

卢劲晔,顾蓓蓓,马 卉,等. 视黄醇对大肠杆菌诱导的大鼠乳腺上皮细胞 NF- κ B 信号通路的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(6):35-38. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.008

视黄醇对大肠杆菌诱导的大鼠乳腺上皮细胞 NF- κ B 信号通路的抑制作用

卢劲晔¹, 顾蓓蓓^{1,2}, 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:为探讨视黄醇对大肠杆菌诱发的大鼠乳腺上皮细胞炎症反应的影响,原代培养大鼠乳腺上皮细胞,试验组预先经视黄醇处理 24 h 后,对照组和试验组分别经大肠杆菌处理 30 min 和 60 min,收集细胞和上清液。结果显示,大肠杆菌诱发能显著提高 TLR4 和 NF- κ B 表达,进而促进促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放以及炎性介质 iNOS (诱导型-氧化氮合酶)的表达。视黄醇处理能抑制 NF- κ B 表达,进而降低炎性细胞因子和炎性介质的释放和表达,从而达到保护乳腺上皮细胞的作用。

关键词:视黄醇;乳腺上皮细胞;大鼠;NF- κ B 信号通路

中图分类号: S858.237.2⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)06-0035-04

乳腺炎在各种乳用家畜甚至是人类普遍存在,奶牛乳腺炎更是频繁发生,全世界约有 1/3 的奶牛患有各种类型的乳腺炎,是制约奶牛产业发展的主要疾病之一^[1]。目前,临床上分离的乳腺炎致病菌超过 137 种,大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是临床上环境性乳腺炎的代表病原^[2],存在于奶牛生活的环境中,如附着在体表尤其是乳头表面、垫料、厩槽、粪便等处,当乳头管开放时(挤奶后或乳头

受损等)进入乳腺繁殖、扩增。奶牛感染大肠杆菌后常引起急性乳腺炎,并伴随局部和全身症状。从理论上讲加强饲养管理,搞好泌乳期和产前的环境卫生,做好挤奶前后的消毒,可以降低环境性乳腺炎的发病率。但是实践证明,环境控制并没有明显降低大肠杆菌乳腺炎的发病率。有报道显示,在管理良好的奶牛场,高体细胞数(SCC)的乳汁中经常能分离到大肠杆菌^[3-4]。近年来大肠杆菌乳腺炎发病率有升高的趋势,特别是在一些饲养管理水平较高的发达国家,接触性乳腺炎有所控制,而大肠杆菌乳腺炎在临床型乳腺炎中的发病率有所增加。

病原菌入侵宿主是一个复杂的、动态的多因子作用过程,从病原与宿主互作的角度深入研究病原感染后宿主抵御病原感染的机制是控制疾病的关键所在^[5]。先天性免疫系统是

收稿日期:2017-11-02

基金项目:江苏省自然科学基金面上研究项目(编号:BK20151354);

江苏农牧科技职业学院科研课题(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,主要从事乳腺炎的营养免疫调节机制研究。E-mail:leopardleo@163.com。

evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology,2012,160(2):884-896.

[9] Li P H, Ma S S, Bohnert H J. Coexpression characteristics of trehalose-6-phosphate phosphatase subfamily genes reveal different functions in a network context[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(3): 544-556.

[10] Pramanik M R, Imai R. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(6): 751-762.

[11] Nuccio M L, Wu J, Mowers R, et al. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(8): 862.

[12] Kretschmar T, Pelayo M A, Trijatmiko K R, et al. A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice[J]. Nature Plants, 2015, 1(9): 15124.

[13] Vogel G, Aeschbacher R A, Muller J, et al. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by

functional complementation of the yeast tps2 mutant[J]. Plant Journal, 1998, 13(5): 673-683.

[14] 丁泽红, 付莉莉, 铁韦韦, 等. 木薯 *MeNCED3* 基因克隆、结构变异及其表达分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 148-153.

[15] Fu L L, Ding Z H, Han B Y, et al. Physiological investigation and transcriptome analysis of polyethylene glycol (PEG)-induced dehydration stress in cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 283.

[16] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(25): 15898-15903.

[17] Krasensky J, Broyart C, Rabanal F A. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase AtTPPD regulates salt stress tolerance[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 21(9): 1289-1304.

