

丁威,汤静,周燕芬,等. 大蒜素对猪卵巢卵泡颗粒细胞凋亡的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):177-180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.047

大蒜素对猪卵巢卵泡颗粒细胞凋亡的影响

丁威¹,汤静¹,周燕芬²,邢军¹

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400; 2. 江苏省农业科学院,江苏南京 210014)

摘要:为了探究大蒜素对猪卵巢卵泡颗粒细胞类固醇激素合成功能以及 H₂O₂ 引起的颗粒细胞凋亡的影响,采用免疫组化法鉴定凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase3 在成年母猪卵巢组织中的表达情况,体外培养猪卵巢原代颗粒细胞,采用放射免疫(RIA)方法检测培养液中孕酮(P₄)和雌二醇(E₂)水平,采用 MTT 法检测大蒜素对细胞增殖活性的影响,进一步检测卵巢颗粒细胞的凋亡情况。免疫组化结果显示,Cleaved Caspase3 在猪卵巢不同发育阶段卵泡的颗粒细胞、膜细胞中有广泛表达,在卵母细胞的胞质中也有分布,在闭锁卵泡中也见明显表达。猪卵巢原代颗粒细胞经大蒜素处理后,细胞培养液中的孕酮含量显著低于 H₂O₂ 处理组,而雌激素水平显著高于 H₂O₂ 处理组,与对照组无明显差异。此外,免疫荧光结果显示,与 H₂O₂ 处理组相比,大蒜素处理组减少了颗粒细胞的凋亡,进一步证实了大蒜素对 H₂O₂ 引起的颗粒细胞凋亡具有缓解作用;进一步应用 MTT 细胞毒性和增殖试剂盒进行检测,结果显示,与 H₂O₂ 处理组相比,大蒜素处理显著提高了细胞增殖活性。结果表明,大蒜素能够作用于卵巢颗粒细胞,缓解 H₂O₂ 造成的氧化应激,本结果为畜牧生产中进一步应用大蒜素提供参考依据。

关键词:猪;卵巢颗粒细胞;大蒜素;抗氧化;细胞凋亡

中图分类号: S828.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0177-03

卵泡闭锁是卵巢卵泡发育过程中一种正常的生理现象,该现象受多种因素影响和调控,在哺乳动物的一生中,最终只有少量卵泡发育为优势卵泡并排卵,而 90% 以上的卵泡将发生闭锁^[1]。营养、环境或毒理方面的因素可能会造成卵泡的大量闭锁,从而影响动物生产。在猪卵巢卵泡闭锁过程中,颗粒细胞层逐渐脱落,未脱落的颗粒细胞比较饱满,在高倍镜下可清楚地见到凋亡的颗粒细胞核内形成的凋亡小体。虽然从形态特征上能够观测到卵泡闭锁的变化,但有关猪卵泡闭锁的机制及其挽救措施仍有待研究。

大蒜素为天然存在于百合科植物大蒜(*Allium sativum* L.)鳞茎中的一种具有抗癌活性的成分,为三硫代烯丙醚类化合物,农业上用作杀虫剂、杀菌剂^[2-4],也用于饲料生产、食品加工及药品生产等方面。相关研究表明,大蒜素作为一种具有多种功能的饲料添加剂,既可以通过改善动物机体内各组织器官功能,强化胃肠道蠕动与消化酶的代谢,增加畜禽及鱼类的采食,提高畜禽对饲料的消化利用,从而提高畜禽的生产性能^[5],又可以增强畜禽的免疫机能,从而预防多种疾病。但有关大蒜素对猪繁殖尤其是卵泡闭锁的影响研究较少。

本试验应用大蒜素对体外培养的猪卵巢颗粒细胞进行处

理,通过检测处理后颗粒细胞的凋亡情况及类固醇激素合成水平等,揭示大蒜素对猪卵巢卵泡颗粒细胞发育和功能的调控机理。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

从江苏省南京市某生猪屠宰加工厂采集健康的猪卵巢作为试验材料。将采集后的卵巢迅速放入装有含青霉素、链霉素的 37 ℃ 生理盐水的保温杯中,于 2 h 内运回实验室。从某饲养场采集梅山猪的卵巢组织,放于 4% 多聚甲醛中固定 36~48 h,用于免疫组织化学染色试验。

