

脂多糖对母兔下丘脑、卵巢、输卵管中 TLR4 及其相关细胞因子表达的影响

何自标¹§, 兰瑞霞¹§, 陈晨¹, 刘淑君¹, 石溢¹, 陈仕毅², 赖松家², 张明^{1*}

(1. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物遗传育种研究所, 成都 611130)

摘要: 旨在研究革兰阴性菌感染对母兔下丘脑、卵巢和输卵管中 TLR4 以及其下游炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 表达的影响。选取 36 只健康新西兰白兔, 4 只兔不作处理作为 0 h 组; 16 只兔作为 LPS 组, 按 0.5 mg · kg⁻¹ 体重耳缘静脉注射脂多糖(LPS), 对照组的 16 只兔注射等量的生理盐水作为对照组, 在注射后 0.0、1.5、3.0、6.0 和 12.0 h ($n=4$) 后收集下丘脑、卵巢和输卵管, 采用实时荧光定量 PCR 分析其 TLR4、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平, 以及采用 ELISA 测定 IL-1 β 和 IL-6 在组织中的浓度。结果显示: 下丘脑、卵巢和输卵管中均有 TLR4 的表达, 但 LPS 诱导后, TLR4 转录水平仅在卵巢中显著增加 ($P < 0.05$), 而 IL-1 β 和 IL-6 的转录水平在下丘脑、卵巢和输卵管中均显著增加 ($P < 0.05$), 但 IL-1 β 和 IL-6 对 LPS 免疫应激在不同器官存在差异: 下丘脑对 LPS 引起的免疫应激反应快, 持续时间长; 卵巢和输卵管的免疫应激反应慢, 持续时间短。结果表明: LPS 免疫应激可以上调 TLR4、IL-1 β 和 IL-6 在下丘脑中以及 IL-1 β 和 IL-6 在卵巢、输卵管中的表达量。

关键词: 脂多糖; 免疫细胞因子; TLR4; 输卵管; 卵巢; 下丘脑

中图分类号: S829.1; Q492.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)06-0910-08

Effect of LPS on the Expression of TLR4 and Related Cytokines in Oviduct, Ovary and Hypothalamus of Rabbits

HE Zi-biao¹§, LAN Rui-xia¹§, CHEN Chen¹, LIU Shu-jun¹, SHI Yi¹,
CHEN Shi-yi², LAI Song-jia², ZHANG Ming^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Institute of Animal Breeding and Genetics, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The aim of this study was to reveal the effect of LPS on expression level of TLR4, and downstream inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-6 in hypothalamus, oviduct and ovary. 36 healthy New Zealand female rabbits, 4 animals were non-treatment as 0.0 h, 16 animals were injected with LPS according to the dosage of 0.5 mg · kg⁻¹ body weight as LPS group, and other 16 ones were injected with saline (LPS carrier) as control group. The hypothalamus, ovary and oviduct were collected at 0.0, 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0 h after injection. The expression level of TLR4, IL-1 β and IL-6 were analyzed by real-time PCR and the concentration of IL-1 β and IL-6 were examined by ELISA. The results showed: TLR4 was expressed in all experimental tissue samples, but LPS induced the significant up-regulation of TLR4 mRNA only in the ovary ($P < 0.05$). And LPS significantly induced the expression level of IL-1 β and IL-6 in the hypothalamus, ovary and oviduct ($P < 0.05$), but the immunosuppressant of LPS had obviously different in three

收稿日期: 2014-01-14

基金项目: 国家人力资源和社会保障部留学人员科技活动项目; 国家兔产业技术体系; 四川农业大学“双支”项目

作者简介: 何自标(1987-)男, 河南新乡人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种方面研究, E-mail: 645312215@qq.com; 兰瑞霞(1989-), 女, 四川郫县人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种方面研究, E-mail: lrx0089@163.com。何自标和兰瑞霞共同为第一作者

* 通信作者: 张明, 教授, 硕士生导师, E-mail: zhm3000@163.com

organs. Namely, immunoresponse in the hypothalamus response to LPS was more sensitive and the duration of immunoresponse was longer than in the ovary and oviduct. According to the results we speculate :LPS immune stress can increase TLR4, IL-1 β , IL-6 expression in the hypothalamus and also increase expression of IL-1 β , IL-6 in the ovaries, and oviduct.

