

博落回提取物对脂多糖诱导猪应激细胞应激参数及免疫球蛋白 G 和超氧化物歧化酶 mRNA 表达的影响

满意 张春勇* 陈克嶙 李美荃 郭荣富**

(云南农业大学, 云南省动物营养与饲料重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 本文旨在研究博落回提取物对脂多糖(LPS)诱导猪应激细胞应激参数及免疫球蛋白 G (IgG) 和超氧化物歧化酶(SOD) mRNA 表达的影响。试验选用猪胚胎背部成纤维细胞, 分别用正常细胞和以 LPS 刺激细胞建立的应激模型进行试验, 对照组采用基础培养液, 土霉素组在基础培养液中添加土霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (阳性对照), 博落回组在基础培养液中分别添加 50、100、150 ng/mL 的博落回提取物。检测 IgG、溶菌酶(LSZ)、一氧化氮(NO)含量, 一氧化氮合酶(NOS)、乳酸脱氢酶(LDH)活性以及 IgG 和 SOD mRNA 表达量。结果表明: 1) 博落回组 IgG、NO 和 LSZ 含量及 NOS 活性均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 土霉素组 IgG 和 LSZ 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。2) 对应激细胞和正常细胞而言, 博落回组 IgG mRNA 表达量均极显著高于对照组和土霉素组 ($P < 0.01$), 50 和 100 ng/mL 博落回组均极显著高于 150 ng/mL 博落回组 ($P < 0.01$)。土霉素组 IgG mRNA 表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。100 ng/mL 博落回组应激细胞 IgG mRNA 表达量极显著高于正常细胞 ($P < 0.01$)。3) 对应激细胞和正常细胞而言, 与对照组相比, 添加博落回提取物 50、100、150 ng/mL 均极显著提高 SOD mRNA 表达量 ($P < 0.01$)。土霉素组 SOD mRNA 表达量极显著高于对照组和博落回组 ($P < 0.01$)。各组应激细胞 SOD mRNA 表达量均显著或极显著高于正常细胞 ($P < 0.01$)。综合各项指标, 博落回提取物可提高 LPS 应激细胞 IgG、NO 和 LSZ 的含量及 NOS 活性, 提高应激细胞和正常细胞 IgG 和 SOD mRNA 的表达量, 总体效果优于土霉素, 较好的添加浓度为 50 ~ 100 ng/mL 。

关键词: 博落回提取物; 细胞培养; 应激参数; 免疫球蛋白 G; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2012)12-2507-08

近年来抗生素使用的弊端日益严重, 针对抗生素药物残留和耐药性问题, 研究和应用新型抗生素替代品已成为重要课题内容。博落回 (*M. cordata*) 在动物生产中, 具有广谱清热解毒消肿、抗菌等作用。而博落回提取物 (MC extracts) 是从罂粟科博落回属植物博落回或小果博落回 (*M. microcarpa*) 植株中提取出来的生物碱, 作为安全新型抗生素替代品在畜牧业中具有广阔的应用前景。经过前期发现, 添加适宜浓度博落回提取物

对仔猪具有明显的促生长作用, 进一步研究博落回提取物是否可作为仔猪免疫和抗氧化调节剂具有重要科学意义。研究表明, 博落回提取物中主要含有苯并菲啶类生物碱血根碱和白屈菜红碱, 博落回提取物中的血根碱与白屈菜红碱具有抑菌、抗肿瘤细胞增殖、保护肝脏、杀虫等作用^[1-4], 博落回在欧盟是允许添加的饲料添加剂之一。Vieira 等^[5]报道, 在火鸡饲料中添加含有博落回提取物的饲料添加剂, 结果表明添加 32.8 mg/kg 博

收稿日期: 2012-06-04

基金项目: 云南现代农业生猪产业技术体系——生猪营养 (A3006688)

