

脂多糖刺激对断奶仔猪脾脏炎症信号通路关键基因表达的影响

汪 洋 李先根 刘玉兰 朱惠玲 王秀英*

(武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室,武汉 430023)

摘 要: 本试验旨在研究脂多糖(LPS)刺激后不同时间断奶仔猪脾脏 Toll 样受体 4(TLR4)和核苷酸结合寡聚域受体(NOD)炎症信号通路关键基因表达的变化。选择 42 头体重为(7.1±0.9) kg 的杜×长×大断奶仔猪,按注射 LPS 之前(0 h)和注射 LPS 后不同时间点(1、2、4、8、12、24 h)随机分为 7 个处理,每个处理 6 头猪。预饲 14 d 后,腹腔注射 100 μg/kg BW 的 LPS,分别于注射 LPS 之前和注射 LPS 后不同时间点,将仔猪麻醉屠宰,取血液和脾脏样品,测定血细胞分类计数和脾脏炎症信号通路关键基因及炎症相关基因的 mRNA 表达量。结果表明:LPS 刺激导致部分血细胞分类计数发生显著的变化($P<0.05$);使 TLR4 和 NOD 炎症信号通路关键基因 mRNA 表达量显著上调($P<0.05$),且在 2~8 h 达到峰值;也导致肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、环氧合酶 2、热休克蛋白 70 mRNA 表达量显著升高($P<0.05$),且在 1~4 h 达到峰值。LPS 刺激 8~24 h 后,这些炎症相关基因均逐渐恢复至正常水平或略低于正常水平。总体来看,LPS 刺激激活了炎症信号通路,促进炎性细胞因子的表达,并随着时间的延长,这些基因呈现先上升、达到高峰后逐渐下降的变化。

关键词: 脂多糖;断奶仔猪;脾脏;炎症

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)08-3882-09

养猪生产中的各种不利因素常会引起猪只的应激反应,尤其在仔猪早期断奶阶段,断奶、饲料转换、环境变化、病原性等因素会导致仔猪产生应激^[1],出现如腹泻、采食量减少、生长迟缓等问题,造成经济损失。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁成分,作为典型的内毒素,可导致仔猪出现抽搐、发烧、呕吐等症状,也可引起机体各组织的炎症反应,常被用来建立急性免疫应激模型^[2-3]。Toll 样受体(TLRs)和核苷酸结合寡聚域受体(NODs)是调节先天免疫反应的 2 个重要蛋白家族,其中 Toll 样受体 4(TLR4)、核苷酸结合寡聚域受体 1(NOD1)和核苷酸结合寡聚域受体 2(NOD2)及其下游相关基因是炎症信号通路的重

要成员。在我们前期以 LPS 刺激构建的组织(如肠道、肝脏)损伤模型的研究中,LPS 刺激会导致机体组织中 TLR4 和 NOD 炎症信号通路关键基因的表达在短时间内显著上调,引发炎症反应,造成组织损伤^[2-3]。但是,这些研究仅集中于单个时间点,并没有研究不同时间点的动态表达。脾脏是全身最大的周围淋巴器官,内含大量的免疫细胞,如巨噬细胞和淋巴细胞,参与着机体的非特异性免疫和特异性免疫^[4]。本试验旨在研究 LPS 刺激后不同时间断奶仔猪脾脏炎症信号通路关键基因及炎症相关基因表达的变化,为缓解养猪生产中的应激问题提供新的思路。

收稿日期:2019-01-22

基金项目:湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队项目(T201508)

作者简介:汪 洋(1994—),男,湖北潜江人,硕士研究生,从事猪营养生理机能调控的研究。E-mail: 609671541@qq.com

* 通信作者:王秀英,助理实验师,E-mail: xiuyingdk@foxmail.com

1 材料与方法

1.1 试验设计

选择 42 头、体重为 (7.1 ± 0.9) kg 的杜×长×大断奶仔猪,按注射 LPS 之前(0 h)和注射 LPS 后不同时间点(1、2、4、8、12、24 h)随机分为 7 个处理,每个处理 6 头猪。各处理仔猪预饲 14 d 后,腹腔注射 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 LPS,分别于注射 LPS 之前和注射 LPS 后不同时间点取样品待测。

1.2 样品采集

血液样品于颈静脉采集,保存于 5 mL 乙二胺四乙酸(EDTA)管中置于冰上待测。采血后将仔猪麻醉屠宰,取脾脏样品置于冰上,将脾脏样品用冷的生理盐水冲洗后切成小块,立刻放置于液氮中速冻,然后转到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

