

印双红,张俊波. mTOR 抑制剂对胞内李斯特菌繁殖的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):125-129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.031

mTOR 抑制剂对胞内李斯特菌繁殖的影响

印双红¹, 张俊波^{2,3}

(1. 铜仁学院大健康学院, 贵州铜仁 554300; 2. 铜仁学院农林工程与规划学院/铜仁市文化科技产业创新研究中心, 贵州铜仁 554300;
3. 浙江大学动物科技学院, 浙江杭州 3100204)

摘要:为了检测 mTOR 抑制剂雷帕霉素 (rapamycin) 对单核细胞增生李斯特菌 (Lm) 在小鼠脑微血管内皮细胞内存活的影响, 将不同浓度抑制剂雷帕霉素与细胞共同孵育, 然后将 Lm 分别感染细胞, 细菌菌落计数法计算胞内细菌数量, MTT 法检测抑制剂雷帕霉素对细胞活性的影响, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测抑制剂雷帕霉素对 Lm 介导的 IFN- γ 和 IL-6 分泌的影响, 利用试剂盒检测 caspase-1 活性。结果表明: 抑制剂雷帕霉素在 5、10、25 nmol/L 浓度时不影响细胞活性, 雷帕霉素显著抑制了 Lm 在细胞, 且与雷帕霉素浓度和感染时间相关, 雷帕霉素显著提高了 Lm 介导的 IFN- γ 、IL-6、caspase-1、IL-1 β 和 NLRP3 的 mRNA 水平。结论: 本研究表明, mTOR 抑制剂雷帕霉素可调控胞内 Lm 的存活, 雷帕霉素可增强 Lm 介导的细胞炎性体水平, 为 Lm 引起脑膜炎的致病机制提供科学依据。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 胞内存活; 雷帕霉素; 细胞活性

中图分类号: S855.99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0125-04

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称 Lm) 是一种人畜共患的革兰阳性致病菌, 同时也是四大食源性病原体之一。可在免疫功能低下的个体中, 如老年人、孕妇、新生儿等, 引起脑膜炎、败血症等严重的感染性疾病, 免疫力正常人群, 在食入一定量 Lm 污染的食品后, 也可能出现发热性胃肠炎症状^[1]。虽然该病的发病率不高, 但是死亡率可高达 20%~30%, 危害很大, 已成为全球性疾病, 上世纪 80 年代欧美国家不断发生单核细胞增生李斯特菌引起的食物中毒事件, 该病原菌才逐步受到人们的关注。单核细胞增生李斯特菌感染过程和致病机制成为研究的重点之一^[2-3], Lm 是兼性细胞内生存的病原菌, 既能感染吞噬细胞也能感染非吞噬细胞, 如巨噬细胞、肝细胞、上皮细胞及成纤维细胞等, 并在细胞中生长、增殖进而在细胞间进行传播^[4]。其感染过程可以分为 4 个阶段: 入侵、逃逸吞噬泡、增殖以及在细胞与细胞之间传播^[5-6]。

哺乳动物雷帕霉素 (Rapamycin) 靶蛋白 (mTOR) 最早作为酵母雷帕霉素靶蛋白的同源体被发现, mTOR 通过调节 mRNA 转录、蛋白翻译、凋亡、自噬以及细胞骨架组织和细胞大小等方式, 在细胞生长、增殖、代谢等方面发挥重要作用。近来 mTOR 作为免疫反应的中心调控因子正在被关注, mTOR 作为一个信号级联的中央节点指导集成免疫微环境中

的各种环境信号的输入, 调节各种免疫细胞, 包括 T 细胞、NK 细胞、APC 等各种免疫细胞的分化发育, 影响其功能活性^[7-8]。mTOR 与许多疾病密切相关, 然而与李斯特菌病关系如何, 目前尚不清楚, 本研究着重探讨 mTOR 抑制剂对李斯特菌存活的影响, 以期揭示 Lm 致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞

单核细胞增生李斯特菌 (Lm) 和小鼠脑微血管内皮细胞为笔者所在实验室保存。

1.2 主要试剂

胎牛血清和 DMEM 细胞培养液购自 GIBCO 公司; 酵母提取物、蛋白胨购自上海生工生物工程有限公司; Triton X-100 细胞裂解液、MTT 试剂盒和 DMSO 购自北京索莱宝科技有限公司; Caspase-1 活性检测试剂盒和雷帕霉素抑制剂购自碧云天公司; 小鼠 IL-6、IFN- γ 和 IL-1 β ELISA 试剂盒均购自上海依科赛生物制品有限公司。

1.3 主要仪器

生物安全柜; 超纯水处理系统; CO₂ 培养箱; 低温高速离心机; 全自动酶标检测仪, 全自动高压蒸汽灭菌锅。

1.4 MTT 试验

(1) 收集对数期的小鼠脑微血管内皮细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 10³~10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔总体积为 200 μ L, 边缘孔用无菌的 PBS 填充。

(2) 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 6~24 h 使细胞贴壁。

(3) 将不同浓度的抑制剂雷帕霉素 (5、10、20、50 nmol/L) 与细胞共同孵育, 0.1% DMSO 处理的细胞作对照, 每组设置 5 个复孔。

(4) 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 16~48 h, 倒置显微镜下观察。

收稿日期: 2017-02-22

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31502067); 博士科研启动基金 (编号: trxyDH1504); 贵州省教育厅自然科学基金重点项目 (编号: 黔教合 KY 字 [2015] 411 号); 贵州省科技合作计划 (编号: 黔科合 LH 字 [2015] 7238 号、黔科合 LH 字 [2015] 7236 号、黔科合 LH 字 [2015] 7237 号)。

作者简介: 印双红 (1986—), 女, 贵州铜仁人, 硕士, 讲师, 主要从事感染免疫学方面研究。E-mail: ysh_hong2006@163.com。

通信作者: 张俊波, 博士, 副教授, 主要从事免疫遗传与抗病机理。E-mail: zhangjunbo666@126.com。

(5)小心吸取上清,加入 180 μL 新鲜培养液,再加入 20 μL MTT(5 mg/mL,即 0.5% MTT)溶液,继续培养 4 h。

(6)弃去上清,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度。

(7)同时设置调零孔(培养基、MTT、DMSO 溶解液),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、DMSO 溶解液),每组设定 3 复孔,细胞存活率 = $(D_{\text{试验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.5 实时定量 PCR

从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站 GenBank 上查找公布相关基因设计引物,引物序列见表 1。实时定量 PCR 采用 20 μL 体系,实时定量 PCR 采用 20 μL 体系,PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。每组细胞每个时间点的细胞做 3 个重复,试验完成后用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对试验数据进行分析。

表 1 相关基因引物设计

引物名称	引物序列
NLRP3 上游	5'-TGGAGACACAGGACTCAGG-3'
NLRP3 下游	5'-ATTTACCCCAACTGTAGGC-3'
β -actin 上游	5'-GCTCTTTTCAGCCTTCCTT-3'
β -actin 下游	5'-CAGCACTGTGTTGCCATAGA-3'

1.6 Lm 侵袭小鼠脑微血管内皮细胞

抑制剂雷帕霉素与小鼠脑微血管内皮细胞作用 1 h,将 30 μL 的单克隆 Lm 接种到 20 mL 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 24 h。多次收集菌液于 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min;用 PBS 洗脱菌体 3 次,悬浮菌体,将其调整为 5.0×10^7 个/mL。以 50 : 1 (细菌个数 : 细胞个数)的比例,用 Lm 感染细胞,并将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养,在侵袭 1 h 之后每孔用 PBS 洗涤 3 次,加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。

1.7 ELISA 检测细胞因子

小鼠 ELISA 检测标准曲线的制作见操作步骤。抑制剂雷帕霉素(20 nmol/L)与小鼠脑微血管内皮细胞作用 1 h,Lm 感染细胞,将细菌 : 细胞按 50 : 1 的比例感染细胞,并将感染的细胞继续置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱。仅用 Lm 感染的细胞作为对照组。在 12 h 和 24 h 收集细胞上清液,按照说明书,完成 IL-6、IFN- γ 和 IL-1 β 的 ELISA 检测,试验重复