[18] Shinozaki K, Yamaguchi - Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 221-227.

机体识别和清除入侵病原体的第一道防线,具有作用广泛、启动迅速的特点,在保护机体、抵抗感染的过程中具有极其重要的作用。先天性免疫系统依赖模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原体的病原相关分子模式,进而招募相应的接头蛋白,激活信号级联反应,促进炎症细胞因子、趋化因子的分泌和表达,从而杀伤和清除病原微生物。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是目前在感染性疾病发病机制中研究最为广泛的一组 PRRs,在多种细胞中广泛表达。TLR 定位于细胞的膜结构上广泛识别多种 PAMPs,通过招募接头蛋白 MyD88(myeloid differentiation factor-88)和 TRIF(TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β),激活 NF-κB(nuclear factor-κB)和 IRFs(interferon regulatory factors)信号通路^[6-8]。已有研究证明大鼠乳腺上皮细胞能表达 TLR2、TLR4 和 TLR9,在乳腺上皮细胞抵御致病均感染中发挥重要的作用^[9-11]。

研究表明,饲料中来源丰富的视黄醇具有维持上皮细胞的完整性、促进动物生长、维持正常的视觉等功能。近年来,研究还发现,视黄醇能提高多种免疫细胞的功能,增强机体抗感染能力。本实验室的前期研究已表明视黄醇对 LPS 诱发的试验性乳腺炎大鼠具有一定的保护作用^[10],且视黄醇处理能下调 TNF-α、IL-1β、iNOS 等多种炎症介质的表达^[12]。本试验将进一步深入探讨视黄醇抑制炎症介质表达的作用机制,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 大鼠乳腺上皮细胞的培养与处理

大鼠乳腺上皮细胞分离培养方法参考文献[10]并加以改进。选择妊娠 15~18 d 的大鼠,无菌采集乳腺组织,胶原酶与透明质酸酶联合消化分离乳腺上皮细胞,多次瞬时离心(1 000 r/min 离心 1 min;重复 10 次)收集细胞,调整密度至 5×10⁵ 个/mL,接种于培养瓶中,37℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞铺满培养瓶底 90% 以上,更换培养液为无血清培养液,同时加入药物处理。试验组加入终浓度为 1 μmol/L 的视黄醇(DMSO 溶解),对照组更换含相等浓度 DMSO 的基础培养液处理 24 h 后,大肠杆菌(multiplicity of infection, MOI=10)处理细胞,分不同时间点用细胞刮刀刮取细胞,置于液氮后转移至-70℃冰箱保存。

1.2 主要试剂

乳腺炎致病菌大肠杆菌(NJ0501)由南京农业大学动物医学院泌乳生化教研室提供。PVDF 膜购自 Millipore 公司;兔抗鼠 TLR-4、NF-κB p65 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自 Bioworld 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、兔抗小鼠 IgG 购自武汉博士德公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自 Pierce 公司。TNF-α、IL-1β 检测试剂盒购自购于解放军总医院科技开发中心放免所。

1.3 乳腺细胞核蛋白与总蛋白的提取

参照试剂盒说明分别提取大鼠乳腺上皮细胞核蛋白与总蛋白用于 EMSA 及 Western blot 分析,蛋白样品浓度采用 BCA 法测定,分装后保存于-70℃。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 Western blot 检测乳腺上皮细胞中 TLR4、MyD88 含量

30 μg 乳腺上皮细胞总蛋白提取物经 10% SDS-PAGE 电泳,半干转印仪转印到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,分别在兔抗 TLR-4 抗体、兔抗 NF-κB p65 抗体(1:500 稀释)中 4℃ 孵育过夜;TBST 充分洗涤,在辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:6 000 稀释)中室温孵育 1 h, TBST 充分洗涤后加入化学发光液,暗室曝光、显影、定影。以 GAPDH 为内参照,用同样方法加小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:5 000 稀释)和辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG(1:6 000 稀释)对同一 PVDF 进行检测。凝胶图像分析系统对条带进行光密度测定,以目的蛋白和 GAPDH 条带的光密度比值代表其表达的相对水平。

