

张俊波,印双红,易 萌,等. MyD88 在绵羊肺炎支原体感染过程中的作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(9):197-201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.045

MyD88 在绵羊肺炎支原体感染过程中的作用

张俊波¹, 印双红², 易 萌³, 陆安法⁴

(1. 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; 2. 铜仁学院大健康学院, 贵州铜仁 554300;
3. 铜仁学院大数据学院, 贵州铜仁 554300; 4. 贵州省铜仁市动物疫病控制中心, 贵州铜仁 554300)

摘要:为分析 MyD88 在绵羊肺炎支原体(MO)感染肺泡上皮细胞中的分子机制。用不同浓度的抑制剂 ST2825 与细胞孵育 24 h, 用 MTT 法检测细胞活性; MO 感染细胞后, 于 4、8、12、24 h 收集细胞, 利用实时定量 PCR 检测 MyD88 mRNA 的表达水平。采用不同浓度的 MyD88 抑制剂 ST2825 与细胞孵育 1 h, 然后用 MO 感染细胞, 于 24 h 收集细胞, 利用实时定量 PCR 检测白细胞介素-8(IL-8)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的表达水平, 用试剂盒检测 caspase-3 活性、caspase-8 活性、H₂O₂ 浓度、NO 浓度和 LDH 浓度变化。结果显示, MO 于 4、8、12、24 h 显著提高细胞 MyD88 mRNA 表达水平; MO 显著提高细胞 IL-8 mRNA 水平、TNF- α mRNA 水平、caspase-3 活性、caspase-8 活性、H₂O₂ 浓度、NO 浓度和 LDH 浓度($P < 0.01$), 而 ST2825(浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$)能够显著降低 MO 介导的以上指标($P < 0.05$), 表明 MyD88 在 MO 感染肺泡上皮细胞过程中发挥重要作用。

关键词:绵羊肺炎支原体; MyD88; 致病机制

中图分类号:S858.26 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)09-0197-04

山羊传染性胸膜肺炎是山羊的一种急性或慢性呼吸道传染病, 主要症状为纤维素性胸膜肺炎, 此病可感染各种年龄的公母羊群, 有很高的发病率和死亡率, 被世界动物卫生组织列入通报疫病名录, 我国将此病列为二类传染病^[1-4]。此病的临床特征为: 高热、卡他性鼻液、眼结膜炎、纤维素性胸膜炎、母羊流产、消瘦等等。该病在世界范围内普遍流行, 严重危害养羊业发展, 给养羊业带来巨大的经济损失。山羊传染性胸膜肺炎在我国流行时间较长, 最早在甘肃发现有此病发生, 随后, 在多个省份报道此病发生, 例如在内蒙古、四川、云南、江苏等地^[5]。在贵州的流行情况, 2001 年首次获得丝状支原体山羊亚种分离株^[6], 2011 年首次获得绵羊肺炎支原体分离株^[7]。贵州白山羊的原产地和主产区位于铜仁市沿河县, 在羊疾病中传染性胸膜肺炎发病率和死亡率高, 年龄在 2 岁内的山羊较易感染, 发病率为 37.7%, 病死率为 36.4%^[8]。此病已严重危害贵州养羊业的健康发展。

TLRs 是一类天然免疫受体, 是高度保守的 I 型跨膜蛋白, 为模式识别受体, 是关键天然免疫分子^[9], 主要在免疫细胞和上皮细胞上表达。它通过识别病原微生物的保守结构发挥着重要作用, 激活天然免疫细胞, 导致一系列的机体炎症

反应, 在机体抵御病原微生物侵袭上发挥重要作用。TLR 样受体信号通路介导多种生物学效应, 如诱导炎症因子释放, 诱导杀菌活性, 促凋亡与抗凋亡作用等。MyD88 是 TLR 信号通路中的关键接头蛋白, 在传递上游信息和感染疾病发生中至关重要。MyD88 与心血管疾病、炎症性肠病、肿瘤等疾病密切相关。