作者简介: 满意 (1985—), 女, 湖南怀化人, 硕士研究生, 从事猪抗病营养的分子基础研究。E-mail: manyi2000@163.com

* 同等贡献作者

** 通讯作者: 郭荣富, 教授, 博士生导师, E-mail: rongfug@163.com

落回提取物能提高火鸡采食量,在 35 日龄时有最大的饲料转化率。饶华等^[6]研究表明,血根碱和博落回提取物均能显著提高断奶仔猪的生长性能,有效缓解了断奶应激。满意^[7]研究表明,博落回提取物显著改善仔猪生产性能、免疫性能和抗氧化能力,仔猪饲料适宜添加量为 4.5 mg/kg。生物碱是存在于自然界中的一类含氮的碱性有机化合物,有显著的生物活性,是中草药中重要的有效成分之一,生物碱具有提高机体免疫力和抗氧化能力的作用,但其作用机制仍不清楚,对博落回提取物是否通过影响动物相关基因表达而改善机体免疫性能和抗氧化能力的研究资料很少,迄今为止,博落回提取物对猪免疫球蛋白 G(IgG)和超氧化物歧化酶(SOD)mRNA 表达影响的研究鲜见报道。本试验旨在通过脂多糖(LPS)诱导猪细胞以建立应激细胞模型,检测细胞应激参数的变化,采用实时荧光定量 PCR 法,研究博落回提取物对猪应激和正常细胞 IgG 和 SOD mRNA 表达的影响,探讨博落回提取物对猪细胞内源 IgG、SOD mRNA 的诱导作用,为博落回提取物对猪抗病营养作用机理的研究提供新的试验证据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪胚胎背部皮肤成纤维细胞为云南农业大学动物营养实验室冷冻保存。

本试验使用博落回提取物总生物碱含量 $\geq 60\%$,其中含血根碱 45%、白屈菜红碱 19%^[7]。土霉素为广州中邦生物科技有限公司产品。

基础培养液(DMEM/F12 细胞培养液)、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、胰酶,均购自美国 Gibco 公司;LPS 购于美国 Sigma 公司;IgG 含量采用全自动生化分析仪检测;乳酸脱氢酶、溶菌酶、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;总 RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;反转录 PCR 试剂盒(PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser)及荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II)均购自日本 TaKaRa 公司。

利用 Primer 5.0 软件进行引物设计,并用 NC-

BI 数据库中的 Blast 工具确认引物的特异性,选用在猪机体内稳定表达的 3 个基因 β -肌动蛋白(ACTB)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、TATA 框结合蛋白(TATA box binding protein, TBP)作为看家基因,引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列及参数见表 1。

1.2 LPS 对细胞的抑制率的检测

采用 6 孔板和基础培养液细胞,收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入 100 μ L,铺板使待测细胞调密度至 1 000 ~ 10 000 个/孔。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育,至细胞单层铺满孔底。加入 LPS 使其终浓度为 5、10、15 μ g/mL,每个处理 3 个重复,每孔为 1 个重复。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育 12 ~ 48 h,倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μ L 甲基噻唑基四唑(MTT)溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h。终止培养,吸去孔内培养液。每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量吸光度(OD)值,同时设置调零孔(培养基+MTT+二甲基亚砷)和对照孔(细胞+相同浓度的药物溶解介质+培养基+MTT+二甲基亚砷)。观察细胞,计算细胞的抑制率。

$$\text{细胞的抑制率}(\%) = 100 \times (\text{对照孔 OD} - \text{培养后细胞 OD}) / \text{对照孔 OD}.$$

1.3 试验设计

细胞复苏培养后,传代培养,当细胞长满培养瓶时进行以下处理。

LPS 溶解于基础培养液中至终浓度为 10 μ g/mL,培育 12 h 后得到 LPS 应激细胞。

试验设计见表 2,正常细胞和应激细胞分别进行处理,对照组采用基础培养液,土霉素组在基础培养液中添加土霉素 50 μ g/mL(阳性对照组),博落回组在基础培养液中分别添加 50、100、150 ng/mL 的博落回提取物。每个处理 3 个重复,1 个孔为 1 个重复。各组细胞在 37 $^{\circ}$ C 的条件下培养 24 h 后,收集各孔细胞液,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。所有样品参测细胞的抑制率、IgG 和 SOD mRNA 表达量;应激细胞上清液进行应激参数的检测。