1.3 试验材料

LPS 为大肠杆菌血清型 055:B5, Sigma 公司提供;注射时将 LPS 溶解于生理盐水溶液中,注射液中 LPS 含量为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按 0.2 mL/kg BW 注射,即 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW。

1.4 饲养管理

试验在武汉轻工大学猪营养与代谢实验室进行。猪舍温度 $25 \sim 27$ $^{\circ}\text{C}$,教槽料饲喂,自由采食和饮水。

1.5 测定指标与方法

1.5.1 血细胞分类计数

血细胞分类计数采用 Siemens ADVIA[®] 2120i 全自动血液分析仪测定。

1.5.2 mRNA 表达量测定

测定的指标包括 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因和炎症相关基因。引物序列参考 Zhang 等^[2]和 Wang 等^[5](表 1)。脾脏组织的 RNA 提取使用 RNAiso Plus(#9108, TaKaRa),提取完后用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性。根据 PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser(#RR047A, TaKaRa)说明书的指导,进行基因组 DNA 去除和 cDNA 合成。Real-time PCR 采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Tli RNaseH Plus) qPCR Kit(#RR420A, TaKaRa)。目的基因 mRNA 相对表达量的计算参照 Livak 等^[6]的方法,内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),并通过归一化法,以相对于注射 LPS 之前处理的表达量表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因 Genes | 引物序列 Primer sequences (5'—3') | 产物长度 Product length/bp | 序列号 Accession number |
|--|--|---------------------------|-------------------------|
| Toll 受体 4 <i>TLR4</i> | F:TCAGTTCTCACCTTCCTCCTG R:GTTTCATTCCTCACCCAGTCTTC | 166 | GQ503242.1 |
| 骨髓分化因子 88 <i>MyD88</i> | F:GATGGTAGCGGTTGTCTCTGAT R:GATGCTGGGGAACCTTTCTTC | 148 | AB292176.1 |
| 白介素受体相关激酶 1 <i>IRAK1</i> | F:CAAGGCAGGTCAGGTTTCGT R:TTCGTGGGGCGTGAGTGT | 115 | XM_003135490.1 |
| 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 <i>TRAF6</i> | F:CAAGAGAATACCCAGTCGCACA R:ATCCGAGACAAAGGGGAAGAA | 122 | NM_001105286.1 |
| 核苷酸结合寡聚域受体 1 <i>NOD1</i> | F:CTGTGCTCAACACCGATCCA R:CCAGTTGGTGACGCAGCTT | 57 | AB187219.1 |
| 核苷酸结合寡聚域受体 2 <i>NOD2</i> | F:GAGCGCATCCTCTTAACCTTTCG R:ACGCTCGTGATCCGTGAAC | 66 | AB195466 |
| 受体相互作用蛋白激酶 2 <i>RIPK2</i> | F:CAGTGTCCAGTAAATCGCAGTTG R:CAGGCTTCCGTCATCTGGTT | 206 | XM_003355027.1 |
| 核因子- κB <i>NF-κB</i> | F:AGTACCCTGAGGCTATAACTCGC R:TCCGCAATGGAGGAGAAGTC | 133 | EU399817.1 |
| 肿瘤坏死因子- α <i>TNF-α</i> | F:TCCAATGGCAGAGTGGGTATG R:AGCTGGTTGTCTTTCAGCTTCAC | 67 | NM_214022.1 |

续表 1

| 基因 Genes | 引物序列 Primer sequences (5'—3') | 产物长度 Product length/bp | 序列号 Accession number |
|--|---|---------------------------|-------------------------|
| 白细胞介素-1 β <i>IL-1β</i> | F:GCTAACTACGGTGACAACAATAATG R:CTTCTCCACTGCCACGATGA | 186 | NM_214055.1 |
| 白细胞介素-6 <i>IL-6</i> | F:AAGGTGATGCCACCTCAGAC R:TCTGCCAGTACCTCCTTGCT | 151 | JQ839263.1 |
| 环氧合酶 2 <i>COX2</i> | F:ATGATCTACCCGCCTCACAC R:AAAAGCAGCTCTGGGTCAAA | 284 | AY028583 |
| 热休克蛋白 70 <i>HSP70</i> | F:GCCCTGAATCCGCAGAATA R:TCCCCACGGTAGGAAACG | 152 | NM_001123127.1 |
| 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i> | F:CGTCCCTGAGACACGATGGT R:GCCTTGACTGTGCCGTGGAAT | 194 | AF017079.1 |

1.6 统计分析

数据分析采用 SPSS 22.0 软件进行独立样本 t 检验,1、2、4、8、12、24 h 分别与 0 h 比较,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。结果以平均值 \pm 标准误差表示。

