

王婷婷, 胡 萍, 张顺利. 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 193–196.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.048

内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响

王婷婷¹, 胡 萍², 张顺利³

(1. 漯河职业技术学院食品工程系, 河南漯河 462002; 2. 许昌职业技术学院园林与食品工程学院, 河南许昌 461000;

3. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要:研究了内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的数量和分布的影响,以探讨巨噬细胞对胚胎的着床和维持的作用。采用昆明系妊娠小鼠分为对照组和试验组,在小鼠妊娠 6 d(D₆)对照组腹腔注射生理盐水,试验组分为 I、II、III 组,分别注射 1、2、4 μg 剂量的内毒素,用酶组织化学染色的方法显示出子宫内巨噬细胞的数量和分布。结果显示,与对照组相比较,试验 I、III 组子宫内巨噬细胞的数量明显增多,差异极显著,而试验 II 组与对照组没有显著差异。巨噬细胞在子宫环肌外层、环肌内层和内膜上的分布与对照组相比较,环肌外层巨噬细胞数量减少,而环肌内层和内膜的巨噬细胞数量明显增多,差异显著。提示内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量增多,细胞向子宫内膜迁移,而不利

于胚胎着床和维持,可能对母胎免疫耐受产生影响。

关键词:内毒素;妊娠小鼠;酶组织化学;巨噬细胞;免疫耐受

中图分类号:S852.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0193-03

妊娠是一个复杂的生理过程,从免疫学上来看类似于器官移植。胚胎对母体来说是一个移植物,母体免疫系统对此进行识别,并产生免疫应答^[1]。巨噬细胞是子宫内的一种重要免疫细胞,有多种表面标志和标记酶,具有抗感染、抗肿瘤、呈递抗原和免疫调节等作用。巨噬细胞的数量和在子宫内的分布在胚胎的着床和维持中起到一定的作用^[2-3]。

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁上的一种脂多糖和微量蛋白的复合物,可刺激机体对多糖成分产生抗体^[4]。内毒素作为外源性致热原(热原质),作用于中性白细胞、单核细胞、巨噬细胞等。内毒素能够激活妊娠小鼠子宫内的巨噬细胞,从而对胚胎的着床和维持产生影响^[5],也对母胎免疫耐受产生一定的影响。

本试验通过给妊娠期小鼠注射不同剂量的内毒素,通过酶组织化学染色方法,研究内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响,探讨巨噬细胞在胚胎的着床和维持中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物^[6] 成年雌性昆明种小鼠 40 只,由河南师范大学生命科学学院实验动物繁育中心提供,体质量(25 ± 2) g,自由饮水取食。分成对照组与试验 I、II、III 组,雌、雄鼠按 2:1 合笼,次日晨查见阴栓者为妊娠 1 d,到妊娠 6 d(D₆)时,对照组腹腔注射生理盐水,试验 I、II、III 组分别注射 1、2、4 μg 剂量的内毒素,8 d(D₈)观察流产情况并取材。

1.1.2 主要化学药品和试剂 内毒素,购自 Sigma 公司;

α-醋酸萘酯(α-NAE),购自上海试剂一厂;固蓝 B 盐购自德国 Chroma-gesellschaft 公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 冰冻切片机(美国 Reichert Histo Stat Microtome Cryostat),柯达 DC 290 数码相机。

1.2 方法

1.2.1 小鼠子宫材料的获取 小鼠脱颈椎处死,沿腹中线剪开腹腔,取其子宫,在预冷的生理盐水中快速去除脂肪,迅速放入液氮中冷冻 30 s。标记好材料放入 -20 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 冰冻切片的制备 -20 ℃ 下冰水包埋材料,修块,切片,切片的厚度 8 μm,材料平铺在载玻片上,凉干后 -20 ℃ 冰箱冷冻保藏。

1.2.3 0.2 mol/L PBS 盐溶液配制 A 液:NaH₂PO₄ · 2H₂O 3.12 g 加 100 mL 蒸馏水;B 液:Na₂HPO₄ · 12H₂O 7.16 g 加 100 mL 蒸馏水;取 A 液 13 mL 加 B 液 87 mL,混合均匀,调 pH 值至 7.4。