表 1 引物序列及参数

Table 1 Sequences and parameters of primers

| 基因 Genes | 序列 Sequences(5'—3') | 产物大小 Product size/bp | GenBank 登录号 GenBank accession No. |
|------------------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|
| 免疫球蛋白 G <i>IgG</i> | 上游:GCCTGGTCATTGGCTTCT 下游:TCTGGGTGTAGTGGTTGTGC | 222 | NM213828.1 |
| 超氧化物歧化酶 <i>SOD</i> | 上游:CAGGTCCTCACTTCAATC 下游:CAAACGACTTCCAGCAT | 254 | NM001190422.1 |
| 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i> | 上游:ACATCAAGAAGGTGGTGAAG 下游:ATTGTCGTACCAGGAAATGAG | 178 | AF017079.1 |
| β -肌动蛋白 <i>ACTB</i> | 上游:TCTGGCACCACACCTTCT 下游:TGATCTGGGTTCATCTTCTCAC | 114 | DQ178122 |
| TATA 框结合蛋白 <i>TBP</i> | 上游:GATGGACGTTTCGGTTTAGG 下游:AGCAGCACAGTACGAGCAA | 124 | DQ178129 |

表 2 试验设计

Table 2 The experimental design

| 组别 Groups | 细胞 Cells | 脂多糖 LPS | 博落回提取物 MC extracts | 土霉素 Oxytetracycline |
|--------------------------------------|-----------------|------------|-----------------------|------------------------|
| 对照 Control | 正常 Normal | | | |
| | 应激 Stressed | + | | |
| 博落回 MC/(ng/mL) | 50 正常 Normal | | + | |
| | 50 应激 Stressed | + | + | |
| | 100 正常 Normal | | + | |
| | 100 应激 Stressed | + | + | |
| 土霉素 Oxytetracycline/(μ g/mL) | 150 正常 Normal | | + | |
| | 150 应激 Stressed | + | + | |
| 50 | 正常 Normal | | | + |
| | 应激 Stressed | + | | + |

+ 表示进行该处理。

+ means carrying out the treatment.

1.4 应激参数的检测

严格按照说明书要求检测细胞培养液中 IgG、溶菌酶、NO 含量及 NOS、乳酸脱氢酶的活性。

1.5 *IgG* 和 *SOD* mRNA 表达量检测

用常规方法提取细胞总 RNA,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 抽提样品完整性。所提取的总 RNA 经紫外分光光度计检测。

以提取的总 RNA 反转录产物作为模板进行常规 PCR 反应,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

实时荧光定量 PCR 采用 Eva Green I 染料法,反应在 Bio-Rad CFX 96™ Real-Time PCR Systems

上进行。反应体系为 20 μ L: SsoFast™ EvaGREEN® Supermix (Bio-Rad, 美国) 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, 加灭菌去离子水至 20 μ L。样品分装于 96 孔板 (Bio-Rad, 美国) 中,将可透光盖 (Bio-Rad, 美国) 盖紧。反应条件为: 95℃、10 s; 95℃、5 s, 59℃、20 s, 72℃、15 s, 40 个循环。

1.6 数据处理与分析

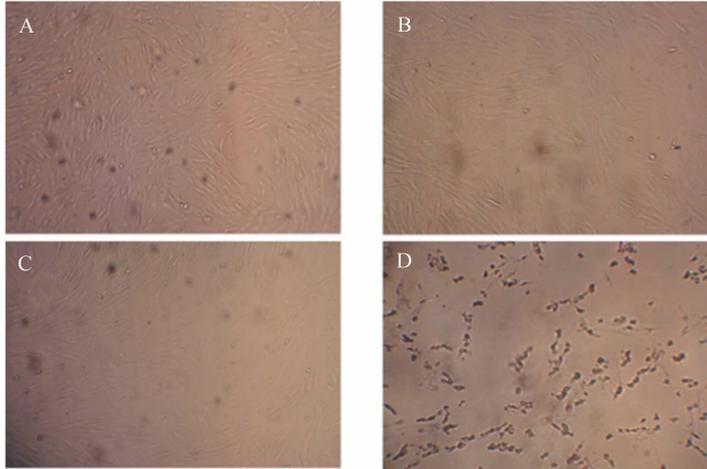
所有试验数据均采用 SPSS 13.0 软件处理和方差分析,用 Duncan 氏法进行多重比较,进行二次回归分析,试验结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 LPS 对细胞的抑制率