3 次。

1.8 统计学分析

使用 SPSS 17.0 验数据统计软件对试验数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 雷帕霉素对小鼠脑微血管内皮细胞活性的影响

不同浓度抑制剂雷帕霉素(5、10、20、50 nmol/L)与细胞作用 48 h 后,收集细胞,利用 MTT 方法检测细胞活性,结果表明,当抑制剂雷帕霉素浓度为 5、10、25 nmol/L 不影响细胞活性(图 1),而在 50 nmol/L 时细胞活性显著降低($P < 0.05$),表明雷帕霉素对细胞活性影响具浓度依赖性。

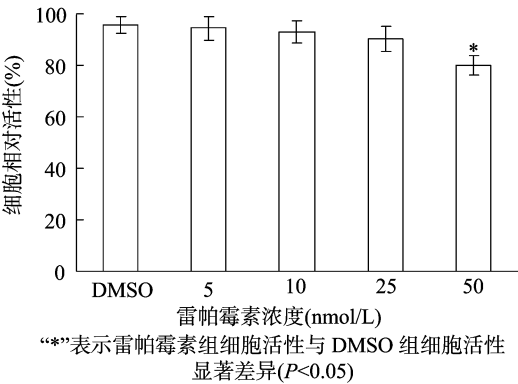


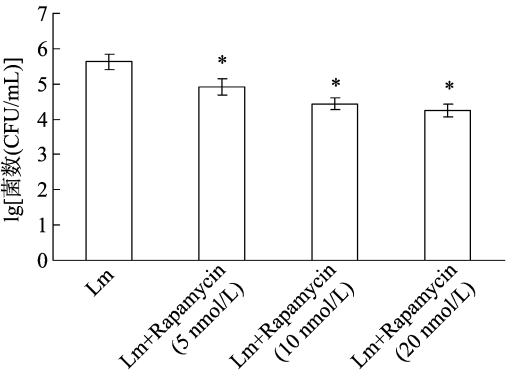
图 1 雷帕霉素对细胞活性的影响

2.2 雷帕霉素对 Lm 胞内存活的影响

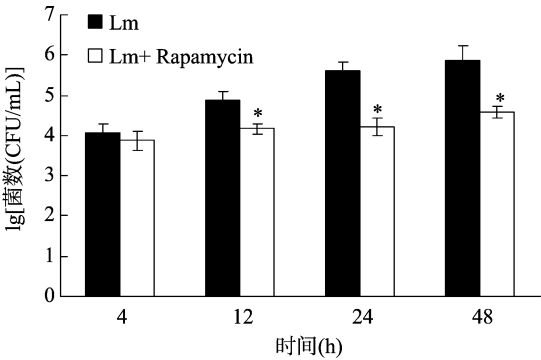
不同浓度(5、10、20 nmol/L)雷帕霉素与细胞孵育 1 h,然后将 Lm 感染细胞 24 h,裂解细胞,通过菌斑计数发现,胞内 Lm 数量随着雷帕霉素浓度的增加而减少,Lm + 雷帕霉素组细菌数量显著低于对照组($P < 0.05$);同一浓度雷帕霉素(20 nmol/L)与细胞孵育 1 h,将 Lm 感染细胞 4、12、24、48 h 点,检测胞内菌数,结果显示,在 12、24、48 h 时,雷帕霉素处理细胞中 Lm 的 lgCFU 值显著低于对照组($P < 0.05$),而在 4 h 与对照组无显著差异(图 2),表明雷帕霉素抑制胞内菌数与其浓度和感染时间相关。