Key words: lipopolysaccharide (LPS); TLR4; immune cytokines; oviduct; ovary; hypothalamus

在家兔饲养中,由于革兰阴性菌感染引起的繁殖障碍,对兔产业发展带来了巨大的影响。脂多糖(LPS)是革兰阴性菌细胞壁的主要组成成分,注射LPS可以引起动物机体与革兰阴性菌感染相似的生理与病理过程^[1]。TLR4属于I型跨膜受体,其在先天性免疫和获得性免疫中具有重要作用^[2]。TLR4是革兰阴性菌及其LPS识别的主要受体^[3],它介导LPS免疫应激,促使肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、IL-6和IL-8等炎症因子的产生^[4],IL-1 β 能够促进B、T细胞的活化、增殖和分化,能够增强NK细胞的杀伤活性,刺激单核细胞和巨噬细胞产生IL-6和TNF- α ,同时IL-6也能负反馈调节IL-1 β 。IL-6与IL-1 β 通过对细胞的生长和分化的调节,影响B细胞、T细胞的细胞免疫功能^[5-6]。生殖系统开口于体表,更易受到感染,一些研究已证实革兰阴性菌感染导致母畜生殖障碍^[7-10]。M. Nishimura等^[11]在人类的卵巢、输卵管以及子宫中检测到了TLR1~10的表达,体外注射LPS能够诱导胚胎和子宫角中IL-1 β 的过表达,从而导致小鼠子宫的容受性改变致使着床失败^[12],静脉注射LPS能够诱导母鸡输卵管中TLR4表达量显著上调^[13],静脉注射LPS后,女性生殖道中IL-6表达量上调^[14]。但LPS对兔生殖器官及其下丘脑中TLR4、IL-1 β 和IL-6表达水平的影响尚未见报道。

本试验主要研究革兰阴性菌模式感染物LPS对家兔下丘脑、卵巢和输卵管中TLR4、IL-1 β 和IL-6的表达量是否有影响,为深入研究革兰阴性菌感染引起的繁殖障碍奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物

36只5~6月龄健康雌性新西兰白兔(体重为3.18 \pm 0.40 kg),其中,4只兔不处理作为0 h空白,16只兔按0.5 mg \cdot kg⁻¹剂量耳缘静脉注射LPS(抽提自:*E. coli* 055:B5, Sigma, 美国)作为LPS处理组,16只兔注射相应体积的生理盐水(LPS溶剂)作为对照组。分别于注射后0.0、1.5、3.0、6.0和

12.0 h($n=4$)用速眠新麻醉、放血,然后采集下丘脑、卵巢和输卵管组织,立即用于RNA抽提和总蛋白提取。

1.2 总RNA的提取与反转录

根据RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa公司,大连)说明书进行组织总RNA的提取。用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性,用核酸/蛋白质浓度测定仪(Beckman DU640, USA)检测其浓度。4 μ g总RNA在20 μ L反转录体系(4 μ L 5 \times PrimeScript Buffer, 2 μ L gDNA Eraser和1.6 μ g RNA, 1 μ L Prime Script RT Enzyme Mix, 1 μ L Oligo dT(50 μ mol \cdot L⁻¹), 4 μ L Random 6 mers (100 μ mol \cdot L⁻¹), 加RNase-free H₂O到20 μ L)中进行cDNA合成,具体步骤根据反转录试剂盒Prime Script RT reagent Kit(TaKaRa公司,大连)进行。

1.3 Real-time PCR

根据GenBank中GAPDH、TLR4、IL-1 β 和IL-6基因序列,设计引物(表1)。引物设计好后送至Invitrogen公司合成。12.5 μ L Real-time PCR反应体系(4.25 μ L dH₂O, 6.25 μ L 2 \times SYBR Premix EX Taq II, 0.5 μ mol \cdot L⁻¹上、下游引物和1 μ L cDNA)在Bio-Rad CFX9(Bio-Rad, USA)反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 然后执行熔解曲线测试程序。所有基因Real-time PCR扩增效率均通过标准曲线进行测试。

1.4 组织总蛋白的提取和浓度测定

在蛋白裂解液(20 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 5 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 1% Triton X-100, 10%甘油, 0.1% SDS, 1 mmol \cdot L⁻¹ PMSF)中将组织匀浆后, 4 $^{\circ}$ C下静置30 min, 14 000 r \cdot min⁻¹离心10 min后取上清。用Bio-Rad Protein assay试剂盒(Bio-Rad, USA)测定蛋白质浓度, 分装后于-80 $^{\circ}$ C保存。

1.5 组织蛋白中IL-1 β 和IL-6的浓度测定

按照IL-1 β 和IL-6的ELISA试剂盒(迪安生物公司, 南京)说明书进行IL-1 β 和IL-6蛋白的浓

表 1 引物信息与扩增条件

Table 1 Primer information and amplification condition

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	参考序列 Accession No.
<i>GAPDH</i>	F: TGT TTTGTGATGGGCGTGAA R: CCTCCACAATGCCGAAGT	56	NM_001082253
<i>TLR4</i>	F: GAGCACCTGGACCTTTCAAATAAC R: GAACTTCTAAACCACTCAGCCCTTG	57	NM_001082732
<i>IL-1β</i>	F: AAGAAGAACCCGTCCTCTGCAACA R: TCAGTCATACGTGCCAGACAACA	60	NM_001082201
<i>IL-6</i>	F: CTGAAGACGACCACGATCCA R: AAGGACACCCGCACTCCAT	57	NM_001082064