2 结果

2.1 LPS 刺激对断奶仔猪血细胞分类计数的影响

由表 2 可知,与注射 LPS 之前(0 h)相比,LPS 刺激导致白细胞(1~4 h)、嗜中性粒细胞(1~4 h)、淋巴细胞(2~12 h)、单核细胞(2~24 h)、嗜酸性粒细胞(2~4 h)、嗜碱性粒细胞(4 h)、嗜中性粒细胞比例(2 h)、单核细胞比例(1~24 h)、红细胞分布宽度变异数(24 h)、血小板(12 h)、血小板容积比(12 h)显著降低($P < 0.05$);其中白细胞(12~24 h)、嗜中性粒细胞(8~24 h)、嗜酸性粒细胞(8~24 h)、嗜中性粒细胞比例(4~24 h)在后期显著上升($P < 0.05$),且高于正常水平。此外,LPS 刺激会导致淋巴细胞比例(2 h)、嗜碱性粒细胞比例(2 h)、红细胞(2 h)、血红蛋白(2~4 h)、血小板平均体积(12 h)、血小板分布宽度(8~24 h)显著升高($P < 0.05$);其中淋巴细胞比例(8~24 h)、嗜碱性粒细胞比例(8、24 h)显著降低($P < 0.05$),且低于正常水平。

2.2 LPS 刺激对断奶仔猪脾脏 TLR4 和 NOD 信号炎症通路关键基因及炎症相关基因 mRNA 表达量的影响

由表 3 可知,与注射 LPS 之前(0 h)相比,LPS 刺激导致 *TLR4* (8~12 h)、骨髓分化因子 88

(*MyD88*) (1~12 h)、白介素受体相关激酶 1 (*IRAK1*) (4~8 h)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (*TRAF6*) (1~4 h)、*NOD1* (2~12 h)、*NOD2* (1~8 h)、受体互作蛋白激酶 2 (*RIPK2*) (1~12 h)、核因子- κ B (*NF- κ B*) (1~4 h) mRNA 表达量显著上调($P < 0.05$)。这些基因的 mRNA 表达量在 2~8 h 达到峰值,8~24 h 逐渐恢复至正常水平或略低于正常水平。

与注射 LPS 之前(0 h)相比,肿瘤坏死因子- α (*TNF- α*) (1~4 h)、白细胞介素-1 β (*IL-1 β*) (1~12 h)、*IL-6* (1~4 h)、环氧合酶 2 (*COX2*) (1~12 h)、热休克蛋白 70 (*HSP70*) (2~4 h) mRNA 表达量在 LPS 刺激后也显著升高($P < 0.05$)。其中,*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*COX2* mRNA 表达量在 1 h 达到峰值,*IL-6* mRNA 表达量在 2 h 达到峰值,*HSP70* mRNA 表达量在 4 h 达到峰值,8~24 h 均逐渐恢复至正常水平或略低于正常水平。

3 讨论

脾脏在机体免疫-神经-内分泌网络中扮演着重要的角色,并且在滤血、造血和储血方面发挥着作用^[4]。脾脏与机体脏器的功能情况密切相关,在一些疾病(如肝炎病毒感染、肿瘤以及炎症性疾病等)的发生和发展过程中起到了重要作用^[7]。有研究表明,在抗感染过程中脾脏免疫细胞的活化和炎症因子的释放可导致机体严重的损伤^[4]。因此,研究病理状况下脾脏炎症相关因子的变化规律对于进一步了解脾脏在机体不同状态下功能的变化具有重要意义。

表 2 LPS 刺激对断奶仔猪血细胞分类计数的影响

Table 2 Effects of LPS challenge on blood cell differential counts of weaned piglets