目前, 由于 MO 对山羊肺泡上皮细胞的作用机制尚不是很清楚, 本试验以探讨 MyD88 在 MO 感染山羊肺泡上皮细胞中作用机制为目的, 发现 MyD88 在 MO 对山羊肺泡上皮细胞损伤中发挥重要作用, 该研究为 MO 的致病机制研究提供理论基础和参考意见。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 支原体与细胞 绵羊肺炎支原体与山羊肺泡上皮细胞于 2015 年 10 月在铜仁市沿河县康源白山羊生态养殖农民专业合作社采集, 然后将其保存于梵净山特色动植物资源重点实验室。

1.1.2 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-3 活性检测试剂盒和 ST2825 抑制剂, 购自 Apexbio 公司; LDH 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; SYBR 染料, 购于罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验 收集对数期的山羊肺泡上皮细胞, 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 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔总体积为 200 μL , 边缘孔用无菌的 PBS 填充。弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 置摇床上低速

收稿日期: 2018-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31502067); 中国博士后科学基金资助项目(编号: 2017M613003); 铜仁学院博士科研启动基金(编号: trxyDHI504); 贵州省教育厅自然科学研究重点项目[编号: 黔教合 KY 字(2015)411 号]; 贵州省科技合作计划项目[编号: 黔科合 LH 字(2015)7238; 黔科合 LH 字(2015)7236 号]; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目[编号: 黔教合 KY 字[2017]312]。

作者简介: 张俊波(1984—), 男, 河南周口人, 博士, 副教授, 主要从事免疫遗传与抗病机制研究。E-mail: zhangjunbo666@126.com。

通信作者: 印双红, 硕士, 副教授, 主要从事感染免疫学方面研究。E-mail: ysh_hong2006@163.com。

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,具体操作见说明书。

1.2.2 细胞处理 (1)*MyD88* mRNA 检测组:将细胞传代于六孔板中培养,当单层细胞生长至 80% 覆盖度时,更换无双抗的细胞培养液,支原体:细胞按 10:1 的比例感染细胞,在 5% CO₂、37 ℃ 环境中孵育。于 4、8、12、24 h 4 个时间点收集细胞;(2) *TNF-α* mRNA、*IL-8* mRNA、Caspase-3 活性、Caspase-8 活性、H₂O₂ 浓度、NO 浓度及 LDH 浓度检测组:将细胞传代于六孔板中培养,当单层细胞生长至 80% 覆盖度时,更换无双抗的细胞培养液,将抑制剂不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h,然后,支原体:细胞按 10:1 的比例感染细胞,在 5% CO₂、37 ℃ 环境中孵育,于 24 h 收集细胞。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 *MyD88*、*TNF-α*、*IL-8* mRNA *MyD88* mRNA 实时定量 PCR 检测细胞样品包括 4、8、12、24 h 4 个时间点支原体感染组细胞及 PBS 对照组细胞。

TNF-α、*IL-8* mRNA 实时定量 PCR 检测细胞样品包括 24 h 一个时间点支原体感染组细胞、支原体-抑制剂 ST2825 (5 μmol/L) 组细胞、支原体-抑制剂 ST2825 (10 μmol/L) 组细胞、支原体-抑制剂 ST2825 (20 μmol/L) 组细胞及 PBS 对照组细胞。

从 NCBI 网站 GenBank 查找 *MyD88*、*TNF-α*、*IL-8* 和 *β-actin* 公布的基因序列,采用 Primer 5.0 软件设计对特异性引物(表 1),引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 目的基因扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>MyD88</i> - F	TGCTGCTGCTTCTCTCTGAC
<i>MyD88</i> - R	GGAAGCTCTTCTTCATTTGGCTTG
<i>TNF-α</i> - F	GCCAACTCCCTCTGTTTATGT
<i>TNF-α</i> - R	GGACACCTTGACCTCCTGAAT
<i>IL-8</i> - F	GCTGGCTGTTGCTCTCTT
<i>IL-8</i> - R	GTGGAAGGTGTGGAATGT
<i>β-actin</i> - F	GCTCTCTTCCAGCCTTCCT
<i>β-actin</i> - R	AGGTCTTTGCGGATGTCG