度检测。每个标准品和样本测定 2 次。然后根据曲线计算样本中 IL-1 β 和 IL-6 的浓度,并将所有样品总蛋白浓度校正到 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

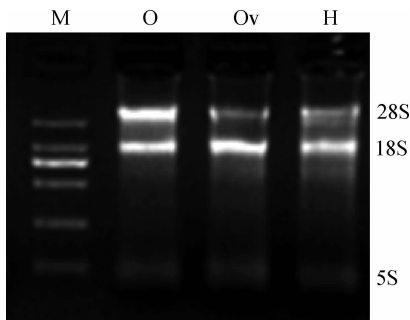
1.6 数据分析

所有基因扩增效率为 95%~105%,根据 Bio-Rad CFX Manager 软件,以 0 h 为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达水平,数据以“Mean \pm SEM”表示。注射后所有时间点数据采用 SPSS 21.0 软件进行 One-way ANOVA 方差分析,并用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取结果

提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1)检测和浓度测定,结果表明:总 RNA 降解少,能满足 Real-time PCR 试验要求。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; O. 卵巢; Ov. 输卵管; H. 下丘脑

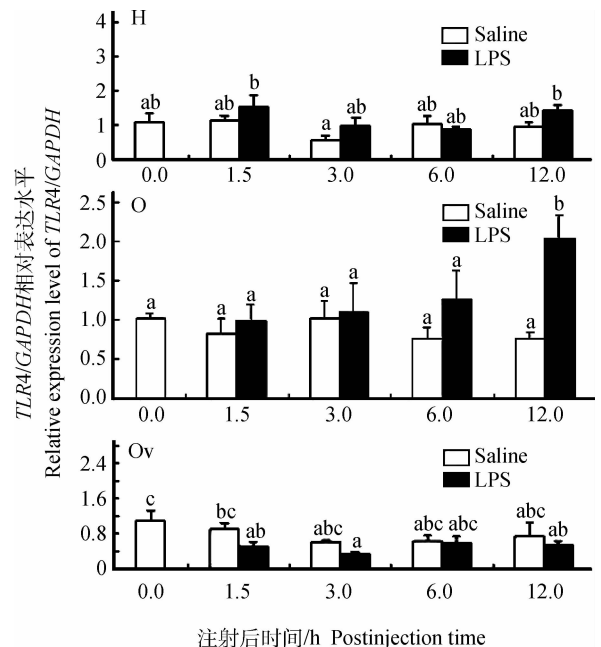
M. DL 2000 marker; O. Ovary; Ov. Oviduct; H. Hypothalamus

图 1 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electropherogram of total RNA

2.2 LPS 对 *TLR4* mRNA 在输卵管、卵巢和下丘脑中表达的影响

生理盐水或 LPS 注射不同时间后,下丘脑、卵巢和输卵管中 *TLR4* 转录水平见图 2。在对照组兔下丘脑、卵巢和输卵管中,*TLR4* 表达水平随时间无显著变化($P > 0.05$)。在 LPS 组中,下丘脑中 *TLR4* 的转录水平在注射后 12.0 h 内无显著变化;



a, b, c, d. 差异显著 ($P < 0.05$); H. 下丘脑; O. 卵巢; Ov. 输卵管。下同

a, b, c, d. Means significant difference ($P < 0.05$); H. Hypothalamus; O. Ovary; Ov. Oviduct. The same as below

图 2 处理后不同时间 *TLR4* mRNA 在下丘脑、输卵管、卵巢上的相对表达水平Fig. 2 Relative expression level of *TLR4* mRNA in hypothalamus, ovary and oviduct at different time after saline or LPS-injection

与 0.0 h 相比,卵巢中 *TLR4* 的转录水平在 LPS 注射后 12.0 h 显著升高($P < 0.05$),而且也显著高于对应时间点上的对照组($P < 0.05$);在输卵管,与 0.0 h 相比,*TLR4* 的转录水平在 LPS 注射后 1.5 h 和 3.0 h 显著降低($P < 0.05$),6.0 h 后略上升,到 12.0 h 后再次显著降低($P < 0.05$),但 LPS 组和对照组对应时间点上的 *TLR4* 转录水平差异不显著($P > 0.05$)。结果表明:注射生理盐水没有引起下丘脑、卵巢和输卵管中 *TLR4* 转录水平的变化;LPS 对下丘脑和输卵管中 *TLR4* 的转录没有影响,但能促进 *TLR4* 在卵巢中的转录。

