

顾蓓蓓,卢劲晔,马卉,等. 活性氧自由基在试验性乳腺炎大鼠发病机制中的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):294-297.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.085

活性氧自由基在试验性乳腺炎大鼠发病机制中的作用

顾蓓蓓^{1,2}, 卢劲晔¹, 马卉², 卢炜¹, 刘静¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 泰州出入境检验检疫局, 江苏泰州 225300)

摘要:为探讨活性氧自由基在宿主抵抗乳腺感染中的作用,选取36只清洁级SD怀孕大鼠,于产后72 h经乳头管灌注10 μg/侧脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)至第4对乳腺(两侧)内。分别于灌注前(定义为0 h)及灌注后2、4、8、16、24 h(n=6)颈静脉放血处死动物,采集样品。结果显示,LPS诱发乳腺炎引起白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)及细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达显著升高,从而促进嗜中性粒细胞(neutrophil, PMN)迁徙及活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的释放。乳腺组织N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAGase)活力与ROS释放变化结果一致,LPS灌注后各时间点均显著升高,并于灌注后8 h达到峰值。结果表明,PMN是宿主抵御乳腺感染的主要效应细胞,通过释放ROS消灭病原菌,但大量释放的ROS也是引起组织损伤的重要原因。

关键词:活性氧;中性粒细胞;乳腺炎;大鼠

中图分类号: R979.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0294-03

乳腺炎是危害奶牛产业的一种重要疾病,诱发因素众多,其中以病原菌感染最为严重。目前,临床上分离的乳腺炎致病菌超过137种,根据病原来源和传播方式可分为传染性病原和环境性病原两大类。大肠杆菌是环境性病原的代表,也是临床型乳腺炎中最常见的类型。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是大肠杆菌细胞壁的组成成分,是大肠杆菌引起炎症反应的主要致病因子。研究表明,LPS诱发的试验性乳腺炎具有炎症反应一致、重复性高的优点,是研究大鼠乳腺炎发病机制的理想模型。

病原菌入侵宿主是复杂、动态的多因子作用过程,从病原与宿主互作的角度研究病原感染后的致病机制,以及从分子水平了解宿主的免疫反应是控制疾病的关键所在。已有研究证实,活化的PMN通过释放大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)杀灭病原微生物,ROS是分子氧在还原过程中的一系列代谢中间产物,主要包括O₂·、H₂O₂、HOCl、·OH等^[1-2]。对胞内感染菌的研究发现,ROS的产生对清除胞内微生物是必需的,但持续过度激活产生过量氧化剂,超过局部抗氧化剂的防御反应时会降解蛋白多糖,降低细胞外基质与乳腺上皮的黏附性,引起乳腺上皮细胞死亡、脱落及泌乳功能的损伤^[3-4]。深入了解ROS在宿主抗乳腺感染过程中的作用具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

收稿日期:2015-06-25

基金项目:江苏省自然科学基金面上研究项目(编号: BK20151354);

江苏省现代畜牧与新兽药工程技术中心开放课题(编号: TGC2XKF1402)。

作者简介:顾蓓蓓(1983—),江苏兴化人,博士,兽医师,研究方向为动物泌乳生化与营养生化。E-mail: beibeig. gu@163.com。

36只清洁级怀孕SD大鼠购自上海实验动物中心。于产后72 h诱发试验性乳腺炎,经乳头管注入10 μg/侧LPS至大鼠第4对乳腺(两侧)内。分别于灌注前(定义为0 h)及灌注后2、4、8、16、24 h(n=6)颈静脉放血处死动物,收集血清、肝素抗凝血、乳腺组织用于后续分析。

1.2 主要试剂与仪器

LPS(O55:B5)、乙酸肉豆蔻佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、双氢罗丹明(dihydrorhodamin, DHR 123)均购自Sigma公司。TRIzol购自Invitrogen公司, RNA酶抑制剂、随机引物、M-MLV、dNTPs均购自Promega公司, SYBR® Green PCR Master Mix购自Toyobo公司。N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAGase)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。