大蒜素购于 Sigma 公司;DMEM/F-12 细胞培养液、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、青霉素、链霉素购于 Life Technologies 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;细胞增殖试剂盒、免疫荧光试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的驴抗羊 IgG 购自上海碧云天生物技术有限公司;雌二醇和孕酮放射免疫(RIA)检测试剂盒购自北京北方生物技术研究;苏木素染料购自南京建成生物工程研究所;链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒、Caspase-3 活性检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 卵巢组织的免疫组织化学染色 参照丁威等的方法^[6]对卵巢组织的免疫组织进行化学染色。脱蜡止水:二甲苯 I 7 min→二甲苯 II 7 min→100% 乙醇 I 5 min→100% 乙醇 II 5 min→90% 乙醇 5 min→70% 乙醇 2 min→蒸馏水 5 min;灭活内源酶:用 3% 甲醇-H₂O₂ 处理 15 min→蒸馏水 5 min;抗原热修复:柠檬酸三钠(pH 值=6.0)100 ℃ 10 min

收稿日期:2018-09-27

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20171310);江苏农林职业技术学院基金(编号:2016kj001);江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目[编号:苏教师(2017)15号];第十五批“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(编号:NY-006);江苏省“333”高层次人才培养工程。

作者简介:丁威(1979—),男,黑龙江巴彦人,博士,副教授,主要从事猪的卵巢卵泡发育调控机制研究。E-mail: qishi6598@126.com。

→PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;加一抗:10% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin,简称 BSA) 室温封闭 30 min→一抗加入后,须要在室温条件下过夜,阴性对照可用 1% BSA 代替 (cleaved-Caspase3 抗体稀释浓度为 1:200) PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;SABC (strept avidin-biotin complex) 反应:二抗加入后,须要在室温条件下 30 min→PBS 洗涤 3 次,每次 3 min→加 SABC,室温 15 min→PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;显色:0.05% DAB + 0.01% H_2O_2 ,显色 2~10 min→水冲洗 5 min→苏木素复染→水冲洗 5 min;脱水透明:50% 乙醇 2 min→70% 乙醇 2 min→90% 乙醇 2 min→100% 乙醇 I 2 min→100% 乙醇 II 2 min→二甲苯 I 4 min→二甲苯 II 4 min;封片,用光学显微镜观察并拍照,切片中棕褐色代表阳性表达。

1.2.2 细胞培养和处理 参照宋丹等的方法^[7]对细胞进行培养和处理。在实验室中将来自屠宰场采集来的卵巢用 37 °C 生理盐水清洗 3 次,然后用 10 mL 注射器从卵巢表面选择直径为 3~5 mm 的卵泡抽取卵泡液,放入离心管静置 10~15 min,1 500 r/min 离心 2 min,PBS 洗 3 次后,用血细胞计数板进行计数。将颗粒细胞放入含 10% 胎牛血清、20 ng/mL 促卵泡素 (FSH)、100 mg/L 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的基础培养液 6 孔细胞培养板中,于 5% CO_2 和 37 °C 的培养箱中培养 24 h,然后将颗粒细胞分成 4 组,第 1 组继续用基础培养液培养作为对照,第 2 组为添加 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理、第 3 组为添加大蒜素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理、第 4 组为添加大蒜素 (50 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理,其中大蒜素固体溶解于 PBS 并添加到培养液中,终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。培养 24 h 后,收集培养液用于类固醇激素水平测定。

1.2.3 类固醇激素测定 采用酶联免疫法测定颗粒细胞培养液中的雌二醇 (E_2) 和孕酮 (P_4) 含量。 E_2 和 P_4 的灵敏度分别为 <5 pg/mL 和 <0.2 ng/mL,批内变异系数小于 10%,批间变异系数小于 15%。

