

农业农村部发布《家畜口蹄疫防控技术指南》

当前,我国口蹄疫疫情形势总体平稳,但国家口蹄疫参考实验室发现部分猪群中口蹄疫流行毒株发生变异,同时中东地区近年来流行的南非2型(SAT 2型)口蹄疫病毒传入我国风险较高,防控工作面临新挑战。为进一步指导做好口蹄疫防控工作,特制定本技术指南。

一、确保疫苗免疫到位

(一)科学选择疫苗。疫苗免疫是口蹄疫防控的有效手段。口蹄疫有7个血清型,不同血清型之间无交叉免疫保护性,同一血清型不同毒株的抗原性也存在差异,需选择疫苗毒株与优势流行毒株匹配性好的疫苗。从监测数据看,目前我国猪群中主要流行O型CATHAY 拓扑型毒株和O型Mya-98毒株,牛羊群中主要流行O型Ind-2001e毒株。从国家口蹄疫参考实验室对流行毒株和疫苗株抗原匹配性分析看,当前部分疫苗毒株与猪CATHAY流行毒株匹配性下降。为确保防控效果,选择使用抗原谱广、纯度高的疫苗,并实施加强免疫,提高保护效果。各地在监测工作中,重点关注口蹄疫免疫群体中的发病畜,及时将阳性样品送国家口蹄疫参考实验室进行病原分析。密切跟踪流行毒株变异情况,评价疫苗免疫的有效性。

(二)规范实施免疫。鼓励有条件的养殖场监测幼畜母源抗体水平,通常畜群母源抗体合格率在50%左右时,进行首次免疫。仔猪可选择在28—60日龄时进行初免,羔羊可在28—35日龄时进行初免,犊牛可在90日龄左右进行初免。首次免疫后,间隔1个月进行一次加强免疫,以后每隔4—6个月再次进行加强免疫。畜群在调运前21—28天可进行一次强化免疫。免疫前应认真阅读疫苗使用说明书,检查家畜健康状况和疫苗性状,遵守疫苗注射操作规程,严格消毒注射器械和部位,注射深度应适中,注射后观察不良反应。

(三)评估免疫效果。免疫后需定期监测抗体水平,评估免疫效果。使用灭活疫苗免疫的,按GB/T 18935—2018《口蹄疫诊断技术》推荐的ELISA方法检测抗体;使用合成肽疫苗免疫的,采用VPI结构蛋白抗体ELISA方法检测

抗体。猪免疫28天后,牛羊等免疫21天后,抗体检测结果合格,判定为个体免疫合格。免疫合格个体数量占免疫群体总数不低于70%的,判定为群体免疫合格。根据监测结果,及时调整免疫程序或实施补免。

二、加强疫病风险监测

(一)强化边境地区监测。中东地区持续流行的SAT 2型口蹄疫病毒,可能通过动物或动物产品贸易、野生动物跨境活动及走私等途径传入我国。边境地区要加大排查力度,科学布局监测场点,针对接壤地区、动物或动物产品集散地等重点区域和场所,强化病原学监测,检出阳性的,及时报送监测信息,并及时将阳性样品送国家口蹄疫参考实验室作进一步分析。

(二)强化重点环节监测。要强化调运、屠宰环节和散养养殖户等免疫薄弱环节的监测,加大抽样检测比例和频

次,及时组织补免,筑牢防疫屏障。密切关注不同口蹄疫病毒株在畜群中的感染和流行状况,及时发现变异毒株。

(三)科学选择检测试剂。目前市售检测试剂的敏感性和特异性存在差异,部分抗体检测试剂存在血清型交叉检出情况。要使用口蹄疫样品筛选检测试剂,根据检测目的选择相应试剂,免疫效果评估应选择能反映免疫保护水平、且特异性好的检测试剂,并通过标准样品等质控品跟踪评价所用试剂的稳定性。

三、强化家畜及其产品的检疫

(一)严格产地检疫。家畜离开饲养地之前,养殖场(户)应当向所在地动物卫生监督机构申报检疫。已经取得产地检疫证明的,从交易市场继续出售或运输的,货主应当向所在地动物卫生监督机构申报检疫。动物卫生监督机构受理检疫申报时,应当结合当地口蹄