1.4.2 细胞培养上清液中 TNF-α、IL-1β 含量测定 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.4.3 RT-PCR 检测乳腺上皮细胞中 iNOS 表达 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。用所有待测反转录产物的混合样(每份待测样品等体积混合)对反应条件进行优化。反应条件为:95℃ 1 min;95℃ 20 s、62℃ 30 s、72℃ 20 s,重复 45 个循环。以 β-actin 为内标基因,用实时荧光定量 PCR 进行相对定量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物参数

名称	序列号	方向	引物序列(5'→3')
iNOS	D14051	Forward	CTCGCTGCATCGGCAGGAT
		Reverse	AGTCATGCTTCCCATCGCTCC
β-actin	NM031144	Forward	CCCTGTGCTGCTCACCGA
		Reverse	ACAGTGTGGGTGACCCCGTC

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±标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 乳腺上皮细胞 TLR4、MyD88 含量的变化

由图 1 可知,大鼠乳腺上皮细胞表面有 TLR-4 存在,大肠杆菌处理后 30、60 min 大鼠乳腺上皮细胞 TLR-4 表达极显著升高;与对照组相比,视黄醇处理能显著降低大肠杆菌处理 60 min 后大鼠乳腺上皮细胞 TLR-4 水平。

2.2 乳腺上皮细胞 TNF-α、IL-1β 分泌的变化

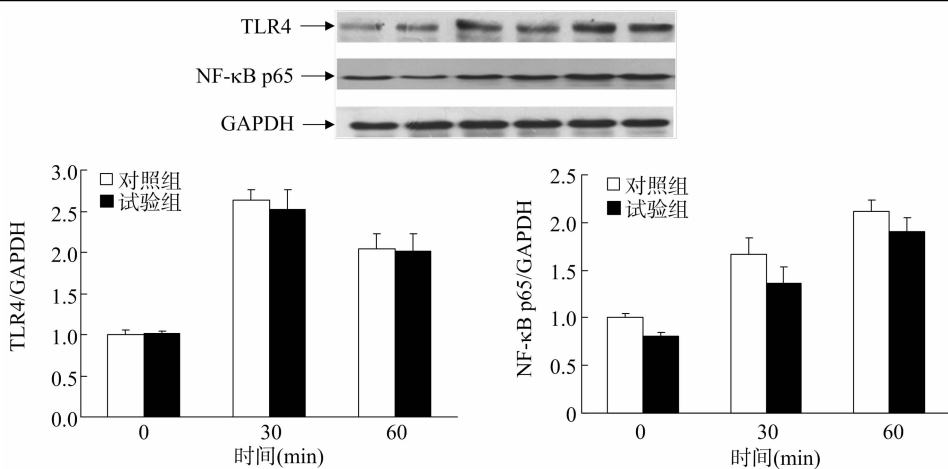
由图 2 可知,正常情况下,大鼠乳腺上皮细胞释放的 TNF-α、IL-1β 较低,大肠杆菌刺激后大鼠乳腺上皮细胞 TNF-α、IL-1β 释放量显著升高(P<0.05),视黄醇处理能显著降低大肠杆菌处理 60 min 后大鼠乳腺上皮细胞 TNF-α、IL-1β 释放量。

2.3 乳腺上皮细胞 iNOS 表达的变化

由图 3 可知,大鼠乳腺上皮细胞经大肠杆菌刺激后 iNOS mRNA 表达显著升高(P<0.05),视黄醇处理能显著降低大肠杆菌处理 30 min 和 60 min 后大鼠乳腺上皮细胞 NOS mRNA 表达。