用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA。内参 *β-actin* 为对照,在罗氏 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行相对定量的 PCR 反应,反应体系为:2 × SYBR Green Master Mix 10 μL,cDNA 模板 2 μL,上、下游引物各 1 μL,双蒸水 6 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 5 min 预变性;95 ℃ 15 s,60 ℃ (*MyD88*、*IL-8*) 或 61 ℃ (*TNF-α*、*β-actin*) 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。每组细胞每个时间点的细胞做 3 个重复,样本基因 *MyD88*、*TNF-α*、*IL-8* 的表达强度用其对应的 *β-actin* 的量进行校正,即 $\Delta C_t = C_t (MyD88、TNF-\alpha、IL-8) - C_t (\beta-actin)$,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对试验数据进行分析。

1.2.4 Caspase-3 与 Caspase-8 活性检测 取细胞上清液,4 ℃,12 000 r/min 离心 8 min,按照试剂盒说明书检测 Caspase-3 和 Caspase-8 活性。

1.2.5 H₂O₂ 浓度的测定 把 H₂O₂ 检测试剂在冰上融解,在检测孔加入 50 μL 样品或标准品。在每个孔内加入 100 μL H₂O₂ 检测试剂。轻轻振荡混匀,室温放置 30 min,然后立即测定 *D*_{560 nm}。计算出样品中 H₂O₂ 的浓度,具体操作按

照试剂盒说明书进行。

1.2.6 NO 浓度的测定 取细胞上清液,4 ℃,12 000 r/min 离心 7 min,按照说明书检测 NO 浓度。

1.2.7 LDH 实验 取 50 μL 细胞上清液测 LDH 的 *D*_{450 nm},按照说明书进行操作。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,多组样本间均数用方差分析,2 组间比较采用 2 个样本均数的 *t* 参数检验或 *q* 检验。

2 结果与分析

2.1 抑制剂 ST2825 对肺泡上皮细胞活性的影响

不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)抑制剂 ST2825 与细胞作用 24 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 ST2825 浓度为 5、10、20 μmol/L 不影响细胞活性(图 1),可进行后续研究。

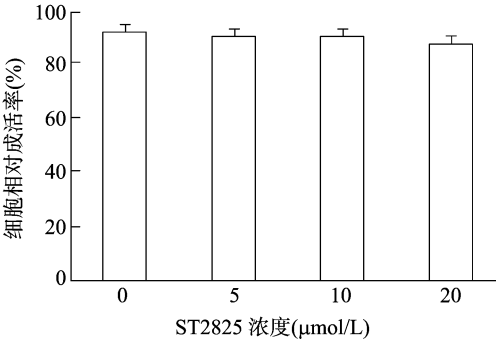
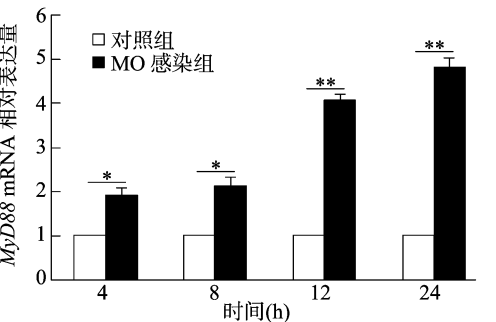


图1 ST2825 对细胞活性影响

2.2 对不同时间下 MO 感染肺泡上皮细胞的分析

MO 感染肺泡上皮细胞(MOI 为 10)后,提取细胞的总 RNA,用实时定量 PCR 检测 *MyD88* 的 mRNA 水平。感染时间为 4、8、12、24 h,结果发现,在所观察的时间点可以显著提高 *MyD88* mRNA 表达水平(图 2)。