疫疫情状况,并根据动物检疫管理办法和检疫规程规定作出是否受理决定。实施检疫时,官方兽医或协检人员应当了解养殖场(户)是否按规定进行了口蹄疫免疫,且在免疫保护期内。检疫合格的,出具检疫证明;检疫不合格的,按照国家有关规定处理。

(二)强化屠宰检疫。屠宰加工场所要严格执行家畜入场查验登记、待宰巡查等制度,查验进场待宰家畜的产地检疫证明和畜禽标识,发现家畜出现疑似口蹄疫症状的,应当立即向农业农村主管部门或者动物疫病预防控制机构报告。

四、强化生物安全管理

指导养殖场户根据本场实际建立人员、车辆、畜群、物资等管理制度,严格落实生物安全措施。限制无关人员进出养殖场,严格执行进出人员更衣换鞋、手部消毒等卫生制度,有条件的养殖场,可在入口处设置淋浴间。禁止外

来车辆随意进入养殖场,确需进入的,应彻底清洗消毒。场内严格实施净区和污区管理,人员、物资、车辆、家畜等应遵循从低风险区向高风险区移动的原则。落实引种隔离观察制度,确认畜群健康后方可混群饲养。

五、严格疫情报告处置

一旦发现病畜出现体温升高,唇部、舌面、齿龈、鼻镜、蹄踵、蹄叉、乳房等部位有水疱等症状,要立即向所在地农业农村主管部门或者动物疫病预防控制机构报告,限制家畜及其产品、饲料及垫料、废弃物、运载工具、有关设施设备移动。对所有病死畜、被扑杀畜及其产品、排泄物,以及被污染或可能被污染的饲料、垫料及污水等,进行无害化处理。对被污染或可能被污染的物品、用具、交通工具、圈舍环境等进行彻底清洗消毒。

(农业农村部)

蜂胶中多酚化合物对奶牛乳腺炎的缓解作用及机制研究进展



■本报记者 杨丽霞 摄

奶牛乳腺炎主要是由病原体感染等多方面因素引起的炎症性疾病,导致泌乳量和乳品质大幅下降,给奶牛养殖业和乳制品行业带来严重经济损失。乳腺炎可能受NF-κB、MAPK、JAK-STAT、PI3K-AKT-mTOR和Nrf2-ARE等信号通路调控。蜂胶是由蜜蜂工蜂采集植物树脂,并加入其蜡腺、上颚腺等分泌物加工形成,其主要活性成分是多酚化合物,可通过杀灭奶牛乳腺炎病原、降低炎症反应、作为疫苗佐剂等方式有效缓解奶牛乳腺炎。本文概述了乳腺炎的作用机制,总结了蜂胶提取物及多酚缓解奶牛乳腺炎的作用效果,为更好地将蜂胶中多酚化合物应用于奶牛乳腺炎防治提供理论依据。

祝梅斐 李婧妍 王炳
李珊珊 胡福良

奶牛乳腺炎的调控机制

1. 核因子κB

核因子κB(Nuclear Factor Kappa B, NF-κB)是一种可以参与免疫和炎症反应的转录因子。NF-κB信号通路通过白细胞介素1(Interleukin-1, IL-1)、白细胞介素6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素12(Interleukin-12, IL-12)和肿瘤坏死因子(Tumour Necrosis Factor-α, TNF-α)等促进炎症因子,以及如白介素8(Interleukin-8, IL-8)、单核细胞趋化蛋白1(Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)和CXCL10(CXCL10)等趋化因子的产生调节炎症反应。越来越多的研究证明,可以通过抑制NF-κB信号通路的活化来缓解奶牛乳腺炎。如Wang等研究发现,在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠乳腺上皮细胞(Mouse Mammary Epithelial Cells, mMEC)和患有乳腺炎的小鼠乳腺组织中,磷酸化的NF-κB p65表达量显著增加,而经过丁酸钠处理后,NF-κB信号通路的活化被抑制,从而下调炎症细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达。当金黄色葡萄球菌侵入奶牛乳腺上皮细胞(Bovine Mammary Epithelial Cells, BMEC)后,NF-κB的p65亚基从细胞质易位到细胞核,而经过药物的处理,可以阻止该过程发生,抑制NF-κB活化,从而达到缓解乳腺炎的效果。Zhou等构建了LPS诱导的小鼠乳腺炎模型,发现通过抑制NF-κB中p65的磷酸化和IκBα的降解,可以缓解奶牛乳腺炎的炎症反应。综合以上所述,NF-κB p65在抵御乳腺组织和乳腺上皮细胞的炎症损伤中发挥了至关重要的作用。

