

卢劲晔,顾蓓蓓,冯 晴,等. 视黄醇对试验性乳腺炎大鼠氧化应激的调节机制[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):138-140.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.035

视黄醇对试验性乳腺炎大鼠氧化应激的调节机制

卢劲晔¹, 顾蓓蓓², 冯 晴³, 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; 3. 江苏省东海县动物卫生监督所, 江苏东海 222002)

摘要:60只清洁级SD大鼠自怀孕10d起,每天灌胃8000 IU/(kg·d)视黄醇(溶解于大豆油),对照组灌胃等体积大豆油直至分娩。于产后72h经乳头管灌注 2×10^{12} CFU/mL大肠杆菌悬液每侧100 μ L到第4对乳腺(两侧)内,分别于灌注前(定义为0h)及灌注后12、24、48、72h($n=6$)颈静脉放血处死动物,采集样品。结果显示,试验性乳腺炎引起细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达显著升高,从而促进中性粒细胞(PMN)迁徙及活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的释放。与对照组相比,试验组ICAM-1相对表达峰值前提,乳腺组织中MPO活性降低。结果表明,PMN是宿主抵御乳腺感染的主要效应细胞,视黄醇能促进PMN迅速向乳腺组织迁徙,释放ROS消灭病原菌,发挥吞噬作用后迅速从乳腺腺泡清除减轻PMN持续浸润造成的组织损伤。

关键词:视黄醇;乳腺炎;大鼠;氧化应激;调节机制

中图分类号:S857.2⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)11-0138-03

乳腺炎是由多种非特异性的病原微生物引起的,目前临床上分离的乳腺炎致病菌超过137种,大肠杆菌是临床型乳

腺炎中最常见的类型^[1]。病原菌入侵宿主是一个复杂的动态的多因子作用过程。中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophilic leukocytes, PMN)是乳腺抵御病原菌入侵重要的防御细胞,PMN的活化在炎症的发生、发展及转归过程中发挥了重要的作用。研究证实PMN通过释放活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)杀灭病原微生物^[2-3]。ROS的产生对清除胞内微生物是必需的,但持续过度激活,超过局部抗氧化剂的防御反应时,会引起乳腺上皮细胞的死亡、脱落^[4-5]。

收稿日期:2017-01-06

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20151354);江苏农牧科技职业学院课题(编号:NSF201609);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:卢劲晔(1983—),男,江苏扬州人,博士,讲师,主要从事动物营养生理与免疫研究。E-mail:leopardleo@163.com。

期发情技术的优点。

海门山羊虽然具有较高的繁殖性能,但是羔羊成活率不高,尤其在同期发情技术下,多羔率更加明显,再加上是一个群体集中分娩的情况下,羔羊必须进行集中培育,因而羔羊的成活率更加重要,否则实施同期发情技术的意义就得不到体现。实践证明,在同期发情技术下,如何提高羔羊保育率,以0~45d最为关键,可通过羔羊哺乳期补料、早期断奶等技术措施,只要渡过这个关键时期,对其后期生长没有任何影响。

采用繁殖新技术同期发情应用于早熟品种的海门山羊,其多胎的繁殖特性没有改变,虽然初生体质量不高,但通过羔羊哺乳期补料、早期断奶等技术措施,进行集中保育,其断奶、周岁和成年体质量反而要高于杂交山羊,更重要的是便于养殖场“全进全出”的实现,可以实现规模生产。可见,生产中利用同期发情技术不仅可以切实做好对海门山羊这一优良的品种资源进行保护,也进一步提高了本品种的生产性能和繁殖性能,还可以使养殖场进行“自繁自养”,发展适度规模的养羊业,推动海门山羊集约化、标准化生产,提高经济效益。当然,在今后的实践中,对同期发情技术下,从发情配种、怀孕产羔、产品出售等生产的全过程如何实施科学化、标准化控制以及如何提高统一保育的相关措施,是需要重点攻关的地方,也是让海门山羊生产向适度规模化饲养和向产业化方向发展的关键。

参考文献:

- [1]施健飞,王子玉,张 浩,等. 长江三角洲白山羊的繁殖特性及高效繁殖措施[J]. 湖南农业科学,2010(19):122-124.
- [2]徐峥嵘. 甘肃细毛羊同期发情技术的研究[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013,29(2):50-51.
- [3]江赵兴,袁树成. 对海门山羊保护与开发利用的思考[J]. 中国畜牧业,2011(20):67-68.
- [4]何远清. 对海门山羊品种开发的几点思考[J]. 安徽农业科学,2007,35(30):9547-9548.
- [5]李洋静,谢恺舟,李拥军,等. 海门山羊肉品质特性的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯,2009(6):10-12.
- [6]戴 晖,陈启康,顾拥建,等. 海门山羊品种资源与生产性能研究[J]. 畜牧与兽医,2013,45(2):45-47.
- [7]杜秉全,张光景,张佳慧,等. 海门山羊繁殖性能的测定[J]. 上海畜牧兽医通讯,2012(5):44.
- [8]张建华. 放大产业优势,打造特色品牌[J]. 改革与开放,2010(4):35-36.
- [9]林建平. 长江三角洲白山羊的繁殖特性及高效繁殖措施[J]. 农业与技术,2016,36(14):12.
- [10]沈晓峰,陆宏辉. 海门山羊繁殖技术要点[J]. 山东畜牧兽医,2013,36(3):76-77.
- [11]沙文锋,朱 娟. 长江三角洲白山羊种质特性研究现状与发展对策[J]. 中国草食动物,2008,28(5):57-58.

维生素 A 是含有 β -白芷酮环的不饱和脂肪醇,是动物及人类维持正常生命活动所必需的脂溶性维生素,视黄醇、视黄醛和视黄酸是维生素 A 的 3 种衍生物,通常所说的维生素 A 即视黄醇。研究表明,视黄醇对维持上皮细胞的完整性,促进动物生长,维持正常的视觉,维持骨骼正常的生长代谢都是必不可少的。近年来,研究发现,视黄醇能提高机体免疫功能,增强机体抗感染能力^[6-7]。本试验将研究视黄醇对大肠杆菌诱发的试验性乳腺炎大鼠氧化应激的调节作用,为奶牛乳腺的健康调控提供一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 细菌

乳腺炎致病菌大肠杆菌 (*Escherichial coli*) 由南京农业大学动物医学院泌乳生化教研室提供。大肠杆菌经肉汤培养基复壮后在普通营养琼脂平板分离成单个菌落,试验前挑取单个菌落于肉汤培养基中 37 ℃ 培养 24 h,无菌取 100 μ L 均匀涂抹在琼脂糖平板上,37 ℃ 培养 24 h 后刮取菌苔,溶解于灭菌磷酸盐缓冲液 (PBS),3 000 r/min 离心 10 min,连续 3 次,用平板稀释计数法调整浓度至 2×10^{12} CFU/mL。

1.2 动物与试验设计

60 只清洁级 SD 大鼠,自怀孕 10 d 起,每天灌胃 8 000 IU/(kg·d) 视黄醇 (溶解于大豆油),对照组灌胃等体积大豆油直至分娩。产后 72 h 经乳头管注入 $2 \times$

10^{12} CFU/mL 大肠杆菌悬液每侧 100 μ L 到第 4 对乳腺 (两侧) 内,分别于灌注前 (定义为 0 h) 及灌注后 12、24、48、72 h ($n=6$) 颈静脉放血处死动物,收集血清、肝素抗凝血及乳腺组织用于后续分析。

1.3 主要试剂及仪器

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;RNA 酶抑制剂、随机引物、M-MLV、dNTPs 购自 Promega 公司;SYBR® Green PCR Master Mix 购自 Toyobo 公司;乙酸肉豆蔻佛波酯 (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、双氢罗丹明 (dihydrorhodamin, DHR 123) 购自 Sigma 公司。

