

T-2 毒素激活活性氧/核转录因子- κ B 信号通路诱导猪空肠上皮细胞发生炎症反应

康瑞芬 王 猛 沈家鲲 金晓明 李春梅*

(南京农业大学动物科技学院,南京 210095)

摘要: 本试验以猪空肠上皮细胞(IPEC-J2)为模型细胞,探讨 T-2 毒素诱导 IPEC-J2 炎症反应的影响及相关作用机制。通过四甲基偶氮唑盐(MTT)方法测定细胞活力,选择适宜的 T-2 毒素和 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)浓度。试验分为 4 个组,分别为对照组、NAC 组(4.0 mmol/L NAC)、T-2 组(4.0 ng/mL T-2 毒素)和 T-2+NAC 组(4.0 ng/mL T-2 毒素+4.0 mmol/L NAC),处理 12 h 后测定各组 IPEC-J2 中丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性、活性氧(ROS)水平、细胞炎症相关基因和核转录因子- κ B(NF- κ B)的相对表达量。结果表明:1)与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 CAT、T-SOD 活性极显著降低($P<0.01$),IPEC-J2 中 MDA 含量和 ROS 水平极显著升高($P<0.01$)。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组 IPEC-J2 中 CAT 和 T-SOD 活性极显著升高($P<0.01$),IPEC-J2 中 MDA 含量和 ROS 水平显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。2)与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)($P<0.05$)、白细胞介素-6(IL-6)($P<0.01$)、白细胞介素-10(IL-10)($P>0.05$)的 mRNA 相对表达量升高。3)与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 NF- κ B 蛋白相对表达量极显著升高($P<0.01$)。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组 IPEC-J2 中 NF- κ B 蛋白相对表达量极显著降低($P<0.01$)。由此可见,T-2 毒素通过诱导 IPEC-J2 产生过量的 ROS,促进炎症相关基因及 NF- κ B 蛋白的表达,导致 IPEC-J2 发生炎症反应。

关键词: T-2 毒素;猪空肠上皮细胞;活性氧;炎症反应

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)01-0474-10

霉菌毒素是由多种自然界中真菌产生的高度多样化的次级代谢产物,会污染食物和饲料,导致人和动物霉菌毒素中毒^[1]。T-2 毒素属于单端孢霉烯族 A 类化合物,主要由镰刀菌属产生,如梨孢镰刀菌、枝孢镰刀菌、拟孢镰刀菌和三线镰刀菌等^[2]。在单端孢霉烯族霉菌毒素中,虽然 T-2 毒素的检出率较低,但其毒性最强,且广泛存在于大麦、小麦、燕麦和玉米等谷物中^[3],严重危害家畜健康,影响畜牧业的发展,因此受到广泛关注。T-2 毒素的产生及饲料和食品的污染程度与多种

因素有关,如遗传因素、环境温湿度、底物温湿度和氧气含量^[4]。作物在田间生长期间以及收割后储存不当均会产生 T-2 毒素。

T-2 毒素在欧洲联盟国(EU)是谷物样品中常见的污染物,人和动物被暴露 T-2 毒素的风险大大增加,因此对人和动物的健康构成了威胁^[5]。对来自 22 个欧洲国家的 20 519 个饲料和谷物样品进行检测,发现谷物中特别是燕麦和燕麦产品中存在 T-2 和 HT-2 毒素^[6]。Gruber-Dorninger 等^[7]进行的 10 年全球饲料中真菌毒素含量调查中发

收稿日期:2020-06-19

基金项目:国家重点研发计划(2018YFE0127300)

作者简介:康瑞芬(1995—),女,内蒙古鄂尔多斯人,硕士研究生,研究方向为饲料毒理与畜禽健康。E-mail: 20171105044@njau.edu.cn

* 通信作者:李春梅,教授,博士生导师,E-mail: chunmeili@njau.edu.cn

现,19%的样品被 T-2 毒素污染。中国饲料样品中 T-2 毒素的污染率为 79.5%,这些样品中 T-2 毒素的含量最高为 735 ng/g^[8]。Morcia 等^[9] 报告指出,从 2011 年至 2014 年,意大利大麦样品中 T-2 毒素和 HT-2 毒素的阳性率在 22%~53%。在对克罗地亚、波斯尼亚和黑塞哥维那的一项研究发现,在 340 个未加工燕麦样品中,T-2 毒素的检出率为 86.1%,T-2 毒素的含量最高为 304.2 μ g/kg^[10]。T-2 和 HT-2 毒素也是英国有机和传统燕麦中最常检出的镰刀菌毒素,超标率分别为 84% 和 92%^[11]。