2.3 LPS 对输卵管、卵巢、下丘脑中 *IL-1 β* 表达水平的影响

注射生理盐水或 LPS 不同时间后,下丘脑、卵巢和输卵管中 *IL-1 β* 的转录水平见图 3。在对照组下丘脑、卵巢和输卵管中 *IL-1 β* 转录水平随时间无显著变化($P > 0.05$)。在 LPS 组下丘脑中 *IL-1 β* 转录水平,与 0.0 h 相比,在注射 LPS 后 1.5 和 3.0 h 后分别显著增加了约 290 和 125 倍($P < 0.05$),到 6.0 h 下降,至 12.0 h 后再次显著增加($P < 0.05$);在卵巢中,注射 LPS 后 1.5、3.0、6.0 和 12.0 h, *IL-1 β* 转录水平显著高于 0.0 h($P < 0.05$),且增加的倍数分别约为 20、48、30 和 70,而且在注射后 3.0、6.0 和 12.0 h 后,LPS 组中 *IL-1 β* 转录水平显著高于对照组($P < 0.05$);在输卵管中,注射 LPS 6 h 后 *IL-1 β* 转录水平显著增加,同时显著高于相应时间点的对照组($P < 0.05$)。结果表明,LPS 引起了下丘脑、卵巢和输卵管中 *IL-1 β* 转录水平的增加,但 3 个器官对 LPS 免疫应激的反应不一样:下丘脑反应迅速,卵巢次之,输卵管的免疫应激反应最慢。

注射生理盐水或 LPS 不同时间后,下丘脑、卵巢和输卵管组织中 *IL-1 β* 的浓度见图 4。在对照组中,3 个器官中 *IL-1 β* 浓度在注射前、后均没有显著变化($P > 0.05$),在下丘脑、卵巢和输卵管中的浓度: 5.27 ± 0.67 、 4.54 ± 0.73 和 4.19 ± 0.45 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。下丘脑在注射 LPS 后 1.5、3.0、6.0 和 12.0 h, *IL-1 β* 浓度显著增加,同时显著高于对应时间的对照组($P < 0.05$),注射后 1.5~6.0 h 缓慢上升,6.0~12.0 h 缓慢回降,但是注射后 12.0 h 与注射前相比 *IL-1 β* 浓度显著增加;LPS 组的卵巢中, *IL-1 β* 浓度从 1.5~12.0 h,经历了增加、降低到恢复的过程,即在注射后 1.5 和 3.0 h, *IL-1 β* 浓度持续显著增加($P < 0.05$),然后到 6.0 h 显著下降,但

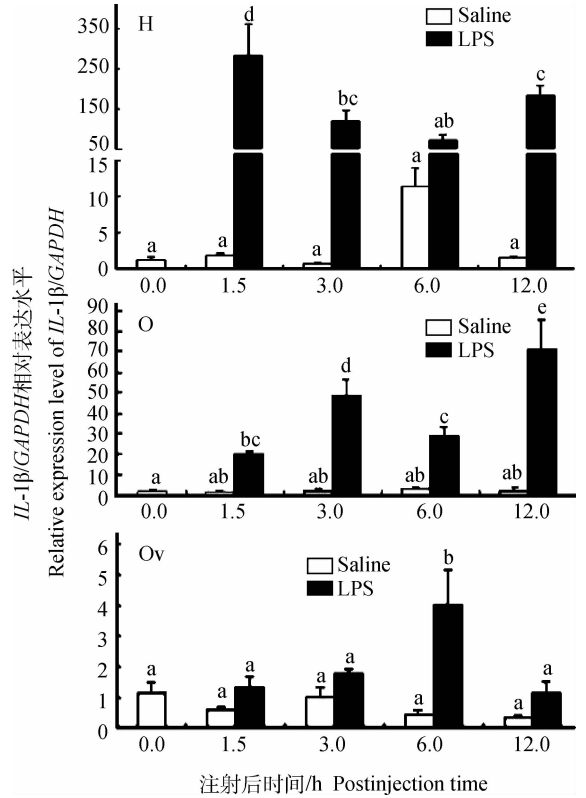


图 3 处理后不同时间 *IL-1 β* 在下丘脑、卵巢、输卵管上的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression level of *IL-1 β* in hypothalamus, ovary and oviduct at different time after saline or LPS-injection