1.2.4 孵育液配制 0.03 g α-醋酸萘酯 + 5 mL 丙酮充分溶解 + 5 mL 蒸馏水混匀 + 20 mL PBS 盐溶液(要边加边摇晃防止生成沉淀) + 固蓝 B 盐。充分搅拌溶解混匀。注意孵育液要即配即用。

1.2.5 酶组织化学染色 (1)把冰冻切片室温下充分干燥。(2)放入纯丙酮液中固定 10 min。(3)取出固定好的切片用 0.2 mol/L 的 PBS 盐溶液冲洗 3 次,每次 5 min。(4)把冲洗好的切片放入配制好的孵育液中,37 ℃ 温浴锅孵育 50 min。(5)从孵育液中取出切片,用 0.2 mol/L PBS 盐溶液冲洗 1 次,5 min。放入 0.2 mol/L PBS 盐溶液中浸泡 5 min,再放入蒸馏水中浸泡 2 min,取出后甘油明胶封片。(6)镜检、拍照、统计分析。

1.2.6 统计方法 采用 χ^2 检验,α = 0.05,结果大于 α 差异不显著,小于 α 差异显著。

收稿日期:2019-03-12

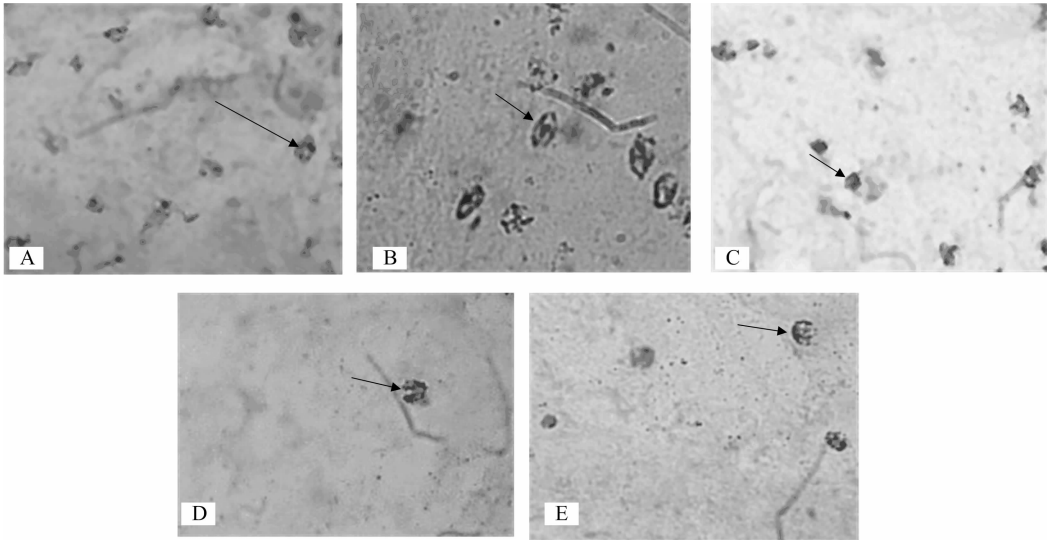
作者简介:王婷婷(1981—),女,河南漯河人,硕士,讲师,主要从事食品和生物技术研究。E-mail:541144845@qq.com。

通信作者:张顺利,教授,主要从事免疫方面研究。E-mail:zsl369@sina.com。

2 结果与分析

2.1 酶组织化学染色巨噬细胞的结果

镜检观察子宫内巨噬细胞,发现巨噬细胞多为不规则形状,也有呈椭圆形、圆形的,染色结果细胞质呈紫色,而细胞核为无色(图 1)。



A—试验Ⅱ组子宫环肌外层巨噬细胞(400×); B—对照组子宫环肌内层巨噬细胞(400×); C—试验Ⅰ组子宫环肌内层巨噬细胞增多(400×); D—对照组子宫内层巨噬细胞(400×); E—试验Ⅰ组子宫内层巨噬细胞显著增多(400×)