| 项目 Items | 时间 Time/h | | | | | | | P 值 P-value | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 24 | 1 h vs 0 h | 2 h vs 0 h | 4 h vs 0 h | 8 h vs 0 h | 12 h vs 0 h | 24 h vs 0 h | |
| 白细胞 White blood cell/($\times 10^9/L$) | 13.09±1.06 | 9.24±1.48 | 3.36±0.42 | 4.33±0.45 | 14.43±1.53 | 18.52±1.92 | 21.85±0.80 | 0.049 | <0.001 | <0.001 | 0.469 | 0.019 | <0.001 | |
| 嗜中性粒细胞 Neutrophil/($\times 10^9/L$) | 4.57±0.71 | 2.28±0.53 | 0.57±0.09 | 1.90±0.23 | 10.56±1.22 | 14.15±1.96 | 13.64±1.01 | 0.036 | <0.001 | 0.005 | 0.001 | 0.003 | <0.001 | |
| 淋巴细胞 Lymphocyte/($\times 10^9/L$) | 7.83±0.63 | 6.48±1.00 | 2.65±0.45 | 2.26±0.22 | 3.39±0.47 | 3.71±0.17 | 7.36±0.27 | 0.249 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.642 | |
| 单核细胞 Monocyte/($\times 10^9/L$) | 0.34±0.04 | 0.21±0.07 | 0.04±0.00 | 0.06±0.02 | 0.07±0.01 | 0.06±0.01 | 0.12±0.03 | 0.094 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.006 | |
| 嗜酸性粒细胞 Eosinophilic granulocyte/ ($\times 10^9/L$) | 0.22±0.03 | 0.16±0.04 | 0.06±0.01 | 0.11±0.03 | 0.33±0.01 | 0.51±0.05 | 0.62±0.07 | 0.292 | 0.001 | 0.038 | 0.015 | <0.001 | <0.001 | |
| 嗜碱性粒细胞 Basophil/($\times 10^9/L$) | 0.04±0.01 | 0.04±0.01 | 0.03±0.01 | 0.02±0.01 | 0.03±0.01 | 0.05±0.01 | 0.03±0.00 | 0.658 | 0.282 | 0.013 | 0.213 | 0.782 | 0.300 | |
| 嗜中性粒细胞比例 Neutrophil percentage/% | 33.86±4.05 | 23.60±3.36 | 18.73±3.84 | 48.52±5.42 | 72.92±1.83 | 75.02±2.81 | 62.18±2.54 | 0.095 | 0.023 | 0.046 | <0.001 | <0.001 | 0.001 | |
| 淋巴细胞比例 Lymphocyte percentage/% | 60.84±3.84 | 71.35±3.91 | 77.10±3.87 | 47.78±5.52 | 23.58±1.84 | 21.27±2.59 | 33.90±2.30 | 0.088 | 0.013 | 0.066 | <0.001 | <0.001 | 0.001 | |
| 单核细胞比例 Monocyte percentage/% | 2.59±0.27 | 2.08±0.50 | 1.38±0.21 | 1.07±0.13 | 0.66±0.13 | 0.35±0.07 | 0.55±0.13 | 0.347 | 0.006 | 0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | |
| 嗜酸性粒细胞比例 Eosinophilic granulocyte percentage/% | 1.68±0.24 | 1.80±0.34 | 1.73±0.19 | 1.93±0.21 | 2.40±0.27 | 2.83±0.28 | 2.85±0.43 | 0.768 | 0.872 | 0.474 | 0.074 | 0.009 | 0.027 | |
| 嗜碱性粒细胞比例 Basophil percentage/% | 0.33±0.05 | 0.52±0.14 | 0.82±0.16 | 0.35±0.08 | 0.18±0.03 | 0.27±0.05 | 0.15±0.03 | 0.176 | 0.005 | 0.862 | 0.047 | 0.399 | 0.049 | |
| 红细胞 Red blood cell/($\times 10^{12}/L$) | 5.98±0.14 | 6.34±0.19 | 6.50±0.15 | 6.87±0.38 | 5.68±0.17 | 5.91±0.29 | 5.63±0.11 | 0.147 | 0.030 | 0.069 | 0.195 | 0.798 | 0.142 | |
| 血红蛋白 Hemoglobin/(g/L) | 116.11±3.19 | 122.00±3.44 | 126.33±1.36 | 133.00±5.56 | 109.40±3.09 | 115.33±4.67 | 110.75±1.31 | 0.244 | 0.027 | 0.014 | 0.174 | 0.889 | 0.304 | |

