性乳房炎早期诊断指标的研究提供了理论依据,从提高乳品质量的前景和乳酶在乳腺中的生物学作用来看,对乳酶活性变化的研究具有重大的实际意义,乳

酶可以作为生物标记物(Biomaker)用于开发奶牛隐性乳房炎早期诊断指标及疗效评价的新技术。目前,国内外已有一些关于乳酶活性的研究^[2,4,7],但尚未见同时对上述 5 种乳酶活性进行系统定量研究的报道。本研究通过测定健康奶牛和隐性乳房炎奶牛乳中 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 的活性,分析其在健康和隐性乳房炎奶牛乳中的变化规律及其与 SCC 的相关性,以期通过定量实时检测乳酶活性诊断奶牛隐性乳房炎提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳样采集 在四川新希望乳业示范奶牛场内,选择 220 头年龄和泌乳期相近、乳汁体细胞数连续 2 个月维持在一定水平,且均无肉眼可见乳汁和乳房病变的荷斯坦奶牛。在每日早、中、晚挤奶时各取乳汁 10 mL,冰盒存放带回实验室,将 3 次采集的乳样混合后分成 2 份,其中 1 份全乳用于体细胞数测定;另 1 份全乳于 $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min 分离乳清, $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用于 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性测定。

1.1.2 试剂 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性测定试剂盒,均购于南京建成生物试剂研究所。

1.2 样品

奶牛乳样总样本数(N)为 220 个,根据乳汁体细胞数将所有乳样分成 5 组(表 1),其中前 3 组为健康奶牛乳样($\text{SCC} < 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$),后 2 组为患隐性乳房炎奶牛乳样($\text{SCC} > 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)。

表 1 220 个供试奶牛乳样的分组

Table 1 Groups of milk samples of the experimental 220 Holstein cows

组别 Group	SCC/($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	lg SCC	乳房健康程度评价 Degree of mastitis	样本数 Sample
1	<10	5.71±0.70	极好 Best	90
2	10~25	6.17±0.69	很好 Good	30
3	25~50	6.56±0.63	需要改进 Improvement	30
4	50~100	6.79±0.73	差 Bad	35
5	>100	7.33±0.97	严重 Serious	35

1.3 乳汁体细胞计数与乳酶活性测定

将全乳乳样于 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min 后,采用 Fossmatic 5000 体细胞计数仪(FOSS 公司,丹麦)^[8]进行乳汁体细胞计数。NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性测定时,取全乳样品在 Varioskan 酶标仪(Thermo 公司,美国)上分别于 400,420,440,460 和 520 nm 比色测定 OD 值,然后根据相应公式(具体参见 5 种酶活性测定试剂盒的说明)计算酶活性。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件分析各样本组间酶活性差异的显著性及 SCC 与酶活性的相关性,SCC 表示为 lg SCC,lg SCC 和 5 种乳酶活性均用“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示。

2 结果与分析

2.1 隐性乳房炎对乳酶活性的影响

由表 2 可以看出,以 $\text{SCC} > 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 作为

划分隐性乳房炎的阈值,患隐性乳房炎奶牛乳酶 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 的活性均显著高于健康奶牛 ($P < 0.05$)。健康奶牛乳汁 ($SCC < 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$) 中的 ALP、LDH 和 MPO 活性在 $SCC < 10 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组显著低于其他 2 组 ($P < 0.05$), 而 NAG 和 LP 活性的差异不显著 ($P > 0.05$)。患隐性

乳房炎奶牛乳汁 ($SCC > 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$) 中的 NAG 和 LP 活性差异不显著 ($P > 0.05$), 而 ALP、LDH 和 MPO 活性在 $SCC > 100 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 时显著升高 ($P < 0.05$)。第 5 组的 LDH 活性分别是第 1, 2, 3 组的 5.23, 2.28 和 2.17 倍, 可见 LDH 活性较其他 4 种乳酶在不同体细胞计数组内的变化更为敏感。

表 2 隐性乳房炎对奶牛乳中 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性的影响

Table 2 Effects of subclinical mastitis on activities of NAG, LDH, LP, ALP and MPO in milk