2.3 雷帕霉素对 Lm 介导细胞因子水平的影响

雷帕霉素与细胞作用 1 h,然后用 Lm 感染细胞,未经雷帕霉素处理的细胞作为对照组,分别在 12 h 和 24 h 收集细胞



A. 不同浓度雷帕霉素对 Lm 的影响

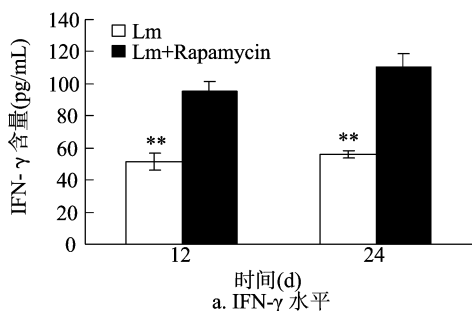


B. 相同浓度雷帕霉素在不同时间作用下对 Lm 的影响

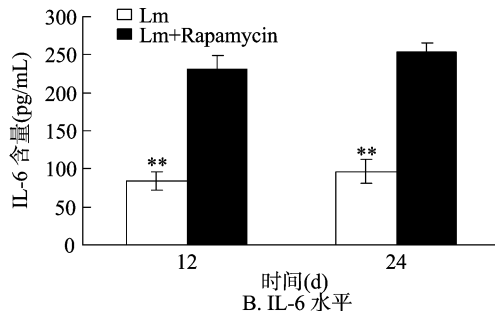
“*”表示雷帕霉素+Lm 的细菌数量显著低于 Lm 组($P < 0.05$)

图 2 雷帕霉素对胞内李斯特菌存活的影响

上清液,利用 ELISA 检测 IL-6 和 IFN- γ 水平,结果显示,雷帕霉素处理组诱导产生的 IL-6 和 IFN- γ 水平极显著高于



对照组 ($P < 0.01$)。结果表明,雷帕霉素诱导 Lm 介导 IL-6 和 IFN- γ 水平,从而提高抵抗 Lm 感染的细胞免疫(图 3)。



***表示 IFN- γ 和 IL-6 水平在 Lm 组与 Lm+雷帕霉素组间的差异极显著 ($P < 0.01$)

图3 雷帕霉素增加 Lm 介导 IFN- γ 和 IL-6 水平

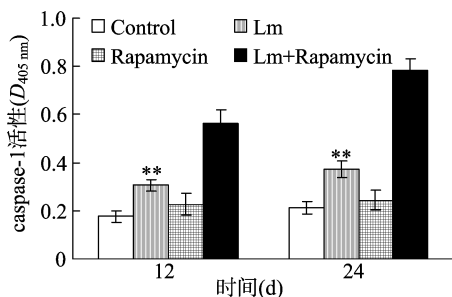
2.4 雷帕霉素对 Lm 介导 caspase-1 水平的影响

本研究先用雷帕霉素与细胞孵育 1 h,然后用 Lm 感染细胞 12 h 和 24 h,用试剂盒检测 caspase-1 活性。结果显示,Lm+雷帕霉素组细胞 caspase-1 的 $D_{405\text{ nm}}$ 值都极显著高于对照组细胞 ($P < 0.01$),结果表明,雷帕霉素可提高 Lm 介导的 caspase-1 活性,从而诱导 Lm 介导的细胞凋亡(图 4)。

2.5 雷帕霉素对 Lm 介导细胞炎性体的影响

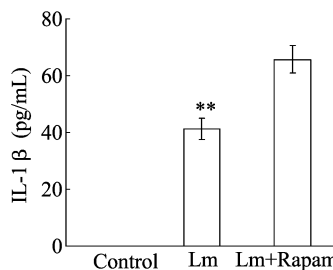
为进一步证实 Lm 是否能够激活该细胞的炎性体,并检测雷帕霉素对 Lm 介导细胞炎性体的影响,本研究先用雷帕

霉素与细胞孵育 1 h,然后用 Lm 感染细胞 24 h,用 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 的含量,用 qRT-PCR 检测 NLRP3 的 mRNA 相对水平变化。结果(图 5)显示,Lm 组的 IL-1 β 水平和 NLRP3 的 mRNA 水平显著高于对照组 Control 正常细胞 ($P < 0.01$),并且,Lm+雷帕霉素组细胞 IL-1 β 水平和 NLRP3 的 mRNA 水平显著高于对照组细胞 ($P < 0.01$),结果表明,Lm 能够激活该细胞的炎性体,雷帕霉素可增强 Lm 介导的细胞炎性体水平。