1.2.4 DAPI 凋亡检测 用 6 孔板接种传代猪颗粒细胞以制作细胞爬片并进行相应处理。细胞在盖玻片上生长融合到 90% 左右时从孵箱中取出,用预温 37 °C PBS 洗 3 次,每次 10 min,4% 甲醛室温固定 30 min,PBS 洗 3 次,每次 10 min,然后用 0.2% Triton X-100 透化 30 min,加 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 孵育 10 min,PBS 清洗 3 次,每次 10 min,最后在激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 细胞增殖活性检测 从对照、 H_2O_2 、大蒜素、大蒜素 + H_2O_2 等 4 组处理中分别取 100 μL 约 2 000 个颗粒细胞放入 96 孔板中,依据 MTT 试剂盒说明书,每孔加入 10 μL MTT 溶液,在培养箱内孵育 4 h,然后每孔再加入 100 μL Formazan 溶解液继续孵育 4 h,直到在普通光学显微镜下能够观测到 Formazan 全部溶解,然后早 570 nm 处的测定溶液吸光值。

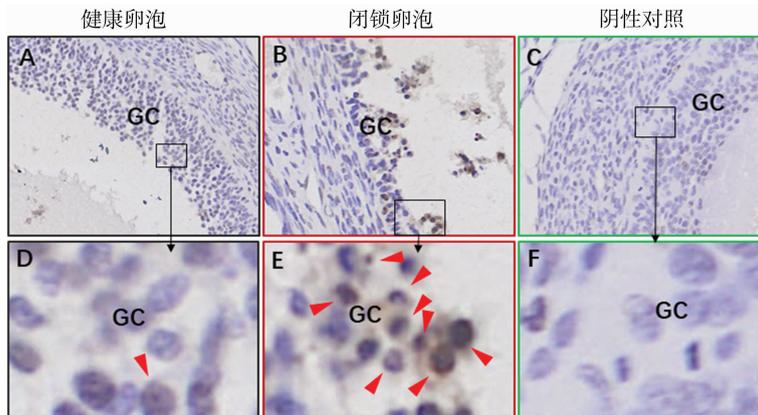
1.3 数据分析

用 Excel 2010 对原始数据进行整理,然后用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,差异显著性比较采用 Turkey 检验法,所有数据均用 (平均值 \pm 标准差) 表示,至少重复 4 次。

2 结果与分析

2.1 Cleaved Caspase3 蛋白在猪卵巢卵泡中表达的定位

魏全伟研究表明,Caspase3 在由颗粒细胞凋亡引起卵泡闭锁的过程中的表达存在显著升高现象。为了进一步研究 Caspase3 的激活 (Cleaved Caspase3) 在猪卵巢卵泡壁退化过程的作用,选取正在闭锁的卵泡 (即颗粒细胞正在凋亡和脱落的卵泡) 进行研究。免疫组织化学染色结果表明,随着卵泡的闭锁,颗粒细胞凋亡并脱落在卵泡腔内,颗粒细胞凋亡伴随着染色质的浓缩。颗粒细胞的凋亡伴随着 Caspase3 的激活 (图 1-B、图 1-E),而在健康的卵泡中几乎不存在 Caspase3 的激活 (图 1-A、图 1-D)。



A、D—健康卵泡; B、E—闭锁卵泡; C、F—阴性对照; GC—颗粒细胞

图1 Cleaved Caspase3 蛋白在猪卵巢卵泡中的定位特征

2.2 颗粒细胞培养液中 E_2 和 P_4 激素水平变化

由图 2 可知,氧化应激组 (过氧化氢处理) 中的 E_2 浓度显著低于对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ 大蒜素处理组及 50 $\mu\text{mol/L}$ 大蒜素和过氧化氢共同处理组 ($P < 0.05$); 而氧化应激组 P_4 浓度显著高于对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ 大蒜素处理组及 50 $\mu\text{mol/L}$ 大蒜素和过氧化氢共同处理组 ($P < 0.05$)。表明大蒜素可以提高颗粒细胞在氧化应激状态下雌二醇分泌能力,并抑制颗粒细