在添加 LPS 使其终浓度为 5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,观察细胞形态,正常细胞(图 1-A)和应激细胞(图 1-B)形态差异不大,但是应激细胞间隙有

所增大。加入博落回提取物后,细胞继续正常生长(图 1-C),未加入博落回提取物的细胞因过度免疫应激而死亡,形态发生改变(图 1-D)。不同浓度 LPS 在不同时间段对细胞的抑制率见表 3,本次试验条件下 LPS 最适宜浓度和培养时间分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 12 h。



A: 正常细胞, B: LPS 应激细胞, C: 加入博落回提取物之后的应激细胞, D: 死亡细胞。

A: normal cells, B: cells challenged by LPS, C: stressed cells after adding MC extracts, D: dead cells.

图 1 LPS 和博落回提取物对细胞的形态的影响

Fig. 1 Effects of LPS and MC extracts on cell modalities

表 3 不同浓度 LPS 在不同时间段对细胞的抑制率

Table 3 Inhibition rates of different concentrations of LPS on cells at different time points

%

| 时间 Time/h | LPS 浓度 LPS concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|--------------|--|------|------|
| | 5 | 10 | 15 |
| 12 | 20.5 | 17.8 | 29.0 |
| 24 | 32.8 | 55.9 | 64.0 |
| 36 | 54.4 | 77.8 | 84.6 |

2.2 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞应激参数的影响

由表 4 可见,经 LPS 刺激,在加入不同浓度博落回提取物之后,细胞培养液中 IgG 含量极显著高于对照组和土霉素组($P < 0.01$);土霉素组细胞培养液中 IgG 含量极显著高于对照组($P < 0.01$)。博落回组细胞培养液中溶菌酶含量极显著高于对照组($P < 0.01$);土霉素组与 150 ng/mL 博落回

组溶菌酶含量差异不显著($P > 0.05$),但是这 2 组溶菌酶含量显著高于 50 和 100 ng/mL 博落回组($P < 0.05$)。博落回组与土霉素组细胞培养液中乳酸脱氢酶活性极显著低于对照组($P < 0.01$),50 ng/mL 博落回组细胞培养液中乳酸脱氢酶活性显著低于另外 2 个博落回组及土霉素组($P < 0.05$)。博落回组 NO 含量及 NOS 活性极显著高于对照组和土霉素组($P < 0.01$)。

表 4 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞应激参数的影响

Table 4 Effects of MC extracts and oxytetracycline on stress parameters of cells challenged by LPS in pigs

| 项目 Items | 对照 Control | 博落回提取物 MC extracts/(ng/mL) | | | 土霉素 Oxytetracycline/ ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | | | | | 50 |
| | | 50 | 100 | 150 | 50 |
| 免疫球蛋白 G IgG/(mg/mL) | 5.60 \pm 0.05 ^{Cc} | 12.26 \pm 0.13 ^{Aa} | 12.44 \pm 0.14 ^{Aa} | 12.43 \pm 0.09 ^{Aa} | 10.43 \pm 0.13 ^{Bb} |
| 溶菌酶 LSZ/($\mu\text{g/mL}$) | 5.83 \pm 0.28 ^{Bc} | 12.33 \pm 0.58 ^{Ab} | 12.16 \pm 0.66 ^{Ab} | 13.66 \pm 0.76 ^{Aa} | 13.50 \pm 0.50 ^{Aa} |
| 乳酸脱氢酶 LDH/(U/L) | 128.90 \pm 5.40 ^{Aa} | 110.10 \pm 6.70 ^{Bc} | 121.20 \pm 5.40 ^{Bb} | 122.90 \pm 5.80 ^{Bab} | 120.00 \pm 6.40 ^{Bb} |
| 一氧化氮 NO/($\mu\text{mol/L}$) | 43.90 \pm 3.21 ^{Cc} | 65.43 \pm 3.15 ^{Aa} | 64.86 \pm 2.51 ^{Aa} | 61.93 \pm 2.45 ^{Aa} | 53.97 \pm 1.26 ^{Bb} |
| 一氧化氮合酶 NOS/(U/mL) | 14.60 \pm 0.45 ^{Cc} | 18.53 \pm 0.65 ^{Aa} | 18.40 \pm 0.70 ^{Aa} | 17.96 \pm 0.56 ^{ABa} | 16.77 \pm 0.65 ^{Bb} |