图1 不同处理巨噬细胞染色结果

2.2 内毒素对妊娠小鼠胚胎着床的影响

正常小鼠的胚胎为粉红色,透明度较高。注射内毒素后能诱使胚胎流产,先出现阴道出血,然后出现胚胎吸收。对照组未观察到流产,胚胎为粉红色;试验Ⅰ组小鼠未见流产,但发现子宫内有黑红色的瘀血;试验Ⅱ、Ⅲ组流产率分别为 75% 和 100%,胚胎已经模糊不清,出现吸收现象(表 1)。

表 1 内毒素对妊娠小鼠胚胎着床的影响

注射剂量 (μg)	妊娠小鼠 (只)	胎鼠个数 (个)	流产率 (%)
生理盐水	4	13、11、10、10	0
1	4	8、10、14、8	0
2	4	12、2、1、2	75
4	4	0、1、0、0	100

2.3 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

注射不同剂量的内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的总数呈波动性变化,注射 1 μg 内毒素巨噬细胞数量较正常对照组明显增加,2 μg 时数量又下降到正常水平,4 μg 时数量又增加(图 2)。

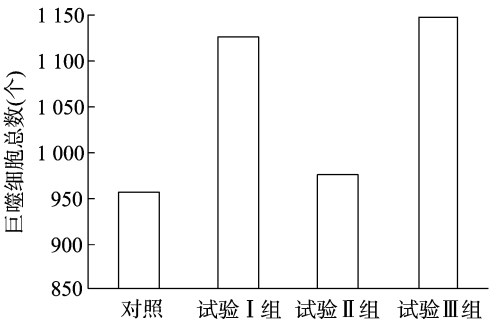


图2 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的总体数量变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异不显著(表 2)。

表 2 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	955	a	A
试验Ⅰ组	1 125	b	B
试验Ⅱ组	974	a	A
试验Ⅲ组	1 146	b	B

2.4 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞分布的影响

妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量分布的变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异不显著(表 3)。

表 3 子宫内巨噬细胞数量的变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	3.960 ± 1.37	a	A
试验Ⅰ组	8.240 ± 2.90	b	B
试验Ⅱ组	2.768.24 ± 1.77	a	A
试验Ⅲ组	6.200 ± 3.07	b	B

妊娠小鼠子宫内环肌层巨噬细胞的数量分布变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异显著(表 4)。

妊娠小鼠子宫内环肌外层巨噬细胞的数量分布变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异显著(表 5)。

注射不同剂量的内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的数

表 4 子宫环肌内层巨噬细胞的数量变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	9.12 ± 3.35	a	A
试验 I 组	19.88 ± 4.89	b	B
试验 II 组	15.12 ± 5.71	ab	AB
试验 III 组	18.16 ± 10.07	b	B

表 5 子宫环肌外层巨噬细胞的数量变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	25.12 ± 9.08	a	A
试验 I 组	16.88 ± 5.74	b	B
试验 II 组	21.08 ± 7.02	ab	AB
试验 III 组	21.48 ± 7.21	b	B

量分布发生变化。随着注射内毒素剂量的逐渐增加,环肌内层和内膜的细胞数量增加,环肌外层细胞数量减少。正常情况下,巨噬细胞大多数分布于子宫外膜,注射内毒素刺激环肌内层和内膜的巨噬细胞数量增加。虽然试验 II 组妊娠小鼠子宫内巨噬细胞总数量没有变化,但巨噬细胞在子宫内的分布与对照组相比环肌内层的数量明显增多(图 3)。