仍显著高于 0.0 h ($P < 0.05$);在输卵管中,LPS 注射后 1.5 和 6.0 h, *IL-1 β* 浓度显著的高于对照组 ($P < 0.05$)和注射前 ($P < 0.05$),同时注射后 1.5 h 显著高于注射后 6.0 h ($P < 0.05$)。结果表明:LPS 同样引起了 *IL-1 β* 蛋白在下丘脑、卵巢和输卵管中的表达,而且不同器官中 *IL-1 β* 的表达或募集能力存在差异。

2.4 LPS 对输卵管、卵巢、下丘脑中 *IL-6* 的表达水平的影响

生理盐水或 LPS 注射不同时间后,下丘脑、卵巢和输卵管中 *IL-6* 的表达水平见图 5。对照组中,下丘脑、卵巢和输卵管中 *IL-6* 转录水平随时间无显著变化($P > 0.05$)。输卵管、卵巢、下丘脑在注射 LPS 后 1.5~3.0 h, *IL-6* 转录水平显著高于 0.0 h ($P < 0.05$),但不同器官对 LPS 免疫应激的反应时间和持续时间存在差异。在下丘脑中,LPS 注射 1.5 h 后 *IL-6* 转录水平显著增高并达到峰值 ($P < 0.05$),峰值时与 0.0 h 相比大约增加了 350 倍,然后显著降低并维持到注射后 12.0 h,但在 LPS 注射

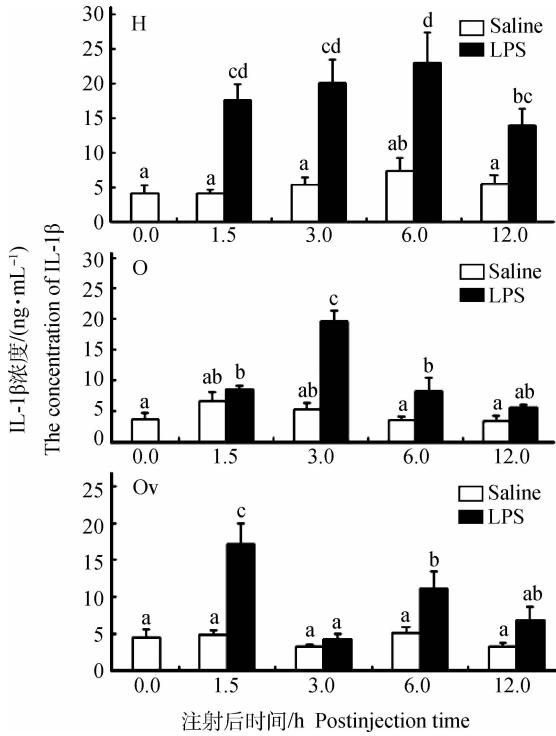


图4 IL-1 β 蛋白在下丘脑、卵巢、输卵管中的浓度

Fig. 4 The concentration of IL-1 β in hypothalamus, ovary and oviduct

后的3.0~12.0 h, *IL-6*的转录水平仍显著高于0.0 h和对应时间的对照组($P < 0.05$); 在卵巢中, LPS注射后1.5~3.0 h, *IL-6*转录水平持续的显著性升高($P < 0.05$), 并在3 h达到峰值, 峰值时与0.0 h相比约增加了315倍, 然后在6.0~12.0 h显著降低($P < 0.05$)并恢复到与对照组无显著差异的水平($P > 0.05$); 在输卵管中, LPS注射后*IL-6*的转录变化趋势与卵巢一致, 在注射后1.5~3.0 h持续增加并达到峰值($P < 0.05$), 峰值时与0.0 h相比增加了约470倍, 然后在6.0和12.0 h显著降低($P < 0.05$)并恢复到与对照组无显著差异的水平($P > 0.05$)。结果表明: LPS显著诱导了下丘脑、卵巢和输卵管中*IL-6*的高表达, 在下丘脑中, 免疫应激诱导的*IL-6*转录反应迅速, 但增加幅度相对较小, 持续时间较长; 而在卵巢和输卵管中, LPS免疫应激引起的*IL-6*转录反应缓慢, 持续增高后很快降低。

生理盐水或LPS注射不同时间后, 下丘脑、卵巢和输卵管组织中*IL-6*的浓度见图6。对照组中, 下丘脑(85.70 ± 21.79) ng·mL⁻¹、卵巢(72.13 ± 16.58) ng·mL⁻¹和输卵管(68.49 ± 10.25) ng·mL⁻¹组织, *IL-6*的浓度随时间无显著变化($P > 0.05$)。在下丘脑中, LPS注射12.0 h后,