2. 丝裂原活化蛋白激酶

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPKs)是一组在真核生物中高度保守的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶。在哺乳动物中有3种典型的MAPK,包括细胞外信号调节激酶(Extracellular Signal-Regulated Kinase, ERK)、c-JUN氨基末端激酶(c-Jun Amino-Terminal Kinase, JNK)和p38。活化的MAPK磷酸化多种分子,包括转录因子如c-Jun、c-Myc和ATF2,从而引起增殖、迁移、分化凋亡、自噬和炎症反应等多种细胞反应。乳腺上皮细胞经LPS刺激后,MAPK信号通路被激活,且炎症细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达量增加,p38、ERK和JNK的磷酸化表达上调。NF-κB和MAPK通常同时发挥作

用。在LPS诱导的小鼠乳腺炎模型中,通过抑制NF-κB p65、ERK1/2和p38的磷酸化可以减轻炎症反应。因此,MAPK信号通路在缓解奶牛乳腺炎的过程中发挥重要作用。

3. JAK-STAT

Janus 激酶(Janus Kinase, JAK)包括JAK1、JAK2、JAK3和酪氨酸激酶2(Tyrosine Kinase 2, TYK2),在炎症细胞因子信号转导途径中起核心作用,JAK2基因与IL-17、IL-6、IL-4和干扰素γ(Interferon-γ, IFN-γ)等奶牛乳腺炎抗性表型性状相互作用表明,JAK2被认为是奶牛乳腺炎治疗的潜在靶点。JAK2还可以调节NF-κB和MAPK信号通路。Lan等研究发现,LPS诱导的奶牛乳腺上皮(Mac-T)细胞经JAK2敲除后,IκB、NF-κB、p38、ERK1/2和JNK1/2的磷酸化表达显著增加,而上述现象在未敲除JAK2的Mac-T细胞中呈现相反的变化,这表明通过激活JAK2可以抑制NF-κB和MAPK信号通路的激活,从而发挥抗炎作用。信号转导与转录激活因子(Signal Transducers And Activator of Transcription, STAT)家族是JAK家族的下游分子,可以调节炎症相关基因的转录,其中STAT3可以由IL-6刺激活化促进炎症反应。Matija等研究发现,STAT5与STAT3的表达低于阈值,促炎细胞因子会增加。STAT5也在乳腺发育和调控泌乳合成蛋白表达方面起到重要作用。在没有完整的STAT5位点时,乳蛋白基因表达受损。通过抑制JAK2和STAT5的磷酸化可以抑制奶牛乳腺上皮细胞β-酪蛋白的合成。因此,JAK2-STAT3和JAK2-STAT5可能在防治奶牛乳腺炎和维持泌乳功能中发挥作用。

4. PI3K-AKT-mTOR

磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphoinositide, PI3K)是磷酸化磷脂酰肌醇家族中的重要一员。AKT,也称为蛋白激酶B(Protein Kinase B, PKB),是PI3K下游的一个关键分子,是一种丝氨酸苏氨酸特异性蛋白激酶;通过将相应的底物磷酸化可促进细胞存活、生长和增殖,也可以参与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian Target of Rapamycin, mTOR)的调控以及与其他通路如NF-κB和MAPK之间的相互作用。PI3K/AKT/mTOR信号通路是奶牛乳腺上皮细胞生长过程中的重要部分,在炎症方面也发挥一定作用。Jiang等研究证明桑色素可通过增加PI3K和AKT的磷酸化激活PI3K/AKT信号通路来抑制LPS诱导的小鼠乳腺炎。Chen等研究发现,PI3K、AKT和mTOR磷酸化表达的增加可以激活PI3K/AKT/