续表 2

| 项目 Items | 时间 Time/h | | | | | | | P 值 P-value | | | | | | |
|--|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 24 | 0 h vs 1 h | 0 h vs 2 h | 0 h vs 4 h | 0 h vs 8 h | 0 h vs 12 h | 0 h vs 24 h | |
| 红细胞压积 Hematocrit/% | 34.73±0.88 | 37.25±1.04 | 37.98±0.57 | 39.87±1.77 | 32.74±1.05 | 34.58±1.73 | 32.53±0.49 | 0.091 | 0.017 | 0.013 | 0.172 | 0.934 | 0.141 | |
| 红细胞平均体积 Mean corpuscular volum/fl | 58.11±0.91 | 58.82±1.25 | 58.57±0.84 | 58.23±1.38 | 57.72±1.01 | 58.55±0.92 | 57.85±0.85 | 0.647 | 0.735 | 0.940 | 0.783 | 0.750 | 0.865 | |
| 红细胞平均 血红蛋白 Mean corpuscular hemoglobin/pg | 19.39±0.28 | 19.28±0.43 | 19.50±0.38 | 19.50±0.58 | 19.30±0.38 | 19.55±0.30 | 19.70±0.38 | 0.833 | 0.815 | 0.852 | 0.851 | 0.711 | 0.542 | |
| 红细胞平均 血红蛋白浓度 Average hemoglobin concentration of erythrocyte/(g/L) | 334.11±1.64 | 327.83±2.04 | 333.00±3.42 | 334.17±3.06 | 334.20±1.68 | 334.17±3.28 | 340.50±2.10 | 0.032 | 0.749 | 0.986 | 0.971 | 0.987 | 0.046 | |
| 红细胞分布宽 度变异数 Red blood cell distri- bution width variation/% | 17.09±0.82 | 16.88±1.75 | 15.62±0.65 | 16.18±1.29 | 15.00±0.53 | 15.77±0.47 | 14.30±0.30 | 0.907 | 0.218 | 0.542 | 0.079 | 0.243 | 0.050 | |
| 血小板 Platelet/($\times 10^9$ /L) | 371.78±64.66 | 415.5±82.77 | 309.67±27.66 | 270.50±56.05 | 303.20±35.78 | 147.17±21.61 | 202.75±11.99 | 0.681 | 0.469 | 0.290 | 0.435 | 0.017 | 0.118 | |
| 血小板平均体积 Mean platelet volume/fl | 8.07±0.43 | 7.48±0.19 | 7.35±0.24 | 8.45±0.54 | 8.44±0.66 | 9.93±0.45 | 8.88±0.13 | 0.311 | 0.227 | 0.585 | 0.626 | 0.012 | 0.249 | |
| 血小板容积比 Platelet volume ratio/% | 0.28±0.04 | 0.31±0.06 | 0.23±0.02 | 0.22±0.04 | 0.25±0.02 | 0.14±0.02 | 0.18±0.01 | 0.719 | 0.253 | 0.284 | 0.493 | 0.011 | 0.106 | |
| 血小板分布宽度 Platelet distribution width/% | 65.70±1.77 | 63.78±2.05 | 67.78±1.84 | 70.58±1.96 | 73.58±2.04 | 82.57±3.35 | 76.28±1.76 | 0.496 | 0.444 | 0.093 | 0.013 | <0.001 | 0.004 | |

表3 LPS刺激对断奶仔猪脾脏炎症信号通路关键基因及炎症相关基因的mRNA表达量的影响
Table 3 Effects of LPS challenge on mRNA expression of key genes of inflammatory signaling pathway and inflammatory related genes in spleen of weaned piglets