U/L

组别 Group	SCC/($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	NAG	ALP	LDH	LP	MPO
1	<10	104.15 $\pm$ 8.79 b	61.08 $\pm$ 11.40 d	39.10 $\pm$ 18.07 d	110.21 $\pm$ 24.20 b	53.88 $\pm$ 4.96 d
2	10~25	112.31 $\pm$ 12.40 b	67.34 $\pm$ 12.33 c	89.76 $\pm$ 3.92 c	113.71 $\pm$ 11.60 b	56.93 $\pm$ 4.87 c
3	25~50	112.94 $\pm$ 10.50 b	89.28 $\pm$ 28.46 c	94.32 $\pm$ 28.77 c	120.85 $\pm$ 11.20 b	58.00 $\pm$ 4.26 c
4	50~100	130.06 $\pm$ 14.62 a	117.14 $\pm$ 25.40 b	137.25 $\pm$ 17.80 b	150.73 $\pm$ 22.97 a	63.74 $\pm$ 5.74 b
5	>100	135.47 $\pm$ 13.48 a	166.61 $\pm$ 35.38 a	204.51 $\pm$ 29.32 a	156.10 $\pm$ 12.44 a	69.50 $\pm$ 9.23 a

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Means with different lowercases within the same column are different significantly ($P < 0.05$).

2.2 乳汁体细胞计数与乳酶活性的相关性分析

由表 3 可见, SCC (lg SCC) 与 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性呈正相关, 其中 SCC (lg SCC) 与 NAG 和 LDH 活性的相关性系数 (R^2) 分别为 0.98

和 0.93, 大于 SCC 与其他 3 种乳酶的相关性。5 种乳酶活性之间相关性的分析结果显示, 它们之间的相关程度存在差异, 其中 NAG 与 LDH 之间的相关性最高 ($R^2 = 0.95$)。

表 3 SCC (lg SCC) 与 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性的相关分析

Table 3 Analysis of correlation on lgSCC and activities of NAG, LDH, LP, ALP, MPO

项目 Item	lg SCC	NAG	ALP	LDH	LP	MPO
lg SCC	1	0.98	0.90	0.93	0.79	0.83
NAG	—	1	0.90	0.95	0.90	0.83
ALP	—	—	1	0.94	0.90	0.83
LDH	—	—	—	1	0.79	0.94
LP	—	—	—	—	1	0.81

3 讨论

乳汁体细胞计数 (SCC) 是目前国内外诊断奶牛隐性乳房炎的标准方法, 它反映了乳腺细胞和组织的受损程度。但目前国内外基于 SCC 判定奶牛隐性乳房炎的判断标准尚不完全一致, 国际乳业联盟 (IDF) 的判定标准是 $SCC > 50 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 而 Gronlund 等^[9] 将桶奶 $SCC > 30 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 作为判定标准。

乳汁中的乳酶发挥着十分重要的生物学作用, 目前已经发现乳酶参与着乳汁的分泌和乳房免疫系统的组成等^[1]。乳房炎对乳酶活性影响很大, 主要是由于发生乳房炎时, 来自体细胞的溶酶体酶进入乳汁中引起的^[6]。NAG 是一种溶酶体酶, 主要来源于乳腺上皮细胞, 小部分来源于乳汁中的体细胞^[10]。根据乳中 NAG 活性的变化, 可以判断乳房的炎症程度和治疗后乳腺的恢复情况, 因此 NAG 是可靠的炎症指标^[4]。Chagunda 等^[11] 研究证实,

NAG 活性在患隐性乳房炎的牛乳中显著升高, 这与本研究结果一致。乳中 LDH 来源于血清和被破坏的乳腺上皮细胞、间皮细胞及崩解的白细胞^[12], 乳房发生炎症后这些细胞数量都会增加, 乳中 LDH 活性也相应升高。Symons 等^[13] 报道, 乳汁中的 LDH 活性是乳腺防御功能改变的敏感指标。但 Babaei 等^[3] 的观点则相反, 他认为 LDH 作为奶牛隐性乳房炎早期诊断指标既不适合也不灵敏。