3 讨论

乳是乳腺的分泌产物,乳汁对新生哺乳动物的重要性毋庸置疑,乳腺的健康是其发挥生物学效应的基本保障。但是



*表示试验组与对照组相比, 差异显著($P < 0.05$), $n = 3$ 。下图同
图1 大鼠乳腺上皮细胞 TLR-4、NF-κB p65蛋白水平的变化

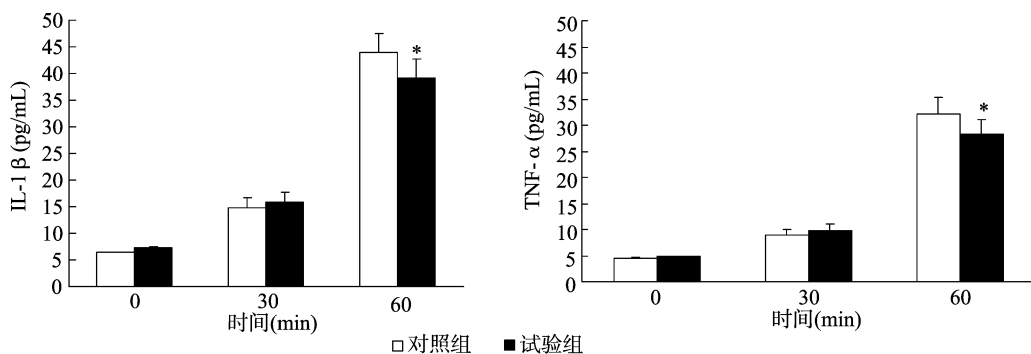


图2 大鼠乳腺上皮细胞 TNF-α、IL-1β 释放量的变化

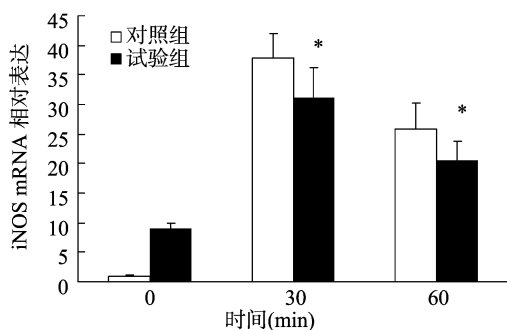


图3 大鼠乳腺上皮细胞 iNOS mRNA 的变化

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,乳腺感染频繁发生,尤其在奶牛产业,据报道全世界约有 2/3 的奶牛罹患各种类型的乳腺炎。病原菌入侵乳腺组织是一个复杂的、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。

TLRs 是一组保守的介导机体天然免疫反应的跨膜受体蛋白,广泛分布于髓源细胞、内皮细胞、脂肪细胞、成纤维细胞及上皮细胞等 20 多种细胞中^[13-14]。TLRs 通过识别病原微生物、偶联信号传导途径,激活天然免疫细胞,最终启动一系列的免疫炎症反应,是天然免疫系统中最为重要的模式识别受体^[15-17]。TLR-4 是革兰氏阴性菌及其内毒素发挥生物学效用的特异性受体^[18],TLR-4 的表达可以作为革兰氏阴性菌引起的乳腺炎的生物标记分子。本研究证实原代培养的大

鼠乳腺上皮细胞表面有 TLR-4 的存在,并且正常情况下该受体表达量较低,而大肠杆菌侵染能显著刺激 TLR-4 的表达,视黄醇对 TLR-4 的表达影响不显著。

病原微生物刺激后,位于细胞膜表面的 TLR 通过胞外区富含亮氨酸的重复序列将刺激信号传入胞内,活化胞核内的 NF-κB^[19],并促进相关炎性细胞因子释放到胞外。在本试验中,大肠杆菌处理大鼠乳腺上皮细胞后,NF-κBp65 表达活性显著升高,视黄醇预处理能极显著降低 NF-κB p65 表达,与先前研究结果一致,表明视黄醇能显著提高核内视黄醇受体-α (retinoid receptor-α, RAR-α) 的表达,而 RAR-α 可以与 NF-κB 上的结合位点相结合,从而降低 NF-κB 的生物学活性^[20]。

大肠杆菌或其致病因子通过 TLR-4/NF-κB 信号途径合成并释放细胞因子,任何 NF-κB 的抑制剂均能抑制其诱导的炎症相关基因的转录。TNF-α、IL-1β 是 LPS (脂多糖) 通过 TLR-4 跨膜激活核转录因子后产生的重要炎性因子,LPS 处理后引起各个时间点 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 表达极显著升高,视黄醇处理能显著抑制上述基因的过度表达。iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 是 NO 合成的限速酶,NO 是体内重要的信号分子,具有多种生物学功能,一方面 NO 具有直接的杀菌作用,另一方面 NO 能加快血液循环,促使更多的 PMN (中性粒细胞) 向组织迁徙发挥吞噬活性^[21-22]。但 iNOS 持续活化产生过量 NO 是引起组织损伤的一个重要因素。在本研究中,LPS 极显著刺激各个时间点 iNOS mRNA 的过度表达,视黄醇显著下调炎症反应后期该基因的表达。与先前报