| 项目 Items | 时间 Time/h | | | | | | | P 值 P-value | | | | | | |
|------------------------------------|-----------|--------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 24 | 0 h vs 1 h | 0 h vs 2 h | 0 h vs 4 h | 0 h vs 8 h | 0 h vs 12 h | 0 h vs 24 h | |
| Toll 受体 4 <i>TLR4</i> | 1.00±0.09 | 0.62±0.15 | 0.54±0.08 | 0.69±0.18 | 1.57±0.12 | 1.40±0.08 | 0.86±0.10 | 0.031 | 0.003 | 0.106 | 0.002 | 0.007 | 0.354 | |
| 骨髓分化因子 88 <i>Myl88</i> | 1.00±0.05 | 1.54±0.16 | 3.46±0.12 | 2.82±0.21 | 1.83±0.17 | 1.47±0.17 | 0.82±0.11 | 0.020 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.038 | 0.117 | |
| 白介素受体相关激酶 1 <i>IRAK1</i> | 1.00±0.05 | 0.91±0.12 | 1.03±0.07 | 1.34±0.13 | 1.29±0.12 | 0.81±0.09 | 0.66±0.07 | 0.526 | 0.720 | 0.016 | 0.028 | 0.066 | 0.004 | |
| 肿瘤坏死因子受体 相关因子 6 <i>TRAF6</i> | 1.00±0.06 | 1.37±0.14 | 1.77±0.14 | 1.60±0.24 | 0.93±0.04 | 0.74±0.08 | 0.56±0.07 | 0.018 | <0.001 | 0.013 | 0.375 | 0.019 | 0.001 | |
| 核苷酸结合寡聚域受体 1 <i>NOD1</i> | 1.00±0.08 | 1.05±0.05 | 2.07±0.09 | 2.10±0.14 | 1.55±0.07 | 1.41±0.19 | 0.77±0.25 | 0.646 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.039 | 0.272 | |
| 核苷酸结合寡聚域受体 2 <i>NOD2</i> | 1.00±0.07 | 2.37±0.19 | 3.35±0.43 | 3.14±0.45 | 1.79±0.26 | 1.44±0.24 | 0.73±0.06 | <0.001 | 0.003 | 0.005 | 0.004 | 0.125 | 0.040 | |
| 受体相互作用蛋白激酶 2 <i>RIPK2</i> | 1.00±0.05 | 11.82±1.45 | 28.16±2.94 | 9.95±1.57 | 3.46±0.25 | 2.56±0.53 | 0.70±0.06 | 0.001 | <0.001 | 0.002 | <0.001 | 0.032 | 0.003 | |
| 核因子-κB <i>NF-κB</i> | 1.00±0.05 | 1.61±0.18 | 2.21±0.11 | 1.90±0.18 | 1.14±0.06 | 0.87±0.08 | 0.67±0.05 | 0.019 | <0.001 | 0.003 | 0.080 | 0.154 | 0.001 | |
| 肿瘤坏死因子-α <i>TNF-α</i> | 1.00±0.07 | 12.06±3.63 | 3.45±0.31 | 2.02±0.26 | 1.25±0.13 | 1.00±0.23 | 0.57±0.14 | 0.028 | <0.001 | 0.010 | 0.100 | 0.994 | 0.012 | |
| 白介素-1β <i>IL-1β</i> | 1.00±0.12 | 240.59±36.68 | 79.14±18.66 | 16.01±3.77 | 9.92±2.99 | 7.39±2.01 | 0.66±0.12 | 0.001 | 0.009 | 0.011 | 0.031 | 0.025 | 0.108 | |
| 白介素-6 <i>IL-6</i> | 1.00±0.11 | 40.84±9.71 | 94.94±11.51 | 5.80±1.42 | 1.27±0.17 | 1.53±0.46 | 1.06±0.14 | 0.009 | <0.001 | 0.019 | 0.183 | 0.314 | 0.758 | |
| 环氧合酶 2 <i>COX2</i> | 1.00±0.17 | 53.17±12.74 | 43.61±8.46 | 9.52±3.09 | 6.03±1.54 | 4.33±1.10 | 0.62±0.12 | 0.009 | 0.004 | 0.040 | 0.022 | 0.030 | 0.183 | |
| 热休克蛋白 70 <i>HSP70</i> | 1.00±0.07 | 1.11±0.32 | 6.78±1.82 | 8.18±2.27 | 1.32±0.18 | 0.78±0.10 | 0.42±0.05 | 0.759 | 0.025 | 0.025 | 0.080 | 0.078 | <0.001 | |

血细胞分类计数主要包括白细胞、红细胞和血小板这3类计数,该指标与机体的生理状况密切相关,可作为疾病诊断和治疗的重要参考指标^[8]。细菌性或病毒性感染都可引起血细胞分类计数的变化^[8]。本试验中,LPS刺激导致部分血细胞分类计数发生了显著的变化。与本试验结果一致,我们前期研究也发现LPS刺激4、24 h影响了白细胞、红细胞和血小板计数,且部分指标(如白细胞、嗜酸性粒细胞)在4、24 h时变化的趋势不一^[9]。研究发现,白细胞总数及其分类计数可以指示机体的炎症状态^[9]。红细胞除了是运输氧的主要媒介,也与天然免疫和一些特异性免疫相关^[10]。此外,血小板在炎症和免疫方面同样具有重要的作用,血液中血小板的减少会增加机体受感染的风险^[11]。由于脾脏可清除血液中的异物和衰老的血细胞,分泌激素(如白细胞生成素、红细胞生成素、血小板生成素等)调节骨髓造血,还可调节机体的细胞免疫、体液免疫以及细胞吞噬功能^[12],因此我们猜测LPS可能造成机体的炎症反应,影响组织(如脾脏)的正常功能。

TLRs是一类跨膜的天然免疫受体,其中TLR4是与免疫和炎症密切相关的重要成员^[3]。TLR4可以将信号从细胞外传递到细胞内,触发细胞内MyD88、IRAK1、TRAF6等信号分子,导致NF- κ B活化入核,促进炎症细胞因子的表达与释放^[3]。与跨膜的TLRs不同,NODs存在于细胞内,NOD1和NOD2是该家族中最具有代表性的2个成员,可识别细菌的肽聚糖成分^[13]。NOD1和NOD2可以通过自身寡聚化来招募和激活下游分子RIPK2,同样可以激活NF- κ B^[13]。正常情况下,TLR4和NOD信号通路的激活有利于提高机体的免疫力,进而抵抗感染和杀灭病原体^[14]。但是,其过度激活会带来负面的影响,严重者会引起疾病的产生如脓毒症、类风湿性关节炎、感染性休克等^[14]。