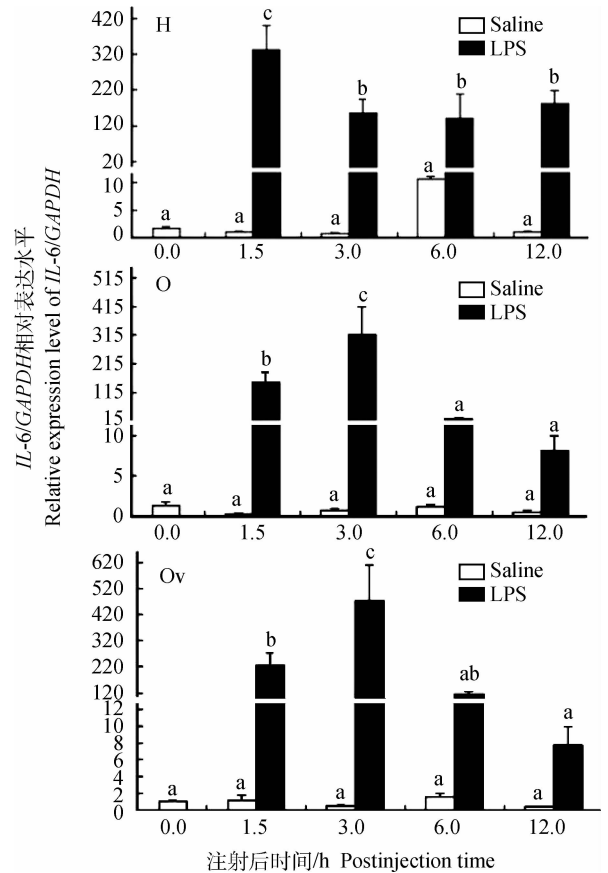


图5 处理后不同时间*IL-6* mRNA在下丘脑、卵巢、输卵管上的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression level of *IL-6* mRNA in hypothalamus, ovary and oviduct at different times after saline or LPS-injection

*IL-6*的浓度(158.07 ± 35.60) ng·mL⁻¹)显著增加, 高于0.0 h (101.62 ± 15.96) ng·mL⁻¹)和对应时间点的对照组(74.52 ± 6.00) ng·mL⁻¹); 在卵巢中, LPS注射6.0 h后, *IL-6*的浓度(195.91 ± 24.33) ng·mL⁻¹)显著增加, 并高于0.0 h (96.21 ± 20.33) ng·mL⁻¹)和对应时间点的对照组(81.80 ± 8.73) ng·mL⁻¹), 随后显著降低并恢复到与对照组相比差异不显著; 在输卵管中, LPS注射6.0 h后, *IL-6*的浓度(130.73 ± 23.88) ng·mL⁻¹)显著高于0.0 h (78.65 ± 5.62) ng·mL⁻¹)和对应时间点的对照组(69.61 ± 10.06) ng·mL⁻¹), 随后显著降低并恢复到与对照组差异不显著。结果表明, LPS同样引起了*IL-6*蛋白在3个器官中的表达或募集。

3 讨论

LPS是革兰阴性菌的细胞壁成分, 机体在受到

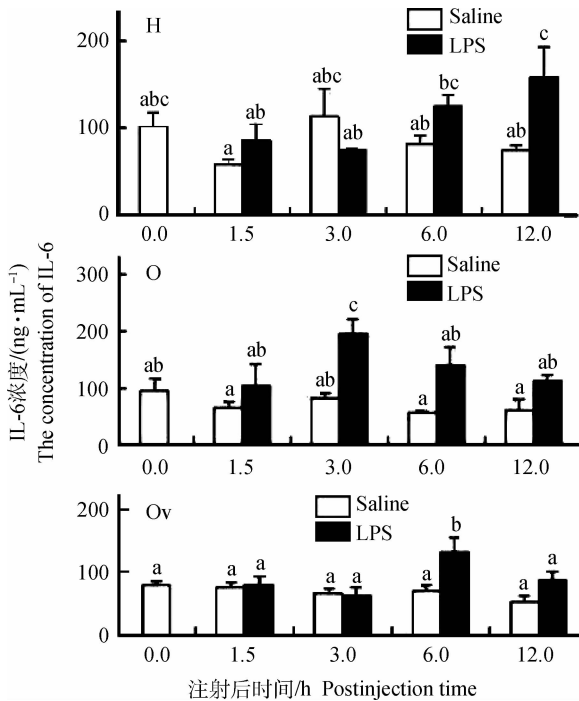


图 6 IL-6 蛋白在下丘脑、卵巢、输卵管中的浓度

Fig. 6 The concentration of IL-6 in hypothalamus, ovary and oviduct

LPS 刺激后,会产生炎症反应,引起下游炎症细胞因子 $IL-1\beta$ 和趋化因子 $IL-6$ 的产生,从而进一步激发机体细胞免疫功能。通过神经-内分泌-免疫网络,可能对控制动物繁殖机能的下丘脑-垂体-性腺轴调节系统产生影响。LPS 刺激后使机体产生免疫应激,免疫应激导致动物生长抑制,饲料利用率降低,同时也会影响雌性动物的妊娠,自然流产患者的 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-8$ 等较正常妊娠者明显升高^[16]。Y. Ma 等^[17] 研究结果表明,存在 TLR4 的胎盘细胞可能在母胎接口调节先天免疫反应,下游炎症因子又可以反馈调节 TLR4 的表达。