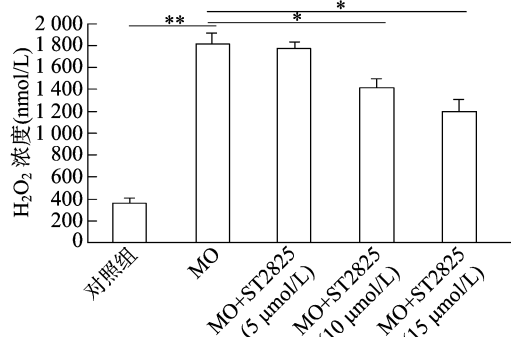


MO 感染组与对照组的比较; *: *P* < 0.05, **: *P* < 0.01

图2 *MyD88* mRNA 表达水平

2.3 抑制剂 ST2825 对 MO 介导的 H₂O₂ 分泌影响

将不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h,用 MO 感染细胞,在 24 h 检测胞内 MO 对细胞引起的损伤情况,结果(图 3)显示,MO 可显著提高 H₂O₂ 分泌(*P* < 0.01),抑制剂 ST2825 在 10 μmol/L 和 20 μmol/L 浓度下可以显著降低 MO 介导的 H₂O₂ 分泌(*P* < 0.05),表明 ST2825 可以降低 MO 引起的细胞损伤。



**表示 MO 感染组与 PBS 对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$);

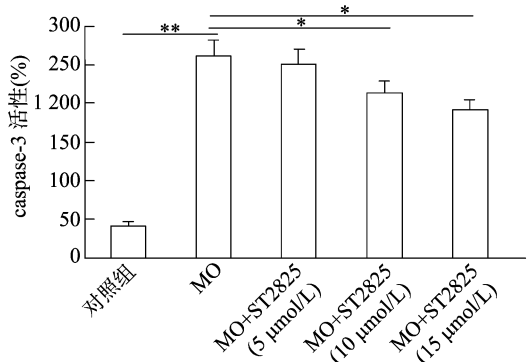
*表示 MO 感染组与 MO+ST2825(10 μmol/L 或 20 μmol/L)

组相比, 差异显著($P < 0.05$)

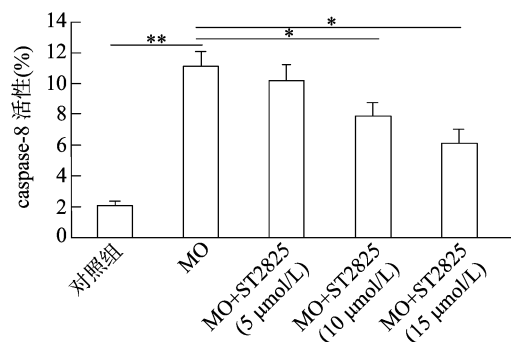
图3 H₂O₂ 浓度变化

2.4 ST2825 对 MO 介导的 caspase-3 和 caspase-8 活性的影响

进一步检测 ST2825 对 MO 介导的 caspase-3 和 caspase-8 活性的影响, 将不同浓度 ST2825 与细胞提前孵育 1 h, 再用 MO 感染细胞 24 h, 检测 caspase-3 和 caspase-8 的活性。结果显示, MO 可极显著提高 caspase-3 (图 4-A) 和 caspase-8 (图 4-B) 的活性 ($P < 0.01$), 而 ST2825 在浓度 10 μmol/L 和 20 μmol/L 时能够显著降低 MO 介导的 caspase-3 (图 4-A) 和 caspase-8 (图 4-B) 的活性 ($P < 0.05$)。