本试验中,LPS刺激导致脾脏TLR4和NOD炎症信号通路关键基因mRNA表达量上升,在后期这些基因逐渐恢复至正常水平或略低于正常水平。这与我们前期关于单个时间点(4、24 h)LPS刺激对一些组织(如肌肉、肝脏、肠道等)的影响的研究结果相吻合^[3,13,15]。TLR4是介导LPS应答的主要受体^[3]。此外,虽然NOD1和NOD2是细菌的肽聚糖成分的特异性识别受体,但是有研究

发现LPS可以通过影响TLR4和TNF- α ,进而激活NOD信号通路^[16]。因此,LPS引起机体的炎症反应可能与其介导炎症信号通路的激活密切相关。

炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6)是大多数炎症病症中的重要介质,当它们过表达时,会使机体处于炎症状态,而长期的炎症则会诱发炎症性疾病^[17]。COX2是催化花生四烯酸合成前列腺素的关键酶,其过量表达亦与炎症密切相关^[18]。HSP70表达量在正常细胞中较低,但是在应激状态下显著升高^[13]。本研究表明,LPS刺激会提高这些炎症相关基因的mRNA表达量,并促使其在短时间内达到峰值,随后逐渐下降恢复。本试验中炎症细胞因子的结果与小鼠模型上得出的结果相似^[19]。这些炎症相关基因的mRNA表达量集中在1~2 h达到峰值,而TLR4和NOD信号通路关键基因则多集中在2~4 h达到峰值。Rosenstiel等^[20]研究发现TNF- α 可以诱导肠上皮细胞NOD2 mRNA表达上调。因此,我们猜测LPS刺激后可能首先导致炎症细胞因子的大量合成,随后促使TLR4和NOD炎症信号通路关键基因mRNA表达上调。

有趣的是,COX2虽然在各系统炎症中全程均有表达,但是在炎症的不同阶段可产生不同的前列腺素以发挥不同的作用^[21]。研究发现,COX2在炎症发生期通过合成前列腺素E₂(PGE₂)发挥促炎作用,而在炎症消退期以合成前列腺素D₂(PGD₂)、15-脱氧前列腺素J₂(15 Δ PGJ₂)发挥抗炎作用^[21]。除此之外,有研究证明高水平的HSP70可降低炎症反应^[13]。HSP70家族成员能降低LPS刺激所致的炎症细胞因子和炎性介质的合成与释放^[22],还可以阻碍NF- κ B的激活^[23]。综上,本试验中,在前期,LPS刺激一方面促使炎性介质表达上调造成机体的炎症反应,另一方面由于机体的负反馈也诱导了抗炎介质(HSP70)的表达。在后期,可能由于机体自身调节(比如调节COX2和HSP70),LPS刺激的影响逐渐被消除。

4 结论

LPS刺激可引起断奶仔猪的血细胞分类计数发生变化,并且在短时间内提高脾脏TLR4和NOD炎症信号通路关键基因和炎症相关基因的mRNA表达量。这些基因在LPS刺激前期处于较

高水平,而在后期逐渐回归到正常水平或略低于正常水平。

参考文献:

- [1] LEE I K, KEY Y C, KIM G, et al. Stress, nutrition, and intestinal immune responses in pigs—a review [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2016, 29(8): 1075–1082.
- [2] ZHANG L, WANG X Y, CHEN S K, et al. Medium-chain triglycerides attenuate liver injury in lipopolysaccharide-challenged pigs by inhibiting necroptotic and inflammatory signaling pathways [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3697.
- [3] ZHU H L, WANG H B, WANG S H, et al. Flaxseed oil attenuates intestinal damage and inflammation by regulating necroptosis and TLR4/NOD signaling pathways following lipopolysaccharide challenge in a piglet model [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(9): e1700814.
- [4] 李宗芳,张澍.脾脏的基础研究进展与展望 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2008, 29(1): 1–6.
- [5] WANG L M, TU Z X, WANG H B, et al. Flaxseed oil improves liver injury and inhibits necroptotic and inflammatory signaling pathways following lipopolysaccharide challenge in a piglet model [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 46: 482–489.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [7] 张澍,李宗芳.脾脏功能与脾脏外科研究现状与展望 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(2): 231–233.
- [8] 张华,侯绍华.血常规检查在犬猫疾病诊断中的应用 [J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(3): 55–56.
- [9] 汪洋,王秀英,汪龙梅,等. Necrostatin-1 对脂多糖刺激的断奶仔猪血细胞分类计数和血液生化指标的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(8): 80–86.
- [10] 郭峰.红细胞免疫的研究和意义 [J]. *自然杂志*, 2002, 24(5): 268–273.
- [11] GROS A, OLLIVIER V, HO-TIN-NOÉ B. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair [J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 5: 678.
- [12] 陈维佩.脾脏解剖生理及外科手术的研究进展 [J]. *局解手术学杂志*, 1994(3): 34–37.
- [13] WU H T, LIU Y L, PI D A, et al. Asparagine attenuates hepatic injury caused by lipopolysaccharide in weaned piglets associated with modulation of toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling and their negative regulators [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(2): 189–201.
- [14] 王秀英.谷氨酸对脂多糖诱导的仔猪肠道损伤及肌肉蛋白质合成和降解的调控作用 [D]. 硕士学位论文. 武汉: 武汉轻工大学, 2015.
- [15] WANG X Y, LIU Y L, WANG S H, et al. Asparagine reduces the mRNA expression of muscle atrophy markers via regulating protein kinase B (Akt), AMP-activated protein kinase α , toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling in weaning piglets after lipopolysaccharide challenge [J]. *British Journal of Nutrition*, 2016, 116(7): 1188–1198.
- [16] TAKAHASHI Y, ISUZUGAWA K, MURMSE Y, et al. Up-regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF- α in LPS-treated murine macrophages [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2006, 68(5): 471–478.
- [17] LIU Z Y, WU B, GUO Y S, et al. Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2015, 5(10): 3174–3185.
- [18] SAINI R K, SANYAL S N, BHATTI J S. Chemopreventive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in 9, 10-dimethylbenzanthracene induced lung carcinogenesis in BALB/C mice: expression of *COX-1*, *COX-2* and *Nf- κ B* [J]. *Journal of Applied Biomedicine*, 2018, 16(4): 320–327.
- [19] LANG C H, SILVIS C, DESHPANDE N, et al. Endotoxin stimulates *in vivo* expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor α , interleukin-1 β , -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle [J]. *Shock*, 2003, 19(6): 538–546.
- [20] ROSENSTIEL P, FANTINI M, BRÄUTIGAM K, et al. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the *NOD2* (*CARD15*) gene in human intestinal epithelial cells [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): 1001–1009.
- [21] 谢翔,应炜阳,金胜威. COX-2 在炎症消退中的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2016, 36(4): 461–464.
- [22] 刘嘉敏,赵元君. HSP70 的研究进展及其在生物医学中的应用 [J]. *教育教学论坛*, 2017(50): 61–62.
- [23] KUBOKI S, SCHUSTER R, BLANCHARD J, et al. Role of heat shock protein 70 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *American Journal of*

Effects of Lipopolysaccharide Challenge on Key Genes Expression of Inflammatory Signaling Pathway in Spleen of Weaned Piglets

WANG Yang LI Xiangen LIU Yulan ZHU Huiling WANG Xiuying*

(Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the changes of key genes of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nucleotide-bound oligomeric domain receptor (NOD) inflammation signaling pathway in spleen of weaned piglets at different time after lipopolysaccharide (LPS) challenge. Forty-two Duroc×Landrace×Yorkshire weaned piglets with a body weight of (7.1±0.9) kg were selected and randomly divided into 7 treatments (6 pigs per treatment). The piglets were injected with 100 μg/kg body weight LPS, and slaughtered at 0 h (before LPS challenge), 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h (after LPS challenge). Blood and spleen samples were taken to determine the blood cell differential counts and the mRNA expressions of inflammatory related genes, respectively. The results showed as follows: LPS challenge led to significant changes in blood cell classification count ($P<0.05$). The mRNA expressions of key genes of TLR4 and NOD signaling pathway were increased after LPS challenge ($P<0.05$), and reached the peak at 2 to 8 h. The mRNA expressions of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, cyclooxygenase 2 and heat shock protein 70 were also significantly increased after LPS challenge ($P<0.05$), and peaked at 1 to 4 h. At 8 to 24 h post injection, these genes gradually returned to normal level or slightly lower than normal level. Overall, LPS challenge activates the inflammatory signaling pathway and up-regulates the expression of inflammatory cytokines. During LPS stimulation, the expressions of these gene increase at the early time, and then decrease gradually after the peak. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(8):3882-3890]

Key words: lipopolysaccharide; weaned piglets; spleen; inflammatory