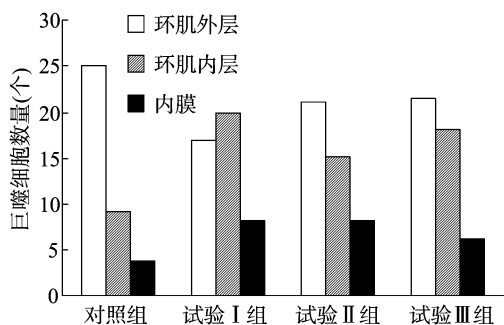


图 3 不同剂量内毒素对子宫内各组织巨噬细胞分布的影响

3 讨论

文献报道非特异性酯酶 α -NAE 存在于单核细胞、粒细胞系统中,而子宫内的其他细胞几乎不含此物质^[7],本研究观察子宫内巨噬细胞,发现巨噬细胞多为不规则形状,也有呈椭圆形、梭形。 α -NAE 主要存在于巨噬细胞的细胞质内,染色结果细胞质呈紫色,而细胞核为无色。用此方法可以很简便很快速地显示阳性巨噬细胞,与组化染色相比很经济,但也有一定的缺点,比如染色很容易褪色、不易长时间保存。

有文献报道在妊娠期 D8 肌层中几乎没有巨噬细胞^[8],本研究也观察到相同的结果,所以在对巨噬细胞进行统计计数时把子宫结构分为环肌外层、环肌内层和内膜进行统计分析。

研究发现,1 μ g 内毒素能使小鼠巨噬细胞数量增加,使小鼠子宫内膜、肌层的巨噬细胞都与对照有显著性差异,但是随着内毒素剂量的增加,到 2 μ g 时,子宫总的巨噬细胞基本没有变化,但是肌层巨噬细胞和对照相比有了显著性差异。4 μ g 时,全部的孕鼠均发生了流产,但总的子宫巨噬细胞数量和 1 μ g 没有显著性差异。但是同样,流产小鼠子宫内膜和肌层的巨噬细胞都与对照有显著性差异。由此,推测子宫内

巨噬细胞数量的多少和 LPS 的用量有关。在一定的 LPS 范围内,巨噬细胞的数量随 LPS 剂量增加而减少到一定水平,但是当 LPS 量继续增大时,巨噬细胞的数量将会增多。

小鼠在正常妊娠期间子宫内巨噬细胞的数量分布随时间不断地发生动态变化,在小鼠妊娠 D8 子宫内的巨噬细胞主要集中在子宫的环肌外层,而环肌内层和内膜中几乎没有巨噬细胞,有利于胚胎着床和维持。妊娠期子宫内巨噬细胞过多存在对于妊娠不利^[9]。本研究也观察到了这种现象,但是试验还观察到了 2 μ g 剂量巨噬细胞总数基本没有变化,但是在子宫内部的分布却发生了变化,也就是说巨噬细胞在子宫内发生了迁移,从而导致流产。

但内毒素是如何调节巨噬细胞的迁移呢? 试验组与对照组相比巨噬细胞的数量明显增加,而且巨噬细胞在子宫环肌内层和内膜的分布数量也明显增加,试验 II 组虽然巨噬细胞数量又降到正常的水平,但巨噬细胞分布在环肌内层的数量也明显增加。

内毒素并不干扰孕鼠的正常内分泌功能,也不能穿越胎盘进入胎儿体内。内毒素诱导流产的一个重要机制是引起预致敏的(primed)巨噬细胞释放 $\text{TNF}-\alpha$ ^[10-12]。 $\text{TNF}-\alpha$ 导致流产已被动物试验所证实,内毒素诱导小鼠流产与子宫内 $\text{TNF}-\alpha$ 的产生有直接关系,本试验中内毒素能诱导巨噬细胞由子宫外膜向子宫内膜发生迁移,使子宫内膜巨噬细胞数量增加,推测迁移到内膜的巨噬细胞释放 $\text{TNF}-\alpha$ 。它可直接引起胎盘滋养层细胞的凋亡,因滋养层前祖细胞在未成熟阶段发生程序性死亡而耗竭,导致子宫内胎儿缺乏营养而死亡^[13]。使妊娠小鼠子宫内的胚胎不能正常着床和维持,可能不利于母鼠免疫耐受,使母鼠对胚胎产生排斥而流产,所以内毒素能激活巨噬细胞,使巨噬细胞数量增加,并诱导巨噬细胞向子宫内发生迁移,影响胚胎的着床和维持,导致妊娠小鼠流产。