FMJ-182型放射免疫γ计数器(中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂), UV755B型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), BH₂型光学显微镜(日本奥林巴斯公司), 组织匀浆器(瑞士Kinematica AG), 核酸浓度测定仪(德国Eppendorf Biophotometer), 7300型荧光定量PCR仪(ABI Prism), 流式细胞仪(美国BD Biosciences)。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 组织匀浆及蛋白浓度的测定 准确称取1 g乳腺组织加入生理盐水6 mL,冰浴匀浆后于10 000 g 4℃离心30 min,上清液于-20℃冰箱保存备用。使用前采用Bradford法测定蛋白浓度。

1.3.2 乳腺组织与血清中NAGase、MPO、IL-8的测定 乳腺组织与血清中NAGase、MPO、IL-8的测定按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 定量PCR检测乳腺组织细胞间黏附分子-1 mRNA表达 采用TRIzol试剂盒提取总RNA,用随机引物同时对所

有样品进行反转录,建立各样品的 cDNA。采用所有待测 RT 产物的混合样对反应条件进行优化。反应条件为:95 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 20 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,共 45 个循环。ICAM-1 β -actin 基因引物参考已发表的文献,ICAM-1 基因编号为 NM_012967,上游:5'-GAAGTGGACCTG GCAAGAG-3';下游:5'-GTACCATTCATCTCCCGTTG-3'。 β -actin 基因编号为 NM031144,上游:5'-CCCTGTGCTGCTCACCGA-3';下游:5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

1.3.4 流式细胞术测定外周血 PMN 活性氧释放 将 100 μ L 全血加入终浓度为 100 ng/mL 的 PMA 刺激 PMN,同时设无 PMA 刺激对照(等量 PBS 代替 PMA);于 37 ℃ 静置 15 min 后加入 DHR123 工作液,终浓度为 5 μ mol/L,于 37 ℃ 下孵育 10 min;裂解红细胞,以 0.01 mol/L、pH 值 7.2 的 PBS 洗涤 2 次并重悬于 PBS 中,混匀后采用流式细胞仪检测。

检测前采用阴性对照样品优化仪器条件。首先在 FSC/SSC 二维散点图上调节 FSC 放大器增益、SSC 电压、FSC 阈值使 PMN 细胞群在图中清晰可见,确定 PMN 细胞的位置,设门于 R1;FL1 通道(波长 530 nm)检测荧光强度,调节光电倍增管增益使阴性对照荧光强度在 FL1 直方图上介于 0~101;依次检测无刺激对照和 PMA 刺激样品,每个样品获取 10 000 个细胞。以上试验重复 3 次,结果以平均荧光强度表示。

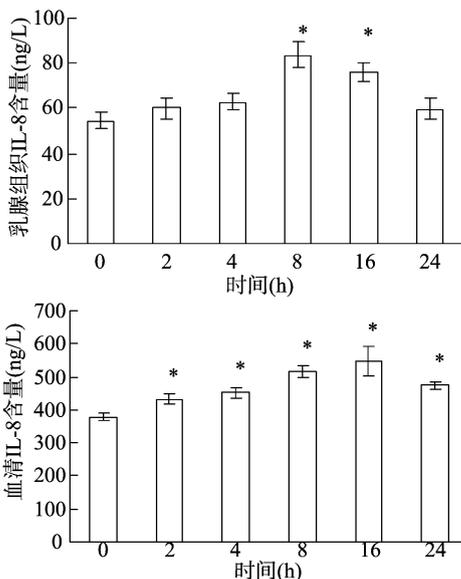
1.4 数据处理

采用 SPSS 17.0 方差分析软件对试验数据进行统计分析,统计结果以“平均值 \pm 标准误”($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 灌注 LPS 后乳腺组织与血清中 IL-8 的活性变化