A. caspase-3 活性变化



B. caspase-8 活性变化

**表示 MO 感染组与 PBS 对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$);

*表示 MO 感染组与 MO+ST2825(10 μmol/L 或 20 μmol/L)组

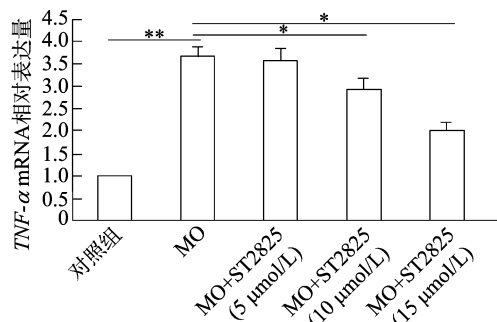
相比, 差异显著($P < 0.05$)

图4 caspase-3 与 caspase-8 活性变化

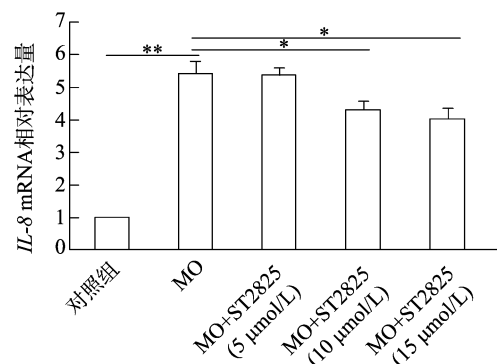
2.5 ST2825 对 MO 介导的 $TNF-\alpha$ 与 $IL-8$ mRNA 表达的影响

由图 5 可知, 将不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h,

用 MO 感染细胞, 在 24 h 检测胞内 MO 对细胞 $TNF-\alpha$ 与 $IL-8$ mRNA 的影响发现, MO 感染细胞组 $TNF-\alpha$ (图 5-A) 与 $IL-8$ (图 5-B) mRNA 表达水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$), ST2825 在 10 μmol/L 和 20 μmol/L 浓度下可显著降低 MO 介导的 $TNF-\alpha$ (图 5-A) 与 $IL-8$ mRNA (图 5-B) 表达水平 ($P < 0.05$), 表明 ST2825 可以降低 MO 引起的炎症因子 $TNF-\alpha$ 与 $IL-8$ mRNA 的表达。



A. $TNF-\alpha$ mRNA 水平变化



B. $IL-8$ mRNA 水平变化

**表示 MO 感染组与 PBS 对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$);

*表示 MO 感染组与 MO+ST2825(10 μmol/L 或 20 μmol/L)组相比, 差异显著($P < 0.05$)

图5 $TNF-\alpha$ 与 $IL-8$ mRNA 表达水平

2.6 ST2825 对 MO 介导的 NO 的影响

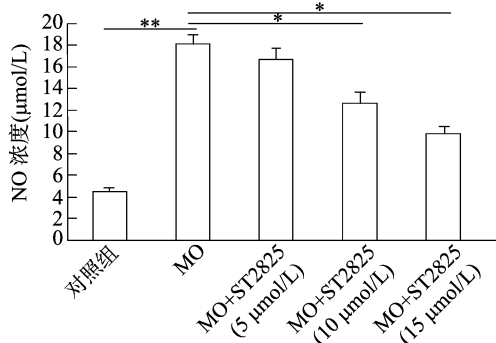
将不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h, 然后, 用 MO 感染细胞, 在 24 h 检测胞内 MO 对细胞引起的损伤情况显示, MO 感染细胞组 NO 水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而抑制剂 ST2825 在 10 μmol/L 和 20 μmol/L 浓度下可以显著降低 MO 介导的 NO 分泌 ($P < 0.05$), NO 是一个非常关键的信号分子, 在细胞凋亡过程中起重要作用, 结果表明抑制剂 ST2825 可以降低 MO 引起的凋亡相关基因 NO 的表达 (图 6)。

2.7 ST2825 对 MO 介导的 LDH 的影响

由图 7 可知, 将不同浓度的 ST2825 与细胞提前孵育 1 h, 用 MO 感染细胞, 在 24 h 检测培养液上清液中 LDH 水平, 结果显示, MO 感染细胞组 LDH 水平极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而抑制剂 ST2825 在 10 μmol/L 和 20 μmol/L 浓度下可以显著降低 MO 介导的 LDH ($P < 0.05$)。结果表明, MO 可引起肺上皮细胞崩解, ST2825 可以降低 MO 引起的细胞崩解度。