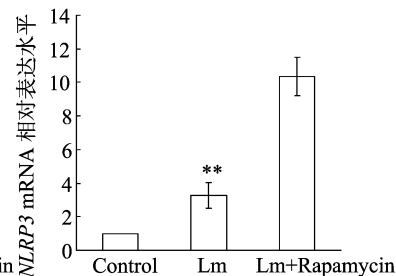


***表示 caspase-1 活性在 Lm 组与 Lm+雷帕霉素组间的差异显著 ($P < 0.01$)

图4 雷帕霉素提高 Lm 介导的 caspase-1 活性



a. IL-1 β 水平



b. NLRP3 的 mRNA 水平

***表示 IL-1 β 和 NLRP3 的 mRNA 水平在 Lm 组与 Lm+雷帕霉素组间的差异显著 ($P < 0.01$)

图5 雷帕霉素提高 Lm 介导 IL-1 β 水平和 NLRP3 的 mRNA 水平

3 讨论

mTOR 在调节帽依赖的翻译起始中扮演重要角色,并通过调控细胞蛋白质的合成作用而成为细胞生长和增殖中的重要调节器。mTORC1 通过生长因子、能量水平氨基酸来调控生长,它的活性在许多疾病中都被下调^[9]。结节性硬化复合体通过调控 Rheb-GTP 的水平变化向 mTORC1 传递生长因子和能量信号^[9]。当 TSC 失活,Rheb-GTP 的水平增高,使 mTORC1 抑制剂 FKBP38 离开 mTORC1^[10],导致 mTORC1 活化,从而保证帽依赖翻译,维持正常细胞周期进程。但最近有研究报道,在哺乳动物中,mTORC1 通过其下游效应器 4EBP1 调控细胞增殖而非细胞生长,而在低等真核生物中,两者可同时被调控^[11]。也有研究指出,mTORC1 通过感受能量因子活化的关键是磷脂酶 D 介导产生的磷脂酸而非 TSC^[12]。相比 mTORC1,mTORC2 的功能则研究较少。Jacinto 等报道,mTORC2 可调控细胞骨架肌动蛋白的形成^[13]。Akt 有 2 个磷酸化位点:serine473 和 threonine308^[14],其中 serine473 是 mTORC2 唯一的底物。mTORC2 通过 serine473 磷酸化 Akt,

从而活化 mTORC1 来发挥调节作用^[13],故 mTORC2 可认为是 mTORC1 的上游信号分子。

细胞免疫是胞内菌感染的有效免疫形式。Lm 的天然免疫应答涉及各种细胞和细胞因子及其之间的相互作用。研究表明,单核细胞、巨噬细胞以及髓样 DC 中的 PI3K-mTOR 通路对 TLR 信号是至关重要的^[15]。在对体外培养的老鼠 DC 研究发现,抑制 mTOR 后可以抑制全部的炎症反应。然而在刚分离的人单核细胞和初始 mDC 内,刺激 TLR 不改变 TSC-mTOR 通路下游的 PI3K 对炎症反应的调控。雷帕霉素处理后的炎症反应受转录因子 NF- κ B 和 STAT3 调控。在人单核细胞中,抑制 mTOR 会提高经由 NF- κ B 的炎性细胞因子 IL-12p40、IL-12p70、IL-23、IL-6 以及 TNF- α 的生成,但是会阻断通过 STAT3 的 IL-10 的释放。研究显示,NF- κ B 和 STAT3 是受 mTOR 独立调控。在炎症反应调控相类似的活体试验中,抑制 mTOR 后通过提高 IL-12 的生成可以保护老鼠抵抗 Lm 的致命感染。雷帕霉素处理处在 TLR 兴奋期的单核细胞和 DC,能够增强 T 细胞的激活,促进 IFN- γ 、IL-17 的生成^[16]。在感染初期,其中 IL-1、IL-6、TNF- α 和