胞黄体化。雌激素和孕激素可以作为检测细胞状态的指标,结果表明,大蒜素处理下细胞状态相对更好。

2.3 猪卵巢颗粒细胞的凋亡情况

颗粒细胞培养 24 h 后,将制作好的细胞爬片进行 DAPI 染色,用激光共聚焦显微镜细胞凋亡情况。结果 (图 3) 表明,与对照组相比,氧化应激组大量细胞发生形态学变化,而大蒜素处理组有效缓解了上述变化。细胞凋亡的典型特征包括细

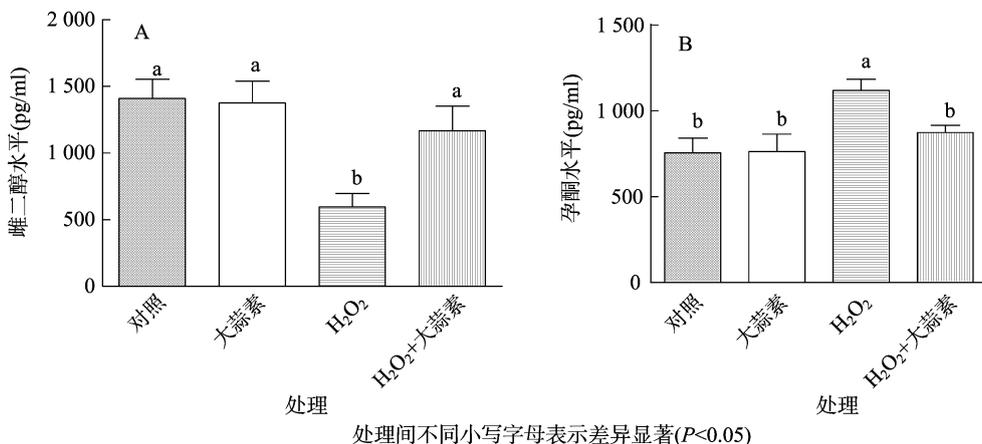


图2 大蒜素处理后颗粒细胞培养液中 E₂(A)和 P₄(B)的水平变化

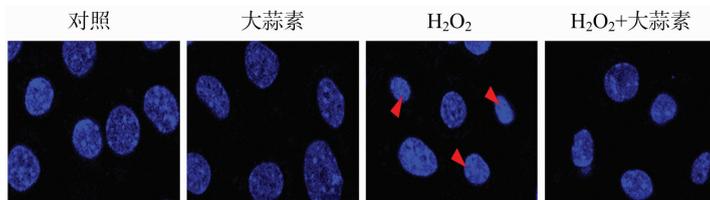


图3 大蒜素对猪卵巢颗粒细胞凋亡的影响

胞皱缩、染色质固缩、染色质新月体形成、DNA 片段化和凋亡小体形成等。

2.4 猪原代颗粒细胞的增殖情况

由图4可知,与对照组相比,氧化应激组颗粒细胞增殖活性显著降低,而添加大蒜素与 H₂O₂ 协同处理以后能够显著增加细胞增殖活性。该结果与凋亡检测结果相一致。

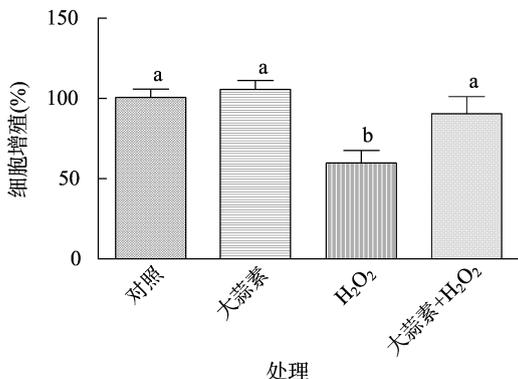


图4 大蒜素对卵巢颗粒细胞增殖活性的影响

3 讨论

目前普遍的学术观点认为,卵泡闭锁主要是由卵巢卵泡颗粒细胞凋亡引起的^[8]。因此,颗粒细胞凋亡的潜在机制可能是研究卵泡闭锁的重要突破点和关键点。目前有关大蒜素抑菌作用的研究较多,相关研究认为,大蒜素可激活单核细胞的分泌水平,促使溶菌酶大量释放,溶菌酶能水解细菌细胞壁中的粘多糖,使致病细菌细胞破裂死亡,进而增强机体的非特异性免疫功能^[9]。然而,有关大蒜素在颗粒细胞凋亡方面的研究较少。