UV755B 型分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;光学显微镜,日本奥林巴斯 BH2;组织匀浆器,瑞士 Kinematica AG;核酸浓度测定仪,德国 Eppendorf Biophotometer;荧光定量 PCR 仪,ABI Prism 7300;流式细胞仪,美国 BD Biosciences。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 荧光定量 PCR 检测乳腺组织细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) mRNA 表达 TRIzol 试剂盒提取乳腺组织总 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。PCR 反应条件为:95 ℃ 1 min;95 ℃ 20 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,45 个循环。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。ICAM-1 及 β -actin 基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物参数

名称	基因编号	序列
ICAM-1	NM_012967	上游:5'-GAACTGGACCTGGCAAGAG-3';下游:5'-GTACCATTTCATCTCCCGTTTG-3'
β -actin	NM031144	上游:5'-CCCTGTGCTGCTCACC GA-3';下游:5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'

1.4.2 血清与乳腺组织中 MPO 的测定 按试剂盒说明书操作。

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

1.5 数据处理

用 SPSS 17.0 方差分析程序对试验数据进行统计分析,统计结果以平均数 \pm 标准误表示。

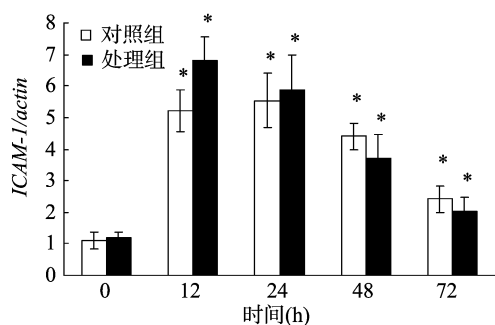
2 结果与分析

2.1 乳腺组织 ICAM-1 mRNA 相对表达的变化

诱发试验性乳腺炎后乳腺组织 ICAM-1 mRNA 相对表达各个时间点均显著升高,72 h 时表达有下降趋势,但仍显著高于 0 h。对照组 ICAM-1 相对表达峰值出现在 24 h 时,试验组 ICAM-1 相对表达峰值前提,出现在 12 h 时,且峰值较对照组高,48、72 h 时相对表达仍高于 0 h,但与同时时间点的对照组相比已有所下降 (图 1)。

2.2 血清与乳腺组织中 MPO 活性的变化

诱导乳腺炎后 12 h,对照组血清中 MPO 活性显著升高,试验组与同时时间点对照组相比 MPO 活性显著降低 (图 2 -



各组与 0 h 相比,“*”表示 $P < 0.05$; 试验组与对照组相比,“#”表示 $P < 0.05$ ($n=6$)。图 2、图 3 同

图 1 乳腺组织 ICAM-1 mRNA 表达的变化

A)。乳腺组织中 MPO 活性 12、24 h 与 0 h 差异显著,峰值出现在 24 h,至 72 h 时基本恢复至正常水平。与同时时间点比较,试验组 MPO 活性均低于对照组,且 12、24 h 差异显著 (图 2 - B)。

2.3 外周血中性粒细胞活性氧释放的动态变化

从图 3 可以看出,灌注大肠杆菌悬液后各个时间点外周血 PMN 活性氧释放与 0 h 比较均显著升高,峰值出现在 24 h。与对照组相比,视黄醇处理能显著刺激诱导后 12 h PMN 活性氧的释放,随后各个时间点试验组 ROS 释放均显著低于同时时间点的对照组。

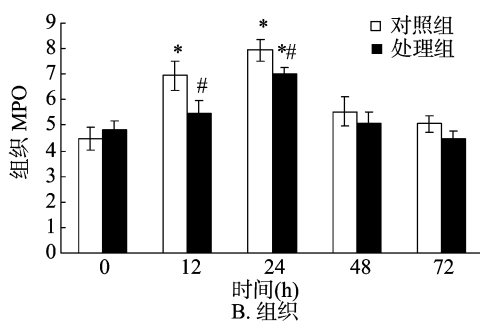
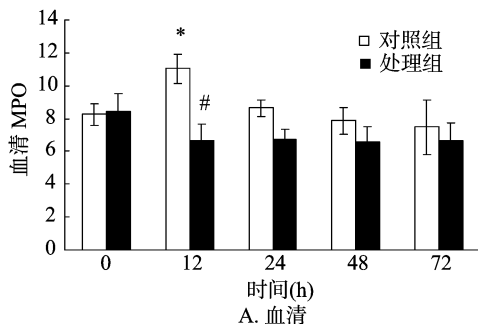