IFN- γ 在抗 Lm 过程中发挥重要作用^[17]。本研究表明,PI3K 抑制剂雷帕霉素可以提高胞内 Lm 介导的 IL-6 和 IFN- γ 的分泌,有助于细胞抵抗 Lm 的感染,因此,揭示了 PI3K 抑制剂雷帕霉素调控 Lm 存活的分子机制。

靶细胞表面的死亡受体通过与配体结合,可进一步激活 FADD 进而激活下游的 caspase-8 或 caspase-10,启动 caspase 级联反应。报道还表明,mTOR 通路在 TRAIL 介导产生的多形性成胶质细胞瘤细胞凋亡中发挥了重要作用。Liu 等报道 mTOR 抑制剂雷帕霉素通过抑制 Na/K-ATPase 活性可以直接活化 TNF α 诱导细胞凋亡发生后的 Caspase-9 的活性,从而加速细胞凋亡^[18]。Barbone 等^[19]报道在实体瘤细胞中,mTOR 及其下游信号分子 S6K 基因敲除后可以显著提高 TRAIL 介导产生的活化 caspase-8,证明了 mTOR 通路通过调控死亡受体通路来抑制细胞凋亡的发生。因此,可以看出,mTOR 信号通路可以直接或间接作用于死亡受体或相应配体,从而介导细胞凋亡,但根据细胞类型的不同,其作用机制也不一样。

炎性体的活化在病原感染过程中受到严密调控,过度的活化会造成大量的细胞死亡和组织损伤。炎性体的活化需要第一信号和第二信号共同调节^[20-21],炎性体通过第一信号,上调炎性体各成员基因以及 IL-1 β 前体的转录;通过第二信号炎性体各个成员装配形成多蛋白复合物。炎性体活化后主要促进 IL-1 β 、IL-18 等促炎症细胞因子的分泌和介导 caspase-1 依赖的细胞死亡“pyroptosis”,进而调节宿主的免疫系统,抵抗并清除入侵的病原微生物。IL-1 β 能激活 T 细胞介导的 Th1、Th17 细胞免疫以及 B 细胞介导的体液免疫等适应性免疫^[22]。许多胞内寄生菌的毒力因子被 NLRP1、NLRP3 等胞内 PRRs 所识别,介导相应的炎性体活化。在 Lm 感染引起的 NLRP3 炎性体活化的过程中,鸟苷酸结合蛋白 5 能促进 ASC 的寡聚化,从而促进炎性体的形成。炎性体活化后,促炎细胞因子 IL-1 β 的成熟和分泌能有效刺激机体产生的免疫反应,这对于抵抗入侵的病原都具有重要意义^[23]。目前 Lm 主要能活化单核巨噬细胞和滋养层细胞的 NLRP3 炎性体^[24]、AIM2 炎性体以及 NLRC4 炎性体,而在脑微血管内皮细胞上,Lm 能活化的炎性体形式尚未见报道,结果显示,Lm 能活化脑微血管内皮细胞 NLRP3 炎性体,并且,抑制剂雷帕霉素可调控 Lm 介导的细胞炎性体水平。

本研究发现抑制剂雷帕霉素可显著降低 Lm 在小鼠脑微血管内皮细胞内的存活,由于 mTOR 信号通路与细胞凋亡关系密切,因此,推测雷帕霉素主要通过 mTOR 信号通路调控 Lm 介导的细胞凋亡,从而调控了 Lm 在细胞内的存活,研究表明雷帕霉素在调控 Lm 胞内的生存繁殖发挥重要作用,为揭示 Lm 致病机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Heinrich V, Zunabovic M, Petschnig A, et al. Previous homologous and heterologous stress exposure induces tolerance development to pulsed light in *Listeria monocytogenes* [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1-14.
- [2] 雷国伟,毛立明,李 华,等. 炎症复合体在对抗微生物感染中的作用[J]. 中国细胞生物学报, 2011, 33(12): 1301-1315.