3 讨论

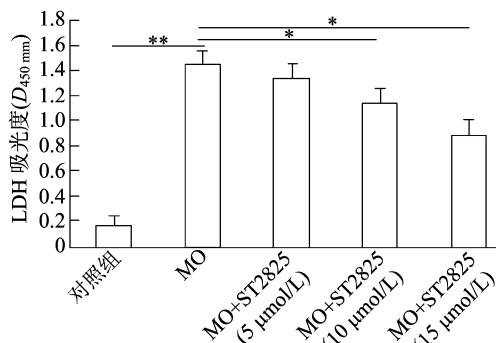
TLRs 属于一种模式识别受体, 可识别病原体的相关分子



**表示 MO 感染组与 PBS 对照组相比, 差异极显著($P<0.01$);

*表示 MO 感染组与 MO+ST2825(10 μmol/L 或 20 μmol/L)组相比, 差异显著($P<0.05$)

图6 NO 浓度变化



**表示 MO 感染组与 PBS 对照组相比, 差异极显著($P<0.01$);

*表示 MO 感染组与 MO+ST2825(10 μmol/L 或 20 μmol/L)组相比, 差异显著($P<0.05$)

图7 LDH 水平变化

模式, 识别的范围很广, 主要包括脂质类、碳水化合物和脂蛋白等结构, 是连接非特异性免疫和特异性免疫应答的一个桥梁^[10]。TLR4 是 TLRs 其中的成员, 它是通过活化前炎症事件的一系列信号对病原生物所进行的应答, 而脂多糖是 TLR4 配体有效的激动剂^[11]。当被感染肺炎支原体后, 就会激起宿主体内的免疫应答^[12], 而天然免疫系统又是宿主抵御病原入侵的第一道防线, 其中 TLR 在其中发挥着主要作用。支原体可激活宿主细胞 Toll 样受体 (TLR) 信号通路, 致使细胞释放大量的 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1$ 等因子的释放^[13]。本研究表明, 在抑制剂 ST2825 的作用下, 可以抑制支原体介导的 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平。

MyD88 依赖性途径是所有的 TLR 配体所介导的一个关键通路, 而 MyD88 非依赖性途径是 TLR3 和 TLR4 专有的信号传导途径的通路。MyD88 与 TLRs 相互作用后, 募集 IRAK 家族蛋白。但在外源刺激下由配体激活后, IRAK-4 发挥致 IRAK-1 磷酸化的激酶作用, 磷酸化的 IRAK-1 继而与 MyD88 作用。此时, MyD88 的 TIR 结构域与受体发生结合, N 端的 DD 结构域与 TRAF6、IRAK-1 和 IRAK-4 复合体共同结合至受体上。而 IRAK-1 和 TRAF-6 发生磷酸化反应活化后与 MyD88 发生解离反应。

caspases 家族存在于绝大多数哺乳类细胞中, 其中 caspase-3 与 caspase-8 在 caspase 级联反应中作用至关重要, 是导致细胞凋亡的关键途径和所有凋亡信号传导的通路^[14-15]。caspase-8 是细胞凋亡步骤中的起始因子, 可以

直接活化下游效应分子 caspase-3。而 caspase-3 位于细胞凋亡级联反应的下游, 也是细胞程序性死亡的关键因子^[16]。本试验结果显示, MO 可显著提高 caspase-3 的活性, 而 ST2825 能够显著降低 caspase-3 的活性, 消弱 MO 对 caspase-3 活性的促进作用。