参考文献:

- [1] 郝苏平. 中药对动物噪音应激诱导流产的安胎作用及机理[D]. 保定:河北农业大学,2012.
- [2] Baines M G, Duclos A J, Anteck A E, et al. Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 1997, 37(6): 471-477.
- [3] 肖云山, 林其德. 妊娠早期蜕膜组织巨噬细胞分泌 IL-10/IFN- γ 功能的特征[J]. 现代妇产科进展, 2005, 14(3): 218-221.
- [4] 张喜平, 周田美, 董晓勤, 等. 黄芩苷注射液体外抗菌作用实验研究[J]. 医学研究杂志, 2006(8): 39-41.
- [5] 钟秀会, 周占祥, 孙秉贵, 等. 黄芩白术对 LPS 诱导小鼠流产的对抗作用及子宫内 IL-2 含量的影响[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(2): 51-53.
- [6] 闫 坤. 前列腺素 E1 对小鼠子宫巨噬细胞表型和功能活性的影响[D]. 河南师范大学, 2011.
- [7] 王永才. 血液骨髓细胞检查[M]. 大连科技文献出版社, 1994.
- [8] 周占祥, 邓泽沛, 孙秉贵, 等. 生殖周期中小鼠子宫巨噬细胞的分布[J]. 解剖学报, 1998, 29(2): 96-101.
- [9] 田兴辉, 邓泽沛, 钟秀会, 等. 孕酮拮抗剂 RU486 对妊娠小鼠子宫巨噬细胞的影响及与妊娠相关性的研究[J]. 解剖学报, 2002, 33(1): 97-101.
- [10] 张 青, 徐剑铖, 毛宝龄, 等. 内毒素致伤大鼠肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ 、

肖俊, 华国洪, 李华, 等. 海康鸡屠宰性能及肉质特性分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 196–200.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.049

海康鸡屠宰性能及肉质特性分析

肖俊¹, 华国洪², 李华^{1,2}, 谭淑雯^{1,3}, 赵海全^{1,3}, 于辉²

(1. 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室/佛山科学技术学院, 广东佛山 528225; 2. 广东天农食品有限公司, 广东清远 511827; 3. 佛山仙溪生物科技有限公司, 广东 528000)

摘要:探讨了 105 日龄海康鸡屠宰性能和肉质特性, 结果表明, 公母鸡屠宰率分别为 91.48% 和 92.52%, 全净膛率分别为 61.85% 和 61.35%; 腿肌的最大 pH 值显著高于胸肌 ($P < 0.05$); 胸肌肌纤维面积和直径均极显著低于腿肌 ($P < 0.01$); 海康鸡肌肉粗蛋白含量为 15.54% ~ 20.20%, 总水分含量为 71.93% ~ 75.13%; 多不饱和脂肪酸和必需脂肪酸含量表现为公鸡高于母鸡、腿肌高于胸肌; 参考 FAO/WHO 模式, 大部分必需氨基酸含量高于参考值, 且氨基酸比值系数分 (SRC) 在 77.72 ~ 79.36 之间, 胸肌肌苷酸含量显著高于腿肌 ($P < 0.05$), 初步表明海康鸡产肉性能良好, 可作为优良的屠宰加工型肉鸡配套应用提供参考。

关键词:海康鸡; 屠宰性能; 肉质特性; 肌苷酸

中图分类号: S831.8; TS251.5⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0196-05