- [3] Cemma M, Lam G Y, Stöckli M, et al. Strain-specific interactions of *Listeria monocytogenes* with the autophagy system in host cells [J]. PLoS One, 2015, 10(5): 1-16.
- [4] Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights [J]. Immunol Rev, 2011, 240(1): 160-184.
- [5] Chaudhuri S, Gantner B N, Ye R D, et al. The *Listeria monocytogenes* ChiA chitinase enhances virulence through suppression of host innate immunity [J]. mBio, 2013, 4(2): 1-9.
- [6] Reddy S, Lawrence M L. Virulence characterization of *Listeria monocytogenes* [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1157: 157-165.
- [7] Delgoffe G M, Powell J D. mTOR: taking cues from the immune microenvironment [J]. Immunology, 2009, 127(4): 459-465.
- [8] Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(5): 325-338.
- [9] Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids [J]. Cell, 2010, 141(2): 290-303.
- [10] Bai X, Ma D, Liu A, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38 [J]. Science, 2007, 318(5852): 977-980.
- [11] Seki Y, Yamamoto N, Tamura Y, et al. Phase I study for ridaforolimus, an oral mTOR inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69(4): 1099-1105.
- [12] Xu L, Salloum D, Medlin PS, et al. Phospholipase D mediates nutrient input to mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) [J]. J Biol Chem, 2011, 286(29): 25477-25486.
- [13] Moore S F, Hunter R W, Hers I. mTORC2 protein complex-mediated Akt (Protein Kinase B) Serine 473 Phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets [corrected] [J]. J Biol Chem, 2011, 286(28): 24553-24560.
- [14] Thaa B, Biasiotto R, Eng K, et al. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by semliki forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization [J]. J Virol, 2015, 89(22): 11420-11437.
- [15] Raich-Regué D, Rosborough B R, Watson A R, et al. mTORC2 deficiency in myeloid dendritic cells enhances their allogeneic Th1 and Th17 stimulatory ability after TLR4 ligation *in vitro* and *in vivo* [J]. J Immunol, 2015, 194(10): 4767-4776.
- [16] Stenger E O, Rosborough B R, Mathews L R, et al. IL-12hi rapamycin-conditioned dendritic cells mediate IFN- γ -dependent apoptosis of alloreactive CD4⁺ T cells *in vitro* and reduce lethal graft-versus-host disease [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(2): 192-201.
- [17] 张晓峰,程 洁,方维焕. 抗李斯特菌免疫机理研究进展 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 113-115.
- [18] Liu C, Bai Y, Chen Y, et al. Reduction of Na/K-ATPase potentiates marinobufagenin-induced cardiac dysfunction and myocyte apoptosis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16390-16398.
- [19] Barbone D, Yang T M, Morgan J R, et al. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids [J]. J Biol Chem, 2008, 283

薛梅,朱俊平,葛爱民. 硫酸头孢喹肟乳房注入剂对奶牛乳房炎的疗效[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):129-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.032

硫酸头孢喹肟乳房注入剂对奶牛乳房炎的疗效

薛梅,朱俊平,葛爱民

(山东畜牧兽医职业学院,山东潍坊 261061)

摘要:选择山东省潍坊市临床型乳房炎 40 头病牛作为试验动物,选取硫酸头孢喹肟乳房注入剂进行奶牛乳房炎的疗效研究。在停药后 1、3、5、7、14 d,试验组临床治愈率、细菌学治愈率、LMT 阴性率均显著高于对照组 ($P < 0.05$);在停药后 7、14 d,试验组临床治愈率、细菌学治愈率、LMT 阴性率与对照组相比均有显著差异 ($P < 0.05$)。说明硫酸头孢喹肟乳房注入剂局部用药 (75 mg/个) 的治疗效果明显好于硫酸头孢喹肟注射剂肌肉注射用药 (1 mg/kg) 的治疗效果。在停药后 5 d 所取奶样中头孢喹肟残留量远低于我国农业部 235 号公告规定的头孢喹肟在牛奶中的最大残留限量,在停药后 7 d 所取奶样中未检出头孢喹肟。