mTOR通路,进而抑制NF-κB的活化,减少促炎细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α的产生,从而缓解金黄色葡萄球菌诱导的小鼠乳腺炎炎症反应。Liu等研究发现PI3K/AKT/mTOR信号通路因促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)的保护作用下,可以使LPS刺激后造成炎症损伤的MAC-T细胞增强抗凋亡和抗自噬效果。因此,PI3K/AKT/mTOR信号通路在乳蛋白合成、乳腺上皮细胞生长发育、乳腺组织和细胞的炎症损伤等方面发挥着重要作用。

5. Nrf2-ARE

核因子E2相关因子2(Nuclear Factor Erythroid-Related Factor 2, Nrf2)是一种转录因子,Nrf2与抗氧化反应元件(Antioxidant Responsive Element, ARE)结合可以调控抗氧化酶基因的转录,增强细胞对氧化应激的防御机制,已成为炎症性疾病的重要治疗靶点。乳腺炎与氧化应激密切相关。李泳欣等研究发现与野生型小鼠相比,Nrf2基因敲除的小鼠经LPS诱导乳腺炎后,Nrf2和血红素加氧酶1(Heme Oxygenase-1, HO-1)的基因表达量没有增加,且线粒体凋亡和内质网应激的现象更严重,这表明Nrf2的表达可能在预防氧化应激和细胞器应激中发挥重要作用。Nrf2还可以通过促进下游抗炎症基因的表达来减轻炎症,如GPR109A可以促进HO-1的表达而发挥抗炎作用。因此,调节Nrf2、Keap1及其下游基因如HO-1的表达可能是缓解奶牛乳腺炎的潜在机制。

蜂胶缓解炎症的作用效果

蜂胶是蜜蜂工蜂采集植物树脂,并加入其蜡腺、上颚腺等分泌物加工形成的粘性物质。由于蜂胶原料不易溶于水,为更有效地利用蜂胶,常规方式是将蜂胶原料粉碎过筛,利用乙醇溶剂提取得到蜂胶提取物。蜂胶早在公元前300多年就被用于愈合伤口和治疗其他炎症性疾病,近几十年蜂胶及其单体在抗炎方面的研究受到广泛关注。在不同的炎症模型如LPS诱导小鼠急性肺损伤模型、慢性温和不可预知性应激(Chronic Unpredictable Mild Stress, CUMS)刺激小鼠神经炎症模型、葡聚糖硫酸钠(Dextran Sulphate Sodium, DSS)诱导小鼠急性结肠炎模型、角叉菜胶和完全弗氏佐剂(CFA)诱导小鼠机械性痛觉和足肿胀模型中,应用p-香草酸、阿魏酸、高良姜素和香草酸等蜂胶中的多酚物质可发挥相似的抗炎效果:抑制促炎细胞因子如TNF-α、IL-6、IL-1β的释放,抑制相关信号通路如NF-κB和MAPK的激活,可见