研究表明,LPS 能够诱导 $TLR2$ 、 $TLR4$ 和 $IL-1\beta$ 在鸡的输卵管各个部位表达上调^[13],T. Darville 等^[18] 证明在输卵管生殖道感染中 $TLR2$ 是必须的,而非 $TLR4$,敲除 $TLR2$ 后输卵管中 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 的表达量与空白对照组相比分泌量明显下降,而敲除 $TLR4$ 后 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 的分泌量与空白组相比明显上调,并且 $TLR4$ 与 LPS 结合有可能被其他 $TLRs$ 下调。本研究 $TLR4$ 在输卵管中的表达与注射前相比表达量略有降低,以此推断其他的 $TLRs$ 对 $TLR4$ 与 LPS 的结合可能有一定的抑制作用(图 2H)。并且有研究证明人的输卵管具有很微妙的微环境,具有自我保护机制^[19]。可能是由于哺乳动物

输卵管微环境的因素,导致 LPS 刺激后 $TLR4$ 的表达量基本维系不变。Y. Yoshimura 等^[20] 证明 $TLR4$ 、 $IL-1\beta$ 在鸡的卵巢受到 LPS 刺激后表达量明显升高;F. Deng 等^[21] 发现,LPS 刺激的人滋养细胞中 $TLR4$ 的表达高于正常,从而导致滋养细胞凋亡并引发流产。研究证明,LPS 能够诱导蛋鸡输卵管、阴道^[13] 和睾丸^[22] 中 $TLR4$ 表达量的增加。本研究 $TLR4$ 在 LPS 刺激后近卵巢中表达量有所升高,说明 LPS 能够诱导 $TLR4$ 在卵巢中的表达上调。在下丘脑中通过 $TLR4$ 与 $CD14$ 也能够识别 LPS,并且通过 $NF-\kappa B$ 通路引起下游免疫细胞因子的表达^[23]。本研究也证明 $TLR4$ 在下丘脑中有表达,但注射 LPS 后下丘脑中 $TLR4$ 的表达没有显著增加,但下丘脑中 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 的表达显著增加,结果表明,下丘脑中 $TLR4$ 同样介导了 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 的表达。

越来越多的试验证明 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 在输卵管、卵巢、下丘脑中都有表达。 $IL-6$ 能够下调 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 的生成。T. Nii 等^[24] 研究发现给产蛋期或换羽期的健康母鸡 LPS 诱导后的 3 及 6 h 后引起阴道内的 $IL-1\beta$ 表达的上调及子宫中 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的上调。输卵管与卵巢自身都有一种自我保护机制,本研究同样证实 LPS 显著的促进了 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 在输卵管、卵巢中的转录水平和蛋白水平的表达,但不同器官对 LPS 的免疫应激反应程度不同。在下丘脑中 LPS 引起的 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的转录与蛋白表达响应快,持续时间长,可能因为下丘脑在正常生理状况下,难以受到内毒素的免疫应激,因此对免疫应激反应灵敏,从而使下丘脑中 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的表达水平具有一定的延时效应。研究证明,下丘脑灌入 LPS,能够刺激小鼠下丘脑中 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 表达量升高,下丘脑通过神经-内分泌免疫网络,导致机体发热量增加^[25]。J. J. Klir 等^[26] 也证明 LPS 能刺激小鼠下丘脑 $IL-1\beta$ 的表达,能正向调节 $IL-6$ 的分泌。在卵巢和输卵管中,LPS 注射引起的卵巢 $IL-1\beta$ 转录增加反应比输卵管迅速(1.5 h vs 6.0 h),而且增加的幅度(70 倍 vs 4.5 倍)与持续时间(12 h vs 6 h)也比输卵管长,可能因为卵巢的周期性变化以及排卵等,使卵巢的免疫应激反应更加强烈,M. Abdelsalam 等^[27] 研究结果显示,母鸡在注射 LPS 后的 3~6 h,其卵巢的卵泡膜、颗粒细胞和间质细胞 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 水平表达量均显著上升,而 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的蛋白质水平在 LPS 诱导 12 h 后均显著增加。结合本研究结果进一步论证了,卵巢有表达促