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

2.3 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞 IgG 和 SOD mRNA 表达量的影响

2.3.1 总 RNA 提取与反转录 PCR 产物

由图 2 可见, 其 18S、28S 条带清晰, 无 DNA 污染条带, 无明显降解条带。所提取的总 RNA 经紫外分光光度计检测 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 在 6 ~ 10, 纯度较高。

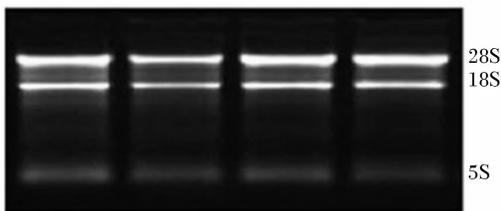


图 2 总 RNA 提取琼脂糖电泳图

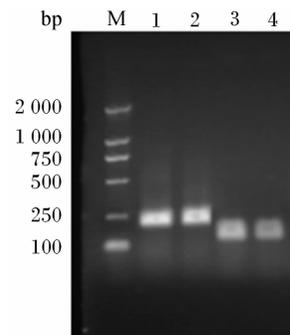
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results of extracted total RNA

由图 3 可见, 反转录 PCR 扩增产物条带清晰、明亮、无杂带, 说明引物可以特异性地扩增出目的产物。

2.3.2 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞 IgG mRNA 表达量的影响

由图 4 可见, 对正常细胞而言, 博落回组和土霉素组 IgG mRNA 表达量均有极显著的提高 ($P < 0.01$), 博落回组提高程度极显著高于土霉素组 ($P < 0.01$)。对应激细胞而言, 与对照组相比, 50 ng/mL 博落回组 IgG mRNA 表达量是对照组的

1.91 倍 ($P < 0.01$), 100 ng/mL 博落回组是对照组的 1.85 倍 ($P < 0.01$), 150 ng/mL 博落回组是对照组的 1.82 倍 ($P < 0.01$), 但 3 个博落回组间差异不显著 ($P > 0.05$)。土霉素组 IgG mRNA 表达量是对照组的 1.65 倍 ($P < 0.01$)。博落回组细胞中 IgG mRNA 表达量均极显著高于土霉素组 ($P < 0.01$)。应激细胞与正常细胞之间比较, 应激细胞 IgG mRNA 表达量均高于正常细胞, 对照组和 100 ng/mL 博落回组应激细胞与正常细胞差异极显著 ($P < 0.01$), 50 和 100 ng/mL 博落回组以及土霉素组应激细胞与正常细胞差异显著 ($P < 0.05$)。

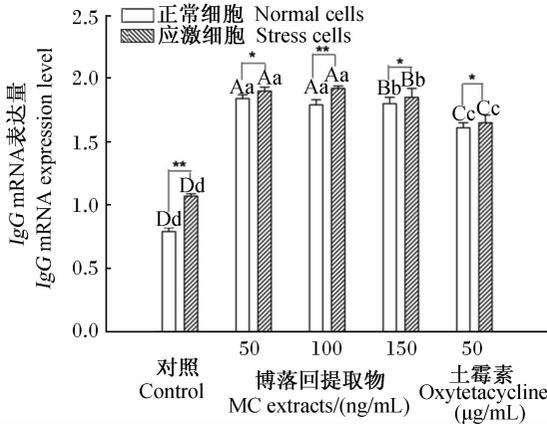


M: DNA 分子质量标准, 1 ~ 2: 超氧化物歧化酶, 3 ~ 4: 免疫球蛋白 G。

M: DNA molecular weight marker, lane 1 to 2: SOD, lane 3 to 4: IgG.

图 3 反转录 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis results of the RT-PCR



与对照组相比,数据柱形标注与之不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同的大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。应激细胞与正常细胞相比,标注*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。下图同。

Compared with the control group, data columns signed with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letters mean extremely significant difference ($P < 0.01$). Compared with normal cells, data columns of stressed cells signed with * mean significant difference ($P < 0.05$), and with ** mean extremely significant difference ($P < 0.01$). The same as below.