免疫组织化学染色试验结果表明,卵泡闭锁过程中颗粒细胞的凋亡激活了 Caspase3;而前期研究认为,Caspase3 能够

进一步解离 PARP-1,而 PARP-1 的解离参与卵泡闭锁过程^[10]。本研究发现,大蒜素能够作用于卵巢颗粒细胞,并缓解 H₂O₂ 造成的颗粒细胞凋亡。

在卵泡发育过程中,颗粒细胞不断增殖使得卵泡不断生长,并最终排卵^[11-13]。颗粒细胞是卵巢中合成和分泌雌激素、孕酮等激素的主要功能细胞。多种哺乳动物的卵巢生长和卵泡发育均与卵巢的雌激素、孕激素分泌水平相关^[14-16]。本研究发现,大蒜素可以改善氧化应激状态下卵巢颗粒细胞的内分泌功能,表明大蒜素可用于猪生产,以提高猪抗应激水平和调节卵巢发育。

本研究结果还表明,氧化应激状态下,颗粒细胞的增殖受到抑制,而大蒜素能够在一定程度上提高颗粒细胞的增殖活性。该结果进一步说明大蒜素对颗粒细胞内分泌功能具有改善作用,为猪繁殖的营养调控提供参考。此外,应用体外猪卵巢颗粒细胞氧化应激模型,本研究结果进一步说明大蒜素在抑制颗粒细胞凋亡过程中可能发挥着某种重要的作用,可为大蒜素在猪育种及生产过程提供有价值的参考依据。而相关作用机制仍有待进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] 魏全伟. 多聚 ADP-核糖聚合酶-1 (PARP-1) 及其相关信号通路参与猪卵泡发育及闭锁的机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [2] 熊延靖,董群. 大蒜素对外白色念珠菌生物活性影响的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015(11):1233-1238.
- [3] 张永奎,李建民,王东隶,等. 大蒜素对体外人骨肉瘤细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 肿瘤,2013(3):214-222.
- [4] 李文利,钮自宇,张鸣鸣,等. 大蒜素对幽门螺杆菌阴性的慢性萎缩性胃炎患者血清表皮生长因子和胃黏膜病理、表皮生长因子受体的影响[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2014(6):796-799.

颜卫,赵莎莎,卢劲晔,等. 2016—2017年江苏地区弯曲菌流行现状监测[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):180-182.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.048

2016—2017年江苏地区弯曲菌流行现状监测

颜卫,赵莎莎,卢劲晔,羊建平,沈晓鹏,蒋珊珊
(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:弯曲菌是全球范围内主要的人兽共患病原菌,也是细菌性肠道病原菌之一,对人致病的主要是空肠弯曲菌,其次是结肠弯曲菌。家禽是弯曲菌病最重要的传染源,感染动物肠道内的大量细菌可通过排泄物污染食物引起人类感染。近年来,弯曲菌病的发生呈增长趋势。较为系统地调查和分析了2016—2017年江苏部分地区人群、动物、食品中弯曲菌的流行特点,为进一步防控弯曲菌病提供了理论基础。

关键词:弯曲菌;流行现状;污染;江苏

中图分类号: S851.31⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0180-03

弯曲菌是一种重要的人兽共患病原菌,不仅可以引起动物腹泻、牛羊流产、雏鸡坏死性肝炎,它也是全球范围内引起人胃肠道感染最常见的病原菌,可引起人类发热、急性肠炎、格林巴利综合征等,儿童、老人和免疫缺陷症病人是弯曲菌感染的高危人群,严重时可引起死亡。该菌广泛分布于自然界,是许多畜禽的寄生菌,可通过动物、食物、水等传播并引起人类感染,肉类、蔬菜、水等均存在不同程度的弯曲菌污染,对该菌的流行现状监测对于食品安全、公共卫生有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 培养基与试剂