炎细胞因子和趋化因子的能力,在 LPS 诱导下募集上调。已有研究证明,卵巢在卵泡发育、排卵过程中,卵巢 TLR4 表达会自动上调^[28]。

参考文献:

- [1] LIH, RUAN X Z, POWIS S H, et al. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells; Evidence for a PPAR- γ -dependent mechanism [J]. *Kidn Int*, 2005, 67(3): 867-874.
- [2] AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors; critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(8): 675-680.
- [3] DOYLE S L, JEFFERISE C A, O'NEILL L A. Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NF κ B activation by lipopolysaccharide [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 23496-23501.
- [4] ANGELONE D F, WESSELS M R, COUGHLIN M, et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF- α production *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pedia Res*, 2006, 60(2): 205-209.
- [5] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 134-146.
- [6] SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells; IL-6 suppresses IL-1 and TNF [J]. *Blood*, 1990, 75(1): 40-47.
- [7] ROMERO R, ESPINOZA J, GONCALVES L F, et al. Inflammation in preterm and term labour and delivery [J]. *Semi Fet Neon Med*, 2006, 11(5): 317-326.
- [8] FAZELI A, BRUCE C, ANUMBA D O. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(5): 1372-1378.
- [9] SHELDON I M, CRONIN J, GOETZE L, et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(6): 1025-1032.
- [10] PIOLI P A, AMEIL E, SCHAEFER T M, et al. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 5799-5806.
- [11] NISHIMURA M, NAITO S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 886-892.
- [12] DEB K, CHATURVEDI M M, JAISWAL Y K. Gram-negative bacterial LPS induced poor uterine receptivity and implantation failure in mouse; alterations in IL-1 β expression in the preimplantation embryo and uterine horns [J]. *Infect Disa Obst Gynec*, 2005, 13(3): 125-133.
- [13] OZOE A, ISOBE N, YOSHIMURA Y. Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct [J]. *Int J Immunopathol*, 2009, 127(3): 259-268.
- [14] WIRA C R, GRANT-TSCHUDY K S, CRANE-GODREAU M A. Epithelial cells in the female reproductive tract; a central role as sentinels of immune protection [J]. *Am J Reprod Immun*, 2005, 53(2): 65-76.
- [15] SOMMERC, KRESS M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain; peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia [J]. *Neurosci Let*, 2004, 361(1): 184-187.
- [16] JOHNSON R W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines; an integrated view [J]. *J Anim Sci*, 1997, 75(5): 1244-1255.
- [17] MA Y, KRIKUN G, ABRAHAMS V M, et al. Cell Type-specific expression and function of toll-like receptor 2 and 4 in human placenta; implications in fetal infection [J]. *Placenta*, 2007, 28(10): 1024-1031.
- [18] DARILLE T, O'NEILL J M, ANDREWS C W, et al. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection [J]. *J Immun*, 2003, 171(11): 6187-6197.
- [19] LIU L P, CHAN S T, HO P C, et al. Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(6): 1613-1619.
- [20] YOSHIMURA Y, OHASHI H, SUBEDI K, et al. Effects of age, egg-laying activity, and Salmonella-inoculation on the expressions of gallinacin mRNA in the vagina of the hen oviduct [J]. *J Reprod Dev*, 2006, 52(2): 211-218.
- [21] DENG F, HAN F, WU C. Expression and immune effect of toll-like receptor 4 in human trophoblast cells [J]. *Med Sci*, 2009, 29(3): 359-362.
- [22] ZHANG M, NII T, ISOBE N, et al. Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of roosters [J]. *Poult Sci*, 2012, 91(8): 1997-2003.
- [23] DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO

- SOUSA C E, TAMURA E K, et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF-kB pathway[J]. *J Pineal Res*, 2010, 49(2):183-192.
- [24] NII T, SONODA Y, ISOBE N. Effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines and the subsequent recruitment of immunocompetent cells in the oviduct of laying and molting hens[J]. *Poult Sci*, 2011, 90(10):2332-2341.
- [25] KLIR J J, ROTH J, SZELENYI Z, et al. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1993, 265(3):512-517.
- [26] KLIR J J, MCCLELLAN J L, KLUGER M J. Interleukin-1 beta causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1994, 266(6):1845-1848.
- [27] ABDELSALAM M, ISOBE N, YOSHIMURA Y. Effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines and influx of leukocytes in the hen ovary[J]. *Poult Sci*, 2011, 90(9):2054-2062.
- [28] LIU Z, SHIMADA M, RICHARDS J A S. The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation[J]. *J Assis Reprod Genet*, 2008, 25(6):223-228.

(编辑 程金华)