图2 大鼠血清和乳腺组织中 MPO 活性的变化

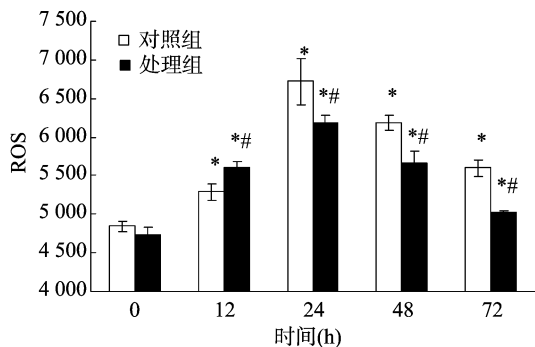


图3 外周血中性粒细胞活性氧释放的动态变化

3 讨论与结论

作为机体最大的外分泌腺,乳腺在进化、发育和泌乳再构建的过程中时刻面临着病原微生物的侵袭。病原菌入侵乳腺组织是一个复杂动态的多因子作用过程,然而目前宿主对抗乳腺感染的作用机制研究尚不深入,这是乳腺炎得不到有效控制的原因之一。

PMN 是机体抵抗感染的主要非特异性防御细胞,病原菌入侵乳腺组织后大量循环血液中的 PMN 向乳腺组织迁徙,是乳腺炎发生时的重要特征。细菌入侵后通过激活 NF- κ B/AP-1 刺激单核、巨噬细胞产生多种趋化因子促进 PMN 的趋化^[8-9]。ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族的成员,广泛表达于各种细胞表面,在细胞间的相互作用以及白细胞黏附聚集起着重要作用^[10]。本研究显示,在大肠杆菌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,但是与对照组相比,视黄醇能提前启动 ICAM-1 的高表达,促进 PMN 迅速迁徙至炎症部位发挥吞噬活性。

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。灌注大肠杆菌悬液后乳腺组织中 MPO 活性迅速上升,视黄醇处理能显著下调 MPO 活性,表明视黄醇能缓解 PMN 在乳腺组织持续过度激活引起的组织损伤。PMN 进入宿主乳腺组织,主要是通过释放 ROS 吞噬病原微生物,ROS 是宿主抵御感染的主要效应分子,但是 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^[4-5]。ROS 的结果与 MPO 活性变化规律一致,大肠杆菌灌注乳腺后各个时间点 ROS 均显著升高,视黄醇能提前刺激 PMN 释放 ROS 发挥吞噬活性,减轻 PMN 持续激活引起的组织损伤。

大量循环血液中的 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是乳腺炎发生时的重要特征。PMN 通过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。研究表明,视黄醇处理能促使机体迅速启动免疫反应,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,同时大量被激活的 PMN 能迅速从乳腺腺泡清除促进了乳腺炎症的转归。研究结果为临床上乳腺炎的免疫调控及防治提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Gu B B, Miao J F, Yanmei F, et al. Retinoic acid attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by suppressing TLR4/NF- κ B expression in rat mammary tissue [J]. International Immunopharmacology, 2010, 10(7): 799-805.
- [2] West A P, Shadel G S, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses [J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(6): 389-402.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control [J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(13): 57-65.
- [6] Ramadan A A, Ghoniem A A, Hassan H M, et al. Effects of beta-carotene, selenium and vitamin A on *in vitro* polymorphonuclear leukocytic activity in periparturient buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. Theriogenology, 2001, 55(3): 693-704.
- [7] Datta P K, Lianos E A. Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells [J]. Kidney International, 1999, 56(2): 486-493.
- [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 Y, 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]. International Immunopharmacology, 2014, 20(1): 54-58.
- [10] 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.