蜂胶及其多酚物质在炎症方面具有良好的治疗潜力。

在临床和亚临床乳腺炎防治中,蜂胶可以通过抑制炎症反应、灭杀奶牛乳腺炎病原、作为疫苗佐剂加强免疫等方式表现出良好的作用效果。在临床型乳腺炎研究中,朱剑英利用复方蜂胶擦剂治疗患临床型乳腺炎奶牛,发现奶牛乳房区红肿症状消失,泌乳量回升;Santana等研究发现蜂胶对患有临床型乳腺炎的奶牛体内分离出的金黄色葡萄球菌具有杀菌效果。在亚临床型乳腺炎研究中,研究发现复方蜂胶擦剂治疗效果优于抗生素;另外,李美荣等制备了含蜂胶佐剂的灭活疫苗,并建立小鼠模型发现最佳免疫剂量为0.3毫升,结果证明该疫苗对奶牛隐性乳腺炎具有良好的免疫保护效果。Wang等探究了中国蜂胶乙醇提取物(Ethanol Extract of Chinese Propolis, EECPP)对TNF-α、LPS、脂磷壁酸(Lipoteichoic Acid, LTA)、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等多种乳腺炎病原诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症损伤的影响,证明EECPP可以通过调节炎症因子和增强抗氧化基因Nrf2的表达发挥抗炎效果。欧爱群等探究EECPP对LPS诱导奶牛乳腺上皮细胞炎症模型的影响,发现EECPP预处理显著降低TNF-α、IL-6和IL-1β等炎症相关基因mRNA转录水平,上调紧密连接蛋白的表达,从而缓解LPS诱导的乳腺上皮细胞屏障功能紊乱。宋美洁等研究发现EECPP对LPS诱导小鼠乳腺炎具有良好的预防作用,并维持乳腺上皮紧密连接结构的完整性,保护血乳屏障。

蜂胶中多酚化合物的作用效果

蜂胶中的主要活性成分为多酚化合物,以类黄酮化合物和酚类化合物为代表,其中类黄酮化合物是以C6-C3-C6为骨架的低分子量多酚化合物,酚类化合物是以酚酸及其衍生物为主的多酚化合物。迄今为止,已经从世界不同类型蜂胶中分离鉴定出了500多种化合物。并且蜂胶作为动植物双源性天然产物,其大部分成分是植物次生代谢产物,所以蜂胶中多酚化合物与植物多酚成分相似。近几年,除了蜂胶提取物治疗乳腺炎的研究,针对蜂胶中多酚化合物单体对乳腺炎的作用研究也呈现上升趋势。蜂胶中多酚化合物可通过调节NF-κB、MAPK、JAK-STAT、PI3K-AKT-mTOR、Nrf2-ARE等多种信号通路来缓解奶牛乳腺炎。蜂胶中多酚化合物中类黄酮化合物和酚酸类化合物在奶牛乳腺炎中具有较好的作用效果,表明蜂胶中多酚化合物在

治疗乳腺炎方面具有较大潜力。

1. 类黄酮化合物

类黄酮化合物主要包括黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇、异黄酮等,被认为是蜂胶特殊药理活性的主要因素。含量较高的类黄酮化合物主要为高良姜素、松素素、白杨素等,常见的类黄酮化合物有芹菜素、木犀草素(Luteolin)、槲皮素(Quercetin)和杨梅素(Myricetin)等。其中,槲皮素、高良姜素、山奈酚、芹菜素存在于绝大部分地区如亚洲、南美洲和地中海地区;松素素、白杨素、木犀草素、杨梅素部分存在于亚洲、巴西地区。目前,用于缓解奶牛乳腺炎的蜂胶类黄酮化合物包括槲皮素、杨梅素、木犀草素、柚皮素等,虽然这些化合物在蜂胶中含量相对较低,但由于其具有较强的抗炎活性,在奶牛乳腺炎的防治研究中得到了广泛关注。

槲皮素又名栲精,属于黄酮醇类化合物,在植物中广泛存在,并且具有多种生物活性,如抗炎、抗氧化、抗癌等。据研究显示,槲皮素能够通过调节PI3K/AKT、mTOR、NF-κB、MAPK、JAK/STAT、Nrf2等多种信号通路,抑制促炎细胞因子的表达,达到缓解炎症的作用效果。杨梅素属于黄酮醇类化合物,其母环结构上相比其他黄酮类物质含有更多羟基,所以相对槲皮素等其他黄酮醇类化合物,杨梅素表现出更强的抗氧化、抗炎、抑菌等药理活性。其抗炎作用可能是通过抑制NF-κB和STAT1的活化,下调Nrf2介导的HO-1水平,从而抑制促炎细胞因子的表达。木犀草素属于黄酮类物质,包含抗炎、抗氧化、抗过敏等多种药理活性。木犀草素可以通过多种方式缓解炎症反应,比如减少活性氧的产生,调节NF-κB、MAPK、JAK/STAT等多种信号通路,影响花生四烯酸的代谢以及抑制炎症因子的表达等。柚皮素(Naringenin)属于二氢黄酮类化合物。研究表明,柚皮素具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化、抗癌等多种药理作用。高启松利用柚皮素对LPS刺激的奶牛乳腺上皮细胞进行预处理,对LPS和柚皮素+LPS处理的两组细胞进行转录组测序,发现柚皮素可能通过影响HIF-1信号通路,减少炎症介质的产生,从而提高奶牛乳腺上皮细胞对LPS的抵抗能力;通过小鼠乳腺炎模型,发现柚皮素处理后的小鼠乳腺组织相较于LPS组形态完好,没有明显的红肿,且炎症因子IL-6、IL-8、TNF-α表达量有所降低,证明了柚皮素对于奶牛乳腺炎的保护作用,但具体机制有待进一步验证。