图4 博落回提取物对猪LPS应激细胞IgG mRNA表达量的影响

Fig. 4 Effects of MC extracts on IgG mRNA expression level of LPS challenged cells in pigs

2.3.3 博落回提取物对猪LPS应激细胞SOD mRNA表达量的影响

由图5可见,对正常细胞而言,博落回组和土霉素组SOD mRNA表达量均有极显著的提高($P < 0.01$),土霉素组提高程度极显著高于博落回组($P < 0.01$)。对应激细胞而言,50 ng/mL博落回组SOD mRNA表达量是对照组的1.39倍($P < 0.01$),150 ng/mL博落回组是对照组的1.40倍($P < 0.05$),100 ng/mL博落回组是对照组的1.32倍($P < 0.05$)。但3个博落回组间差异不显著($P > 0.05$)。土霉素组SOD mRNA表达量是对照组的1.69倍($P < 0.01$)。

应激细胞与正常细胞之间比较,对照组、50 ng/mL博落回组和土霉素组应激细胞SOD mRNA表达量极显著高于正常细胞($P < 0.01$),100和150 ng/mL博落回组应激细胞SOD mRNA表达显著高于正常细胞($P < 0.05$)。

对于应激细胞与正常细胞,土霉素组SOD mRNA表达量均极显著高于对照组及博落回组($P < 0.01$)。

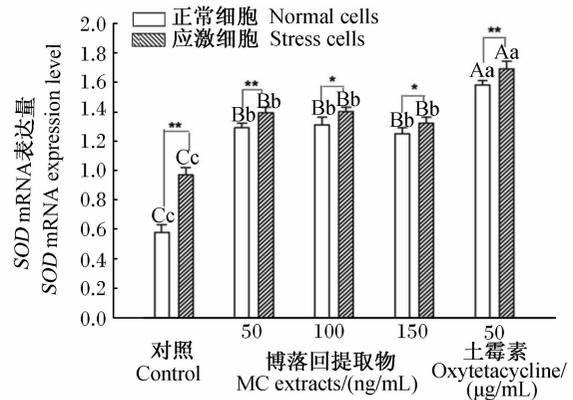


图5 博落回提取物对猪LPS应激细胞SOD mRNA表达量的影响

Fig. 5 Effects of MC extracts on SOD mRNA expression level of LPS challenged cells in pigs

3 讨论

3.1 猪LPS应激细胞的应激参数的变化

血液免疫球蛋白浓度是仔猪免疫性能和健康的重要标识之一。IgG具有免疫替代和免疫调节的双重治疗效果^[8]。人们试图通过多种途径来改变仔猪血液IgG浓度,从改善仔猪免疫性能和抗病力。本试验结果显示,细胞培养液中博落回组IgG含量极显著高于对照组和土霉素组($P < 0.01$),土霉素组也极显著高于对照组($P < 0.01$),说明博落回提取物和土霉素均能诱导细胞产生IgG,但博落回提取物增加IgG含量效果显著优于土霉素($P < 0.01$)。本试验结果表明,添加博落回提取物和土霉素均极显著提高了溶菌酶含量($P < 0.01$),可能缓解细胞免疫应激损伤。乳酸脱氢酶存在于组织细胞的胞质内,乳酸脱氢酶释放与细胞膜通透性和完整性有关,且释放量与细胞受损程度呈正相关,故可通过测定培养液中乳酸脱氢酶活性变化评定博落回提取物和土霉素是否损伤及损伤的程度。本试验结果表明,博落回组(50、100 ng/mL)及土霉素组细胞培养液中乳酸脱氢酶活性均极显著低于对照组($P < 0.01$),说明对细胞没有损伤或者损伤不大。有研究表明,通过减少白细胞来促进诱导型一氧化氮合酶(iNOS)产生,能保护肠道免受炎症损伤^[9]。iNOS基因在受