不同浓度下的 NO 存在促进细胞凋亡和抑制细胞凋亡双重作用。已有研究发现支原体不仅介导宿主发生免疫反应, 同时也可引起单核细胞和巨噬细胞坏死或凋亡发生^[17]。细胞凋亡是通过级联反应与细胞因子变化致细胞死亡的过程。NO 作为参与宿主各种生理和病理过程的多功能因子, 低浓度的 NO, 可保护细胞免受凋亡, 但 NO 的分泌过多可导致多种类型细胞发生凋亡。此外, 多种支原体能够通过分泌过量 NO 来诱导细胞凋亡^[18-19]。而 NO 的表达是由低剂量抑制因子一氧化氮合酶 (NOS) 所控制的^[20], 过量的 NO 与超氧阴离子自由基形成过氧亚硝酸盐, 从而活化细胞凋亡的级联反应^[21]。

参考文献:

- [1] Kusiluka L J, Ojeniyi B, Friis N F, et al. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of cattle and goats in Tanzania [J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2000, 41 (3): 299-309.
- [2] 倪莉, 徐强, 赵俊, 等. 山羊传染性胸膜肺炎病原的分离鉴定和生物学特性[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47 (3): 26-27.
- [3] 曹玉璞, 叶永康. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 151-162.
- [4] Hernandez L, Lopez J, St-Jacques M, et al. Mycoplasma mycoides subsp. Capri associated with goat respiratory disease and high flock mortality [J]. Canadian Veterinary Journal - Revue Veterinaire Canadienne, 2006, 47 (4): 366-369.
- [5] 汪代华, 徐刚毅. 山羊传染性胸膜肺炎的流行现状和防治技术[J]. 四川畜牧兽医, 2005, 32 (10): 48-49.
- [6] 万一元, 龙鳌, 万晴姣, 等. 贵州山羊传染性胸膜肺炎病原的分离鉴定[J]. 中国草食动物, 2001, 3 (4): 44-46.
- [7] 张双翔, 周碧君, 姜汉雯, 等. 山羊传染性胸膜肺炎继发大肠埃希氏菌感染的诊断[J]. 贵州农业科学, 2011, 39 (6): 144-146, 149.
- [8] 杨光, 李忠全, 崔玉林, 等. 贵州白山羊传染性胸膜肺炎流行病学调查报告[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 204 (7): 119-120.
- [9] O'Neill L A, Golenbock D, Bowie A G. The history of toll-like receptors - redefining innate immunity [J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13 (6): 453-460.
- [10] 徐恩君, 刘亚婷, 李涛. Toll 样受体信号转导与原发性肝癌发生发展关系的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2015, 31 (8): 727-732.
- [11] 王振辉, 马科, 宋晓波, 等. TLR4 抑制剂 TAK-242 对高脂饮食诱导的小鼠胰岛素抵抗的干预作用[J]. 免疫学杂志, 2016 (11): 928-934.
- [12] Hilliard B, Samoilova E B, Liu T S, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF- κ B-deficient mice: roles of NF- κ B in the activation and differentiation of autoreactive T cells[J]. Journal of Immunology, 1999, 163 (5): 2937-2943.
- [13] 黄亦彤, 钟志勇, 吕永慧, 等. 肠炎清对免疫复合溃疡型结肠炎模型大鼠结肠组织 NF- κ B 蛋白表达和 TLR4、MyD88 基因表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016 (12): 906-910, 915.

徐小波, 严敏, 欧正铨, 等. 6 种进口猪精液常温保存稀释粉的效果比较[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9): 201–203.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.046

6 种进口猪精液常温保存稀释粉的效果比较

徐小波¹, 严敏², 欧正铨³, 任宪路³, 师蔚群¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014;

2. 江苏省沛县农业干部学校, 江苏沛县 221600; 3. 徐州惠牧种畜禽有限公司, 江苏沛县 221600)