由图 1 可见,与 0 h 相比,LPS 灌注后 8、16 h 乳腺组织 IL-8 含量显著升高($P < 0.05$),LPS 灌注后各时间点血清中 IL-8 含量均显著升高($P < 0.05$)。



“*”表示在 0.05 水平下与 0 h 相比差异显著。下图同图 1 灌注 LPS 后大鼠乳腺组织和血清中 IL-8 活性的变化

2.2 灌注 LPS 后乳腺组织与血清中 MPO 的活性变化

由图 2 可见,灌注 LPS 后,乳腺组织中 MPO 活性迅速上

升,与 0 h 相比差异显著($P < 0.05$),峰值出现于灌注后 8 h ($P < 0.05$)。血清中 MPO 活性的变化规律与组织中相反,与 0 h 相比 MPO 活性先下降后上升,最低点出现于 LPS 灌注后 4 h ($P < 0.05$),至 24 h 有所恢复。

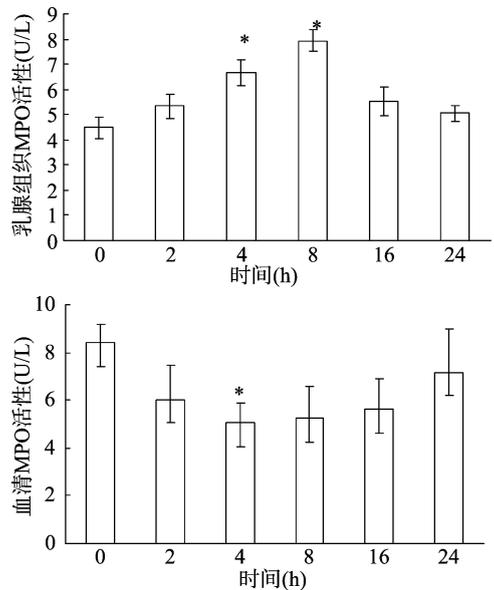


图 2 灌注 LPS 后大鼠乳腺组织和血清中 MPO 活性的变化

2.3 乳腺组织 ICAM-1 mRNA 表达的变化

试验结果(图 3)显示,在乳腺灌注 LPS 后的各时间点,乳腺组织中 ICAM-1 mRNA 相对表达均显著升高($P < 0.05$);灌注后 24 h 表达呈下降趋势,但仍显著高于 0 h。

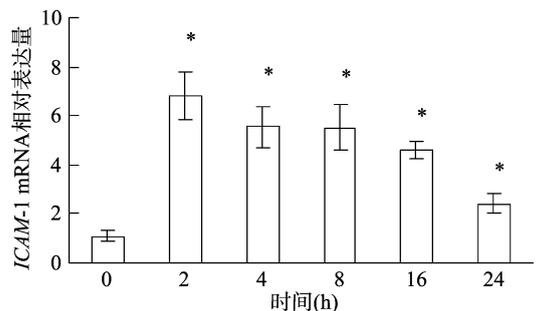


图 3 LPS 灌注后乳腺组织 ICAM-1 mRNA 表达的变化

2.4 外周血中性粒细胞活性氧释放的动态变化

试验结果(图 4)显示,灌注 LPS 后的各时间点,外周血 PMN 活性氧释放均显著升高($P < 0.05$),峰值出现于灌注后 8 h。

2.5 灌注 LPS 后乳腺组织与血清中 NAGase 的活性变化

灌注 LPS 后的不同时间点,乳腺组织中 NAGase 活性均显著升高($P < 0.05$),于灌注后 8 h 达到峰值。血清中 NAGase 活性的变化规律与组织中一致,灌注后 8 h NAGase 活性显著升高($P < 0.05$),灌注后 16 h 已恢复至正常水平(图 5)。