道一致,视黄醇能通过下调转录因子 NF- κ B p65 和 p50 亚基的活性从而降低 iNOS 的并表达^[23-24]。

4 小结

研究表明大肠杆菌通过 TLR-4/NF- κ B 信号途径促进原代大鼠乳腺上皮细胞炎性相关因子的表达,视黄醇能抑制 NF- κ B 活性,抑制相关炎性因子的过度表达,这可能是视黄醇保护乳腺对抗感染的原因之一。

参考文献:

- [1] Shlomo E B, Elimelech D H, Gabriel L. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis[J]. Veterinary Journal, 2014 (201): 72-77.
- [2] Gu B, Miao J, Fa Y, 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.
- [3] Liu Y X, Liu G, Liu W J, et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis[J]. Research in Microbiology, 2014, 165(4): 273-277.
- [4] Dogan B, Rishniw M, Bruant G, et al. Phylogroup and lpfA influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli* [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(1/2): 163-170.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Wieland C, Van L, Hogendijk A J, et al. TLR4 on hematopoietic cells is crucial for host defense against *Klebsiella pneumonia* but TLR2 is needed when bacterial numbers are high[J]. Critical Care, 2009, 13(Suppl4): P23.
- [8] Droemann D, Hansen F, Aries S P, et al. Neutrophil apoptosis, activation and anti-inflammatory cytokine response in granulocyte colony-stimulating factor-treated patients with community-acquired pneumonia[J]. Respiration, 2006, 73(3): 340-346.
- [9] Zheng L H, Xu Y Y, Lu J Y, et al. Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and the regulating effect of taurine on these bioprocesses[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 96: 166-180.
- [10] Gu B, Miao J, Fa Y, 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.
- [11] Zhu Y M, Mao J F, Zhang Y S, et al. CpG-ODN enhances mammary gland defense during mastitis induced by *Escherichia coli* infection in goats [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 120(3/4): 168-176.
- [12] 顾蓓蓓, 苗晋锋, 卢劲晔, 等. 视黄醇对 LPS 诱发的原代培养大鼠乳腺上皮细胞炎症反应的调节[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(4): 627-633.
- [13] Tapping R I. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors [J]. Seminars in Immunology, 2009, 21(4): 175-184.
- [14] Negishi H, Yanai H, Nakajima A, et al. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses [J]. Nature Immunology, 2012, 13(7): 659.
- [15] Park B S, Song D H, Kim H M, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex[J]. Nature, 2009, 458: 1191-1195.
- [16] Omuetti K O, Mazur D J, Thompson K S, et al. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components[J]. Journal of Immunology, 2007, 178(10): 6387-6394.
- [17] Chen K, Huang J, Gong W, et al. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer [J]. International Immunopharmacology, 2007, 7(10): 1271-1285.
- [18] de Schepper S, de Ketelaere A, Bannerman D D, et al. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle [J]. Veterinary Research, 2008, 39(1): 1-23.
- [19] Doyle S L, O'Neill L A. Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity [J]. Biochemical Pharmacology, 2006, 72: 1102-1113.
- [20] Rockel J S, Kudrirk J C, Guzi A J, et al. Regulation of Sox9 activity by crosstalk with nuclear factor- κ B and retinoid receptors [J]. Arthritis Research and Therapy, 2008, 10: 1-12.
- [21] Li W, Yang F, Liu Y, et al. Negative feedback regulation of IL-32 production by iNOS activation in response to dsRNA or influenza virus infection [J]. European Journal of Immunology, 2009, 39: 1019-1024.
- [22] Bouchard L, Blais S, Desrosiers C, et al. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 2574-2581.
- [23] Datta P K, Reddy R S, Lianos E A. Effects of all-trans-retinoic acid (atRA) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and transforming growth factor beta-1 production in experimental anti-GBM antibody mediated glomerulonephritis [J]. Inflammation, 2001, 25(6): 351-359.
- [24] Datta P K, Lianos E A. Retinoids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells [J]. Kidney International, 1999, 56: 486-493.