到细胞因子或 LPS 刺激时才表达, *iNOS* 基因表达能催化合成大量的 NO。LPS 能刺激巨噬细胞产生 NO^[10], 简华刚等^[11] 报道, LPS 剂量在 0.001 ~ 0.100 μg/mL 时, 体外培养大鼠肺微循环内皮细胞分泌 NO 的量随 LPS 剂量的增加而增多, 但当 LPS 剂量大于 1 μg/mL, 其含量不再增加。在本试验条件下, 土霉素组细胞培养液 NO 含量和 NOS 活性极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而不同浓度博落回组的细胞培养液 NO 含量和 NOS 活性均极显著高于对照组和土霉素组 ($P < 0.01$), 结果说明, 博落回提取物与缓解猪细胞应激损伤有关。上述结果提示, 适宜浓度博落回提取物作为营养调节剂可以改善猪细胞应激参数, 其作用机理有待进一步研究。

3.2 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞 IgG mRNA 的诱导表达

IgG 是由脾脏和淋巴结中的浆细胞产生的一种免疫球蛋白, 是介导体液免疫的主要抗体, 发挥着抗菌、抗病毒、抗毒素的免疫学效应。IgG 分泌细胞在口腔黏膜、胃肠道黏膜及生殖道均有存在^[12-13]。IgG 是动物自然感染和人工主动免疫后机体产生的主要抗体, 是动物机体抗感染的主力。在本试验中, 应激细胞中 IgG mRNA 表达量均高于正常细胞, 应激细胞中添加博落回对 IgG mRNA 表达量影响不显著 ($P > 0.05$), 说明博落回提取物能向上调节 IgG mRNA 表达, 土霉素组与对照组相比表达量也有所提高 ($P < 0.01$)。本试验中, IgG mRNA 表达得到了增强, 从而能产生更多的 IgG 抗体, 增强体液免疫。

3.3 博落回提取物对猪 LPS 应激细胞 SOD mRNA 的诱导表达

生物碱具有抗氧化能力, 生物碱能清除羟自由基使其能具有抗突变和抗基因毒性的作用^[14]。SOD、谷胱甘肽过氧化物酶一起构成体内重要的抗氧化系统, 保护细胞膜及细胞内的核酸免受自由基的攻击。本试验结果表明, 与对照组比较, 添加不同浓度博落回提取物和土霉素均能极显著提高细胞中 SOD mRNA 的表达量 ($P < 0.01$), 博落回提取物向上调节 SOD mRNA 表达的能力低于土霉素, 而博落回提取物各浓度之间差异不显著 ($P > 0.05$)。Slunská 等^[15] 通过细胞培养后发现, 血根碱、白屈菜黄碱、血根黄碱、白屈菜红碱不会增加细胞活性氧族产量, 并能降低过氧化氢 (H₂O₂) 含量引起的氧化应激反应, 显示出具有抗

氧化作用。本试验结果显示, 博落回提取物能诱导 SOD mRNA 表达, 改变 SOD 活性, 结果可能影响猪应激细胞的抗氧化能力。其作用机理仍有待研究。

4 结 论

博落回提取物可提高 LPS 应激细胞 IgG、NO 和 LSZ 的含量及 NOS 活性, 提高应激细胞和正常细胞 IgG 和 SOD mRNA 的表达量, 总体效果优于土霉素, 较好的添加浓度为 50 ~ 100 ng/mL。

参考文献:

- [1] KOSINA P, GREGOROVA J, GRUZ J, et al. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81 (8): 1006 - 1012.
- [2] ILARIA D S, GIUSEPPINA R, GIAN F Z, et al. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 78(11): 1374.
- [3] 肖俐, 易键, 赵静, 等. 博落回提取物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *中南药学*, 2011, 9(7): 485 - 489.
- [4] 张国洲, 尤民生. 博落回根杀虫有效成分分析及其活性测定 [J]. *安徽农业大学学报*, 2009, 36(1): 18 - 21.
- [5] VIEIRA S L, BERRES J, REIS R N, et al. Studies with sanguinarine like alkaloids as feed additive in broiler diets [J]. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 2008, 10(1): 67 - 71.
- [6] 饶华, 蔡鹏, 周锡红, 等. 博落回提取物对断奶仔猪生长性能的影响 [J]. *中国兽药杂志*, 2009, 43(11): 42 - 43.
- [7] 满意. 博落回提取物对断奶仔猪生长性能、血液免疫、氧化应激指标及相关基因表达的影响 [D]. 硕士学位论文. 昆明: 云南农业大学, 2012.
- [8] 何万涛, 舒永霞. 人免疫球蛋白外敷治疗皮肤过敏的疗效观察 [J]. *内蒙古中医药*, 2011(9): 103 - 105.
- [9] MCCAFFERTY D M, MUDGETT J S, SWAIN M G, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(3): 1022 - 1027.
- [10] 段慧琴, 乔健, 张永东, 等. LPS 对大鼠黏膜微血管内皮细胞分泌 NO 的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(9): 974 - 976.
- [11] 简华刚, 周继红, 朱佩芳, 等. 内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2000(8): 457.