乳中 LP 主要来源于白细胞的细胞成分, 具有抗微生物效应。本研究结果表明, 隐性乳房炎奶牛乳汁中的 LP 活性显著高于健康奶牛, 这与祁克宗等^[7] 和 Walstra 等^[14] 的研究结果一致。LP 不仅是牛乳的热处理指标^[15], 同时也是商品酶的重要来源^[16]。乳中的 ALP 可能来源于血清、乳腺上皮细胞和崩解的白细胞, 可以在乳中诱导氧化反应^[17]。本研究与 Eyassu 等^[2] 和 Babaei 等^[3] 研究结果均表明, ALP 活性随着乳房发生感染而升高。乳中的 MPO 是多形核嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞

释放的嗜天青颗粒的主要成分,在乳腺发炎过程中发挥着吞噬和溶菌的重要作用^[5]。本研究发现,隐性乳房炎牛乳中的 MPO 活性显著高于健康奶牛,但变化幅度不大。

本研究发现,隐性乳房炎奶牛乳汁中的 NAG、LDH、LP、ALP 和 MPO 活性均显著高于健康奶牛 ($P < 0.05$), SCC (lg SCC) 与 5 种乳酶活性呈正相关,其中 SCC (lg SCC) 与 NAG 和 LDH 活性间的相关性大于其与其他 3 种乳酶。5 种乳酶活性之间的相关性分析结果显示, NAG 与 LDH 活性之间呈正相关性,且相关性最高 ($R^2 = 0.95$)。综合以上分析结果可以认为,乳酶 NAG 和 LDH 可联合应用作为诊断奶牛隐性乳房炎的指标。但是关于应用 NAG 和 LDH 诊断奶牛隐性乳房炎及判断乳腺炎症程度的活性标准还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Silanikove N, Merin U, Leitner G. Physiological role of indigenous milk enzymes; An overview of an evolving picture [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 533-545.
- [2] Eyassu S, Dokin E F, Elna M, et al. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats [J]. *Small Ruminant Research*, 2007, 69(1/3): 154-158.
- [3] Babaei H, Mansouri-Najand L, Molaei M M, et al. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis [J]. *Veterinary Research Communication*, 2007, 31(10): 419-425.
- [4] Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 565-578.
- [5] 郭昌明, 张乃生, 周昌芳, 等. 髓过氧化物酶检测奶牛隐性乳房炎研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(6): 54-57.
Guo C M, Zhang N S, Zhou C F, et al. Developmant of the myeloperoxidase detecting bovine latent mastitis [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(6): 54-57. (in Chinese)
- [6] Leitner G, Krifucks O, Merin U, et al. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physicochemical properties of bovine milk [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(6): 648-654.
- [7] 祁克宗, 田超, 潘玲, 等. 牛乳过氧化物酶活性、电导率与隐性乳房炎的关系 [J]. *中国兽医学报*, 1996, 16(4): 397-399.
Qi K Z, Tian C, Pan L, et al. The relationship between changes of lactoperoxidase and milk electrical conductivity and latent mastitis in dairy cattle [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1996, 16(4): 397-399. (in Chinese)
- [8] 刘左仪. 几种体细胞定量测定方法的应用 [J]. *中国乳品*, 1995, 23(1): 36-39.
Liu Z Y. Several quantitative measurements of somatic cell counts [J]. *China Dairy Industry*, 1995, 23(1): 26-39. (in Chinese)
- [9] Gronlund U, Sandgren C H, Waller K P. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis [J]. *Vet Res*, 2005, 36(2): 191-198.
- [10] Fox P F, Kelly A L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 2 [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(6): 517-532.
- [11] Chagunda M G G, Larsen T, Bjerring M, et al. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 2006, 73(4): 431-440.
- [12] Batavani R A, Mortaz E, Falahian K, et al. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran [J]. *Small Rum Res*, 2003, 50(2): 45-50.
- [13] Symons D B, Wright L J. Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion [J]. *J Comp Pathol*, 1997, 84(1): 9-17.
- [14] Walstra P, Geurts T J, Noomen A, et al. *Dairy Technology: Principles of milk properties and processing* [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1999: 727.
- [15] Kelly A L, Fox P F. Indigenous enzymes in milk: a synopsis of future research requirements [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(6): 707-715.
- [16] Fox P F, Kelly A L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 1 [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(6): 500-516.
- [17] Østdal H, Bjerrum M J, Pedersen J A, et al. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(9): 3939-3944.