培育屠宰加工型优质肉鸡是商业化肉鸡育种的主流趋势, 市场需求需要细分不同日龄上市的肉鸡, 对鸡肉风味及加工等也提出了更高的要求^[1]。现代肉鸡生产中, 主要以慢速型、中速型及快速型 3 种类型肉鸡为主, 如何更好地兼顾生长速度和肉品风味以获得良好的生产效益, 是当下的研究热点之一。海康鸡是康达尔公司收集和选育的广东省湛江市海康区地方品种石岐杂鸡, 经培育形成的专门化品种, 作为中速型肉鸡, 其生长速度相对地方优质麻鸡较快, 在发展屠宰加工型肉鸡方面具有一定的优势。为探讨该肉鸡的屠宰性能及肉质特性, 比较其与优质地方麻鸡如广西麻鸡^[2]在屠宰加工和肉质方面的差异, 有利于进一步开发海康鸡的生产和应用, 为其大规模上市和肉品加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验选择同一批次海康鸡公母各 200 羽, 自由饮水、采

食, 进行常规免疫程序及日常饲养管理工作, 本试验于 2016 年在广东天农食品有限公司和佛山科学技术学院完成。

1.2 屠宰性状测定及肉质分析

在 105 日龄禁食 12 h, 随机抽取公鸡、母鸡各 30 羽进行空腹个体称体质量、常规屠宰与肌肉品质测定, 样品分析前在 -80°C 下保存备用。屠体性状的测定方法参照 NY/T 823—2004《家禽生产性能名词术语和度量统计方法》。肉质特性主要检测加工学指标[最大 pH 值 (pHu)、贮存损失、剪切力和熟肉率]; 组织学指标 (肌纤维直径、密度、面积), 其中制作胸肌和腿肌肌纤维横截面石蜡切片各 30 个, 进行 HE 染色, 采用 10×40 倍显微镜测量, 每个样本选取 3 个视野统计及计算肌纤维的直径、密度及面积、营养学指标[粗蛋白含量测定采用微量凯氏定氮法 (GB/T 5009.5—2016《饲料中粗蛋白的测定方法 凯氏定氮法》); 肌内脂肪含量测定采用索式浸提法 (GB/T 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》); 水分含量测定采用直接干燥法 (GB/T 5009.3—2016《食品中水分的测定》); 钙含量测定采用 EDTA 快速测定法, 磷含量用钒钼酸检测法]。取胸肌和腿肌混合样品送至中国广州分析测试中心测定氨基酸、脂肪酸和肌苷酸 (IMP) 含量。计算必需氨基酸与氨基酸总量比值 (EAA/TAA), 根据 FAO (国际粮农组织)/WHO (世界卫生组织) 的氨基酸评分标准模式进行对比, 并采用氨基酸比值系数法综合评价海康鸡的营养价值, 计算公式如下^[3]: 氨基酸比值 (RAA) = 食物中氨基酸含量/模式氨基酸含量; 氨基酸比值系数 (RC) = 氨基酸比值/氨基酸比值的平均数; 氨基酸比值系数分 (SRC) = $100 - \text{变异系数}$

收稿日期: 2018-05-10

基金项目: 广东省应用型科技研发专项重点项目 (编号: 2016B020233007); 广东省肉鸡商业化育种工程技术研究中心项目 (编号: 粤科函产学研字[2017]1649 号); 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室项目 (编号: 2019B030301010)。

作者简介: 肖俊 (1994—), 男, 广东河源人, 硕士, 主要从事家禽生产研究。E-mail: 1768767977@qq.com。

通信作者: 李华, 博士, 教授, 主要从事动物育种研究。E-mail: okhuali@aliyun.com。

IL-6 的 mRNA 表达及 TNF- α 、IL-6 活化研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(9): 523–526.

[11] Blackwell T S, Blackwell T R, Christman J W. Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor- κ B and suppresses its activation in rat alveolar macrophages[J]. Leukoc Biol, 1997, 62(6): 855–861.

[12] 钱志英, 刘亚洁. 水红花子对 LPS 诱导流产小鼠子宫巨噬细胞的抑制效应及其保胎作用[J]. 中国免疫学杂志, 2014(6): 763–767.

[13] Yui J, Garcia - Lloret M, Wegmann T G, et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor- α and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts[J]. Placenta, 1994, 15(8): 819–826.