- [12] 车传艳,赵立平,杨倩. 寡果糖对人源菌群仔猪肠道中 IgA 和 IgG 分泌细胞的影响[J]. 动物营养学报, 2007,19(1):50-55.
- [13] 刘胜兵,杨倩,姜平. 猪繁殖与呼吸综合征弱毒苗阴道免疫对母猪子宫 IgA 和 IgG 分泌细胞的影响[J]. 南京农业大学学报,2005,28(1):90-93.
- [14] MOURA D J, RICHTER M F, BOEIRA J M, et al. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities[J]. *Mutagenesis*,2007,20(4):293-302.
- [15] SLUNSKÁ Z, GELNAROVÁ E, HAMMEROVÁ J, et al. Effect of quaternary benzo[c] phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells[J]. *Toxicology in Vitro*,2010,24(3):697-706.

***Macleaya cordata* Extracts: Effects on Stress Parameters and mRNA Expressions of Immunoglobulin G and Superoxide Dismutase of Cells Challenged by Lipopolysaccharide in Pigs**

MAN Yi ZHANG Chunyong* CHEN Kelin LI Meiqian GUO Rongfu**

(Yunnan Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of *Macleaya cordata* (MC) extracts on stress parameters and mRNA expressions of immunoglobulin G (IgG) and superoxide dismutase (SOD) of cells challenged by lipopolysaccharide (LPS) in pigs. Embryo fibroblasts cells on the back of pigs were selected as the experimental material. The experiment was carried on normal cells and the stress model challenged by LPS. A basal culture medium was used in the control group, the basal culture medium supplemented with 50 µg/mL oxytetracycline was used in oxytetracycline group (negative control), and the basal culture medium supplemented with 50, 100 and 150 ng/mL MC extracts were used in MC groups, respectively. Contents of IgG, lysozyme (LSZ), nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS), lactate dehydrogenase (LDH) activity, as while as mRNA expression levels of IgG and SOD were determined. The results showed as follows: 1) contents of IgG, NO, NOS and LSZ in MC group were all significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$), and contents of IgG and LSZ in oxytetracycline group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). 2) For stressed and normal cells, IgG mRNA expression level in MC groups was significantly higher than that in the control group and oxytetracycline group ($P < 0.01$), and 50 and 150 ng/mL MC groups were significantly higher than 150 ng/mL MC group ($P < 0.01$). IgG mRNA expression level in oxytetracycline group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). IgG mRNA expression level of stressed cells was significantly higher than that of normal cells in 100 ng/mL MC group ($P < 0.01$). 3) For stressed and normal cells, compared with the control group, supplementation of 50, 100 and 150 ng/mL MC extracts significantly increased SOD mRNA expression level ($P < 0.01$). SOD expression level in oxytetracycline group was significantly higher than that in the control group and MC group ($P < 0.01$). SOD mRNA expression level of stressed cells was significantly higher that of normal cells ($P < 0.01$). In conclusion, MC extracts can increase contents of IgG, NO, NOS and LSZ of stressed cells, as well as IgG and SOD mRNA expression levels both in stressed and normal cells. The effects of MC are better than those of oxytetracycline, and the optimal level is 50 to 100 ng/mL. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(12):2507-2514]

Key words: *Macleaya cordata* extracts; cell culture; stress parameters; immunoglobulin G; superoxide dismutase

* Contributed equally

** Corresponding author, professor, E-mail: rongfug@163.com