3 结论与讨论

病原菌入侵宿主是复杂、动态的多因子作用过程,从病原与宿主互作的角度研究病原感染后的致病机制,以及从分子水平了解宿主的免疫反应是控制疾病的关键所在^[8]。作为机体最大的外分泌腺,乳腺在进化、发育、泌乳再构建的过程中时刻面临着病原微生物的侵袭。亿万年来,在与病原微生

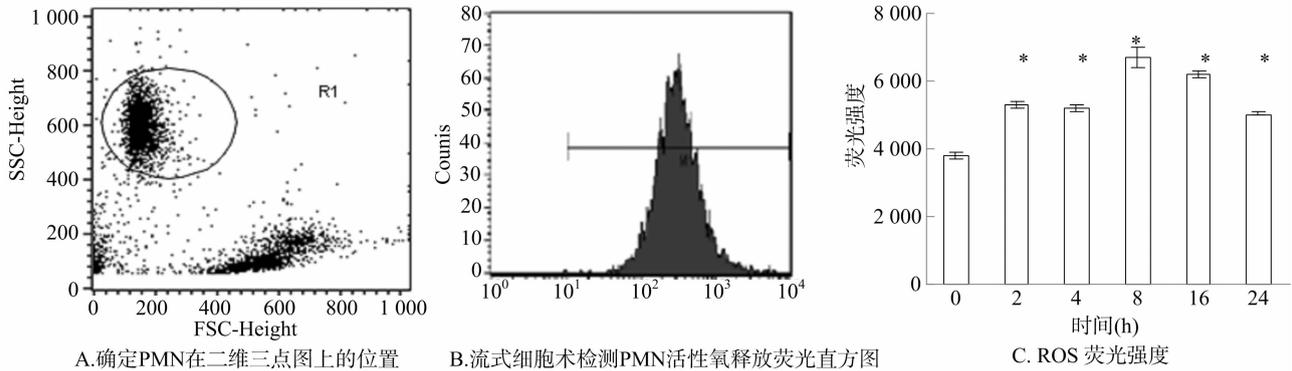


图4 LPS灌注后外周血中性粒细胞活性氧释放的动态变化

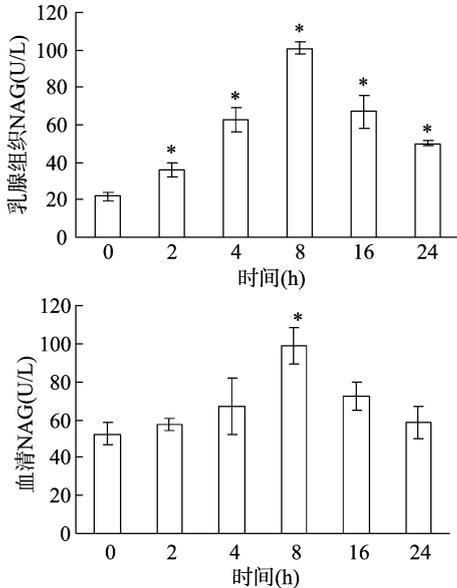


图5 灌注LPS后大鼠乳腺组织和血清中NAGase活性的变化

物的斗争过程中,乳腺进化出了复杂而精细的自主防御机制。目前对宿主抗乳房感染的研究尚不深入,这是无法有效控制乳腺炎的原因之一。

循环血液中大量的PMN在病原微生物或其他活性分子的作用下向乳腺组织迁徙,这是发生乳腺炎的重要特征。已有研究表明,细菌入侵后通过激活NF- κ B/AP-1刺激单核细胞、巨噬细胞产生多种趋化因子,从而促进PMN等吞噬细胞的趋化^[9-10]。IL-8是炎症发生时一种重要的趋化因子,对PMN具有激活作用,可诱导其变形、趋化、脱颗粒、合成生物活性脂类、整合素上调、呼吸爆发等^[11-12]。LPS灌注后的各时间点,血清中IL-8均显著升高,乳腺组织中IL-8在灌注后8、16h显著升高,提示细菌入侵后促进机体分泌IL-8,促进PMN趋化进入病灶发挥吞噬活性。此结果被MPO的活性变化规律证实。MPO是PMN的标志酶,MPO活性的高低反映了PMN在组织中的滞留和活化程度^[5]。灌注LPS后,乳腺组织中MPO活性升高,同样于灌注后8h达到峰值;血清中MPO活性的变化则与组织中相反,呈先降低后升高的趋势,动态反映了循环血液中PMN向乳腺组织迁徙的过程。