关键词:硫酸头孢喹肟乳房注入剂;奶牛乳房炎;治疗效果;治愈率;残留量

中图分类号: S858.237.2⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0129-03

头孢喹肟是动物专用的第 4 代头孢菌素类抗生素,具有抗菌谱广,抗菌活性强,吸收快、达峰时间短,残留少,在肺、乳腺等组织内达高的治疗浓度等优点^[1-2]。国外临床已经广泛用于动物的呼吸道疾病以及奶牛乳房炎的治疗^[1]。近十几年来,山东潍坊地区奶牛养殖业迅猛发展,奶牛乳房炎的发病率也不断升高^[3-4],给奶牛业造成了巨大的经济损失。在对潍坊市奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及抗菌药耐药性检测的基础上,借鉴国内外治疗奶牛乳房炎的成功经验^[5],选取齐鲁动物保健品有限公司开发的新剂型硫酸头孢喹肟乳房注入剂在潍坊地区进行奶牛乳房炎的疗效研究,对于潍坊市奶牛乳房炎的治疗具有重要意义。本试验选取潍坊地区临床型乳房炎病牛,应用不同剂型头孢喹肟进行治疗。通过临床疗效、牛奶体细胞定性检测、乳区细菌感染率和细菌学治愈率判定其治疗效果,并在用药后检测乳汁中头孢喹肟含量,检查食品安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 对潍坊地区发生临床型乳房炎的病牛,选择临床症状基本相似、泌乳期的乳房炎奶牛 40 头作为试验

动物。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂、营养肉汤、改良艾德华琼脂、S-S 琼脂、麦康凯琼脂以及细菌生化微量鉴定管等,均购自浙江杭州滨和微生物试剂有限公司。绵羊血琼脂由山东畜牧兽医职业学院防疫与检疫实验室按郭霄峰提供的方法^[6]制备。

1.1.3 试验药物 硫酸头孢喹肟乳房注入剂(泌乳期用)(75 mg/8.0 g),由齐鲁动物保健品有限公司生产提供;硫酸头孢喹肟注射剂(25 mg/支),为中牧实业股份有限公司生产,兽药字(2010)220982320;头孢喹肟标准品(纯度 $\geq 99\%$,CAS 登记号为 118443-89-3),上海圻明生物科技有限公司。

1.1.4 诊断试剂 LMT 乳房炎诊断试剂,购自中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 试验分组 对潍坊市临床型乳房炎的病牛,无菌收取奶样进行细菌分离培养,从病原鉴定为金黄色葡萄球菌、链球菌(无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌)、大肠杆菌的病牛中^[4],参考抗菌药物 II、III 期临床药效评价试验指导原则^[7],选择乳房炎症状接近的 40 头病牛作为试验动物。将 40 头病牛随机分成 2 组,每组 20 头。I 组为硫酸头孢喹肟乳房注入剂局部用药(75 mg/个)治疗试验组,II 组为硫酸头孢喹肟注射剂肌肉注射用药(1 mg/kg)治疗对照组。2 组在同样饲养条件下饲养,日粮组成和营养水平完全一样。

1.2.2 给药方案 I 组病牛先挤净患病乳区内的乳汁或分泌物,用碘酊和乙醇擦试乳头管及乳头。托起乳房,经乳头管

收稿日期:2017-01-09

基金项目:山东省现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:SDAIT-08-09);山东省潍坊市科技发展计划(编号:2014GX079)。

作者简介:薛梅(1968—),女,硕士,讲师,主要从事临床兽医。
E-mail:shdmzyhujunping@163.com。

(19):13021-13030.

[20] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. Cell, 2010, 140(6):805-820.

[21] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010, 140(6):821-832.

[22] Dinarello C A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and

receptors [J]. Semin Immunol, 2013, 25(6):389-393.

[23] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease [J]. Nature, 2012, 481(7381):278-286.

[24] Li W, Chang Y, Liang S, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to *Listeria monocytogenes*-induced animal pregnancy failure [J]. BMC Vet Res, 2016, 12:1-11.