布氏肉汤, Carry - Blair 运送培养基, 购自北京陆桥技术有限责任公司; CCDA 购自 OXOID 公司, Buffer, dNTPs, Taq 酶、低分子量 DNA marker, 购自大连宝生物工程公司; 微氧产气袋购自 MGC 公司; 绵羊全血购自兰州民海生物工程有限公

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 泰州市科技支撑计划(社会发展)项目(编号: TS201617)。作者简介: 颜卫(1983—), 女, 江苏泰州人, 硕士, 讲师, 主要从事病原微生物方向研究。Tel: (0523) 88219281; E-mail: 1049213600@qq.com。

司。抗生素混合液: 多黏菌素 B、甲氧苄氨嘧啶、利福平各 0.125 g, 放线菌酮 1.250 g, 加入 25 mL 丙酮蒸馏水混合液(1:1 比例混合)溶解过滤后备用。弯曲菌生长促进剂: 硫酸亚铁、焦亚硫酸钠、丙酮酸各称取 1.563 g, 加入 25 mL 蒸馏水充分溶解, 过滤备用。布氏肉汤高压灭菌, 冷却后分别加入抗生素混合液和弯曲菌生长促进剂摇匀备用(200 mL 中加入 1 mL)。CCDA 配制完高压灭菌后, 冷却至 50~60℃ 加入头孢哌酮(32 mg/L)和两性霉素 B(10 mg/L)。

1.2 样品来源

2016年6月至2017年5月陆续采集医院腹泻病人(包括门诊部和住院部)粪便样本、农贸市场和超市食品样本、环境样本、动物源肛拭样本(包括规模化圈养鸡、散养鸡、市场鸡、养殖场鸭群、养殖场鹅群)共868份进行弯曲菌的检测。

1.3 弯曲菌的分离

肛拭样品、腹泻患者送检的粪便样品插入 Carry - Blair 运送培养基中于 12 h 内送实验室检测。食品、环境样品采集后置于 4℃ 冰盒送实验室立即检测。取肉类、蔬菜样品 1 g 剪碎, 污水样品 1 mL, Carry - Blair 培养基中取出的棉拭加入 9 mL 布氏肉汤(含抗生素和生长促进剂), 厌氧培养罐(加入微需氧产气袋后立即密封)42℃ 摇床培养 24 h, 菌液接种

[5] 薛玉华. “大蒜素”在养殖业上的应用[J]. 农村养殖技术, 2006(24): 35.

[6] 丁威, 邢军, 魏全伟, 等. 二花脸猪卵巢卵泡形成和早期发育过程中雌二醇和孕酮含量变化及其受体定位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 383-389.

[7] 宋丹, 吴国云, 丁威, 等. 甲状腺素对猪卵巢卵泡颗粒细胞类固醇激素合成及增殖的影响[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(2): 357-363.

[8] 吕落彬. 母猪卵泡闭锁和凋亡的调节[J]. 黑龙江动物繁殖, 2015(3): 15-16.

[9] 王焯. 大蒜素在养殖业中的应用[J]. 新农业, 2011, 17(9): 30-31.

[10] 魏全伟, 石放雄. 聚(ADP-核糖)聚合酶-1(PARP-1)的解离参与猪卵泡闭锁过程[C]//中国畜牧兽医学学会2013年学术年会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学学会, 2013: 195.

[11] 林飞. 猪卵泡闭锁的特征与 miRNA 调控研究[D]. 南京: 南

京农业大学, 2011.

[12] 张羽, 林鹏飞, 郝元斌, 等. 猪卵泡闭锁过程中颗粒细胞凋亡和 Fas/FasL 变化[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(3): 536-540.

[13] 刘忠华, 梁铁群, 岳奎忠, 等. 猪卵泡闭锁过程中颗粒细胞凋亡现象的检测[J]. 解剖学报, 2002(4): 374-379.

[14] Couse J F, Korach K S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? [J]. Endocrine Reviews, 1999, 20(3): 358-417.

[15] Hunter R F. Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

[16] Yang M Y, Fortune J E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes[J]. Biology of Reproduction, 2008, 78(6): 1153-1161.