PMN是机体抵抗感染的主要非特异性防御细胞,任何PMN的功能障碍均会影响乳用家畜的生产性能。ICAM-1广泛表达于各种细胞表面,对细胞间的相互作用及PMN的黏

附聚集具有重要作用^[13]。已有研究表明,ICAM-1在感染性疾病中发挥着重要作用^[14-15],但其在乳腺炎发病机制中的作用报道较少。本研究表明,在LPS诱发的大鼠试验性乳腺炎模型中,乳腺组织中ICAM-1 mRNA表达显著升高,提示LPS刺激乳腺后通过上调ICAM-1表达,促进PMN黏附至乳腺组织。PMN进入宿主乳腺组织,主要通过释放ROS实现吞噬病原微生物^[5]。在对一些胞内感染菌的研究中发现,ROS的产生对清除胞内微生物是必需的。本研究结果显示,LPS灌注乳腺后的各时间点,ROS均显著升高,ROS是宿主抵御乳腺感染的主要效应分子。然而,ROS的产生在杀灭病原微生物的同时,对宿主细胞和吞噬细胞本身也会造成损伤。ROS释放的峰值伴随着NAGase活性的显著增加,NAGase是一种酸性水解酶,乳汁中的NAGase主要来源于乳腺上皮细胞与白细胞,NAGase活性的高低是细胞受损程度的重要指标^[7,16]。LPS灌注后4、8、16h,NAGase活性急剧升高,并于8h达到峰值,于24h恢复至正常水平。

在病原微生物或其他活性分子的作用下,大量循环血液中的PMN向乳腺组织迁徙,释放活性氧消灭病原微生物,但高毒性的活性氧也会引起乳腺组织的损伤。如何迅速启动机体的免疫反应,促进PMN等效应细胞第一时间迁徙至乳腺组织发挥吞噬效应,以及大量被激活的PMN能否迅速从乳腺腺泡清除,均决定了乳腺炎症的转归。本研究深入探讨了宿主识别和清除乳房致病因子感染的天然免疫机制,对临床上乳腺炎的免疫调控及防治具有重要现实意义。

参考文献:

- [1] West A P, Shadel G S, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(6): 389-402.
- [2] Arnoult D, Carneiro L, Tattoli I, et al. The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection [J]. *Seminars in Immunology*, 2009, 21(4): 223-232.
- [3] Lauzon K, Zhao X, Bouetard A, et al. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage [J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(12): 4295-4303.
- [4] Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control [J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(Suppl 13): 57-65.
- [5] Teixeira A S, Araújo F A, Ferreira M A, et al. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice [J]. *Life Sciences*, 2006, 78(14): 1637-1645.

陈晨,贺晶晶,邵青臣,等. 乌鳢(*Channa argus*)线粒体 *COI* 基因序列测定及其系统发育关系分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):297-299. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.086

乌鳢(*Channa argus*)线粒体 *CO I* 基因序列测定及其系统发育关系分析

陈晨,贺晶晶,邵青臣,刘坤,王加连
(盐城师范学院生命科学与技术学院,江苏盐城 224000)