摘要: 为了解进口猪精液常温保存稀释粉的实际应用效果, 选购市场上常见的 6 种进口稀释粉进行比较试验。结果表明: 随着常温保存时间的延长, 不同稀释粉组间, 活力下降速度存在差异, 其中 DILTEC 和 CXM 下降最快, PRIMXCELL 组下降最慢。精子有效存活时间差异很大, 由长到短的顺序为 PRIMXCELL > ACTIYE > XINZUAN > SpermPro > CXM > DILTEC; 总存活时间也是 PRIMXCELL 最长, 达到 384 h 以上; 保存 120 h 顶体完整率存在显著差异, 从高到低顺序为 PRIMXCELL > SpermPro > XINZUAN > ACTIYE > CXM > DILTEC。说明法国的 PRIMXCELL 稀释粉最好, 有效存活时间 242 h, 总存活时间 384 408 h, 保存 120 h 顶体完整率 79.6%。

关键词: 公猪精液; 稀释粉; 常温保存; 精子活力; 顶体完整率

中图分类号: S814.3; S828.3⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)09-0201-03

1956 年英国学者 Polge 成功地将猪人工授精技术从试验研究应用于养猪生产实践, 但直到 20 世纪 80 年代这项技术才真正在养猪生产中广泛应用^[1]。我国猪人工授精推广较晚, 且外种猪引进(造成发情鉴定不准确)等原因严重影响了本项技术的发展。一些养猪发达国家人工授精的普及率在 90% 以上^[2-3], 我国猪人工授精的比例在 40% 左右, 规模猪场的比例达 85%。虽然猪冷冻精液能实现猪精液的长期保存, 但其技术相对复杂、成本高且受胎率低, 所以 99% 以上采用常温保存精液来实施猪人工授精^[4]。猪精液的活力保存是人工授精的重要环节, 其中稀释粉的配制是保证精子质量

的关键因素之一。国外稀释粉研究较早, 保存效果相对较好, 目前常见的进口稀释粉有丹麦的亚卫、比利时的 CMX、美国的 VIM、西班牙 BIO、法国卡苏 BTS 等, 进口稀释粉种类多, 价格贵, 效果差别较大。为筛选出优秀的进口稀释粉, 本研究挑选出市售常见的 6 种进口稀释粉进行效果比较, 以期为人工授精的推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 稀释粉

选购市场上常见的 6 种进口稀释粉(法国 PRIMXCELL、荷兰 SpermPro、丹麦 ACTIYE、西班牙 DILTEC、比利时 CXM 和韩国 XINZUAN)进行比较试验。

1.2 公猪精液

试验用精液来源于徐州惠牧种畜禽有限公司 18 月龄的健康大约克种猪, 于 2017 年 5 月共 4 次采集同一头公猪精液(公猪号 HM15385), 手握法采精, 收集中段精子含量高的部分(丢弃射精开始与结束时精清含量高的部分)精液, 每次采

收稿日期: 2018-03-21

基金项目: 江苏省苏北科技专项(编号: SZ-XZ2017011)。

作者简介: 徐小波(1964—), 男, 江苏镇江人, 研究员, 研究方向为地方猪种资源保护与利用。E-mail: 119649103@qq.com。

通信作者: 师蔚群, 副研究员, 主要从事畜禽生态健康养殖技术研究。E-mail: 113847911@qq.com。

[14] Marani M, Tenev T, Hancock D, et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(11): 3577–3589.

[15] 毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148–150.

[16] 曾明, 丁媛媛, 王金萍, 等. 可舒胶囊对酒精性肝损伤小鼠肝组织 Caspase-3 与 Caspase-8 活性的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(27): 22–24.

[17] Weldearegay Y B, Pich A, Schieck E, et al. Proteomic characterization of pleural effusion, a specific host niche of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle with contagious bovine pleuropneumonia (CBPP)[J]. Journal of Proteomics, 2016, 131: 93–103.

[18] Li B, Du L P, Sun B, et al. Transcription analysis of the porcine

alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e101968.

[19] Xu X, Zhang H, Song Y L, et al. Strain-dependent induction of neutrophil histamine production and cell death by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2012, 91(2): 275–284.

[20] Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2006, 72(1/2): 46–59.

[21] Bai Fangfang, Ni Bo, Liu Maojun, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(1): 58–67.