2. 酚酸类化合物

酚酸类化合物中含量较高的酚酸类化合物主要为咖啡酸(Caffeic Acid)及其衍生物咖啡酸苯乙酯(Phenyl Ethyl Caffeic Acid, CAPE)、阿魏酸(Ferulic Acid)等。其中,咖啡酸、CAPE和阿魏酸在大部分地区(如亚洲、南美洲和东欧)的蜂胶中都存在。在LPS诱导的BMEC炎症模型中,咖啡酸抑制炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-8的表达,抑制IκBα的降解和p65蛋白的磷酸化,从而抑制NF-κB信号通路的活化来缓解奶牛乳腺上皮细胞的炎症损伤;咖啡酸还可显著抑制乳腺组织中p38、JNK和ERK蛋白的磷酸化,表明咖啡酸可有效抑制LPS引起的小鼠乳腺炎MAPK信号通路的激活。CAPE在TNF-α诱导奶牛乳腺上皮细胞模型中可显著抑制NF-κB激活,并增加Nrf2转录活性。此外,绿原酸(Chlorogenic Acid)是酒神菊属蜂胶的特征性成分之一,在抗炎、抗氧化等生物活性应用方面具有巨大的潜力,可以缓解金黄色葡萄球菌刺激诱导的BMEC炎症损伤。综上所述,蜂胶中多酚化合物具有较强的抗炎作用,在乳腺炎模型研究中效果良好,有望成为乳腺炎治疗的潜在药物。

小结与展望

目前,乳腺炎依然是奶牛养殖业的重大难题。近些年来,研究者致力于探究绿色安全的天然物质对奶牛乳腺炎的治疗潜力,蜂胶由于具有良好抗炎活性受到广泛关注。蜂胶原料产量相对较少(400—500吨/年),在奶牛养殖中使用蜂胶的成本相对较高,但在畜牧业中仍具有很大的应用潜力。一方面,蜂胶提取物的残渣中仍包含生物活性成分,可以尝试应用于畜牧业生产中,有利于促进畜牧业的绿色发展。另一方面,结合蜂胶中多种有效成分制成疗效优良的制剂,能够为畜牧业生产中奶牛乳腺炎的防治提供新的解决思路。目前,针对蜂胶以及蜂胶中多酚化合物的研究仍较少,而且停留于细胞和小鼠模型水平上,对奶牛个体水平的验证实验尚未开展。现有研究已经证明大多数蜂胶中多酚化合物可以有效缓解炎症。因此,在未来的研究中,利用细胞和小鼠模型以及进一步对奶牛个体的临床验证实验尚未开展。现有研究已经证明大多数蜂胶中多酚化合物可以有效缓解炎症。因此,在未来的研究中,利用细胞和小鼠模型以及进一步对奶牛个体的临床验证实验尚未开展。现有研究已经证明大多数蜂胶中多酚化合物可以有效缓解炎症。因此,在未来的研究中,利用细胞和小鼠模型以及进一步对奶牛个体的临床验证实验尚未开展。

(祝梅斐 李婧妍 李珊珊 胡福良
单位:浙江大学动物科学学院;王炳单位:中国农业大学动物科学技术学院,动物营养国家重点实验室)