摘要:为了进一步探讨乌鳢(*Channa argus*)的分类地位及其系统发育关系,通过测定其线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*CO I*) 基因部分序列,并从 GenBank 获取鳢科另外 18 种鱼类的 *CO I* 基因同源序列,以银鲳(*Pampus argentus*) 为外群,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)构建分子系统树。结果表明:(1)支持鳢科分为鳢属和副鳢属;(2)乌鳢与同属的斑鳢(*C. maculata*)等鱼类的亲缘关系较近。

关键词:乌鳢;*CO I*;序列测定;系统发育

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0297-03

鳢科隶属于鱼纲鲈形目,包括 2 属 29 种。其中鳢属 26 种,分布于中东、南亚和东亚等地;而副鳢属只有 3 种,主要分布于西非地区^[1]。乌鳢(*Channa argus*)别称北方蛇头鱼、黑鱼、生鱼、乌鱼等,是鳢科鳢属中个体大、生长快、经济价值高的名贵经济鱼类。乌鳢原产于中国、俄罗斯和韩国,国内主要分布于长江和黑龙江流域的大部分地区^[2],通常栖息于水草

丛生、底泥细软的静水或微流水中。因乌鳢具有肉质好、味道鲜美、营养丰富等特点,成为我国重要的淡水经济鱼类。长期以来,人们关于乌鳢的形态学、生态学以及人工养殖技术等方面的研究较多,而关于其分子生物学资料则很少,其分类地位和系统发育关系尚存争议。

线粒体 DNA 是真核生物细胞质中的遗传物质,呈母系遗传,具有分子量小、进化速度较快、拷贝数量多等特点,且不易发生重组现象,已成为研究物种起源、进化、分类及种群遗传分化的理想工具。与其他动物一样,线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(*COI*) 基因是鱼类线粒体 13 个蛋白编码基因之一,中度保守,既能保证足够的变异又易于被通用引物扩增,在种群遗传学研究中,可作为属、种系统进化研究的良好标记,常被用于分析亲缘关系较近物种的系统发育以及地理种群之间系统关系

收稿日期:2015-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31071897);国家级大学生创新训练计划(编号:201310324013)。

作者简介:陈晨(1995—),女,江苏兴化人,主要从事生物学学习和研究。E-mail:760990734@qq.com。

通信作者:王加连,硕士,教授,主要从事动物分子生物学及动物生态学。E-mail:jlw0901@163.com。

[6] Lam T J G M, Old R R G M, Sampimo O C. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach [J]. *Irish Vet J*, 2009, 62: 34-39.

[7] Urech E, Puhan Z, Schällibaum M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(11): 2402-2411.

[8] Naeem A, Zhong K, Moisés S J, et al. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis* [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(11): 6397-6408.

[9] Fu H, Gao R, Gao Y, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20: 54-58.

[10] Li F, Liang D, Yang Z, et al. Astragalins suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model [J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 17(2): 478-482.

[11] Fu Y, Zhou E, Liu Z, et al. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary

epithelial cells [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 155(4): 245-252.

[12] Liu S, Shi X, Bauer I, et al. Lingual antimicrobial peptide and IL-8 expression are oppositely regulated by the antagonistic effects of NF- κ B p65 and C/EBP β in mammary epithelial cells [J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48(6/7): 895-908.

[13] Bowen Y M B, Bennett C F, Nation N, et al. Amelioration of chronic and spontaneous intestinal inflammation with an antisense oligonucleotide (Isis 9125) to intracellular adhesion molecule-1 in the HLA-B27/ β 2 microglobulin transgenic rat model [J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 302(3): 908-917.

[14] 罗成,沈娜. 黄芪多糖对 LPS 诱导的脓毒症小鼠急性肝损伤 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2014(11): 203-208.

[15] 施颖琦,于成功. 姜黄素对 TNF- α 诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 的调节作用 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2014, 34(11): 1476-1480.

[16] Lam T, Olde R R, Sampimon O, et al. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach [J]. *Irish Veterinary Journal*, 2009, 62(Suppl 4): S34-S39.