T-2 毒素的主要毒性机制为通过与 60S 核糖体亚基上的肽基转移酶相互作用抑制蛋白质合成,诱导细胞发生核糖体应激反应,激活 c-Jun N 端激酶 (JNK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK),参与机体的许多生理过程,如破坏细胞稳态,抑制细胞生长和分化,引起细胞凋亡^[12]。小肠是营养物质主要的吸收部位,也是抵御外界物质的第 1 道物理屏障,对维持动物的健康至关重要^[13]。猪空肠上皮细胞 (intestinal porcine epithelial cells, IPEC-J2) 是从没有喂食的新生仔猪空肠中分离的细胞系,保留了肠道上皮的性质,可作为研究肠上皮固有功能的简便模型^[14]。该细胞系具备非转化、非致瘤的特点,可分泌黏液素,产生细胞因子和趋化因子^[15],表达与免疫系统相关的蛋白质,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[16]。因此,IPEC-J2 被广泛用于研究外源物质对肠道免疫功能、通透性和创伤后愈合能力的影响^[17-18]。Pinton 等^[19] 发现动物摄入 T-2 毒素污染的饲料后,会诱发胃肠道发生坏死性病变。Goossens 等^[20] 发现 T-2 毒素处理 IPEC-J2,会降低细胞跨膜电阻 (TEER) 值,增加细胞通透性,破坏肠道屏障。Verbrugge 等^[21] 发现 T-2 毒素处理 IPEC-J2,鼠伤寒沙门氏菌跨 IPEC-J2 单层的转运明显增加,说明细胞屏障被破坏。Romero 等^[22] 发现 T-2 毒素降低结直肠腺癌细胞 (Caco-2) 的 TEER 值以及紧密连接相关基因的转录水平。

研究表明,大部分霉菌毒素的毒性由氧化应激介导^[23-24],氧化应激会引起肠上皮细胞凋亡,诱导肠道发生炎症反应^[25]。N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 是一种含硫醇的抗氧化剂,能够有效清除活性氧 (ROS),有助于维持细胞内的氧化和抗

氧化平衡^[26]。据报道,NAC 可以保护细胞免受氧化应激,抑制肠道损伤,降低肠道脂质过氧化和自由基水平,促进抗氧化酶活性的恢复^[27]。目前,关于 T-2 毒素诱导的肠屏障功能异常的确切机制尚不清楚,其毒性作用是否和氧化应激有关有待验证。因此,本试验以 IPEC-J2 为试验对象,旨在揭示 T-2 毒素对肠道的损伤机理,为防御 T-2 毒素对人和动物肠道损伤提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞的来源与培养

IPEC-J2 购买自北京北纳创联生物有限公司。细胞完全培养基由 DMEM 高糖培养基、10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 抗生素 (10 kU/mL 青霉素、10 mg/mL 链霉素和 25 μ g/mL 两性霉素 B) 组成。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养,连续供应 5% 的 CO₂。

1.2 试验试剂及仪器

T-2 毒素购自北京百灵威科技有限公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、抗生素购自美国 GIBCO 公司;NAC、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 试剂盒、ROS 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒和总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒均购自南京建成生物研究所;抗体核转录因子- κ B (NF- κ B) 购自美国 Abcam 公司;反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自南京擎科生物科技有限公司。

CO₂ 细胞培养箱、全波长酶标仪购自美国 Thermo 公司;LSM700 激光共聚焦显微镜购自德国 Zeiss 公司;梯度 PCR 热循环仪购自日本 TaKaRa 公司;荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 细胞活力测定

细胞传代后,待细胞融合度达到 80%,将细胞消化下来,进行细胞计数并将细胞悬液进行稀释。细胞以 1×10^5 个/mL 浓度接入 96 孔板,待细胞融合度达到 80%,用不同浓度 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 ng/mL) 的 T-2 毒素处理细胞 12、24、48 h,参照 MTT 试剂盒说明书进行细胞活力测定,以确定适宜的 T-2 毒素浓度和处理时间。

1.4 试验设计与处理

以 IPEC-J2 为模型细胞,试验分为 4 个组,分别为对照组 (Con 组)、NAC 组 (4.0 mmol/L NAC)、T-2 组 (4.0 ng/mL T-2 毒素) 和 T-2+NAC

组(4.0 ng/mL T-2 毒素+4.0 mmol/L NAC)。T-2 毒素溶于二甲基亚砜(DMSO)并配制成 1 mg/mL 的贮存液于-20 ℃保存,用基础培养基稀释到 4.0 ng/mL并于 4 ℃保存。NAC 用灭菌双蒸水配制成 0.5 mmol/L 的贮存液,置于 4 ℃保存。将消化后的细胞以均等浓度接种到 96 孔板或 6 孔板(不同试验,接种板不同),当细胞融合度达到 80% 时,用含有相应试剂的培养基替代基础培养基,继续培养 12 h,进行后续试验操作。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测炎症相关基因的相对表达量

细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接入 6 孔板,待细胞融合度达到 80%,用 T-2 毒素和 NAC 溶液处理细胞 12 h 后,吸掉培养基,PBS 清洗 3 次,每孔加 1 mL Trizol,将细胞裂解下来,裂解液和细胞一起装入 2 mL 离心管,离心机离心(4 ℃, 3 500 r/min, 15 min)。取上清液放入新的 2 mL 离心管,加 0.2 mL 氯仿混匀静置 5 min,放入离心

机离心(4 ℃, 12 000 r/min, 15 min),取上清液放入新的 2 mL 离心管,与上清液等体积加入异丙醇,混匀静置 10 min,离心机离心(4 ℃, 12 000 r/min, 10 min)。弃去上清,加入 1 mL 75%乙醇轻轻震荡洗涤沉淀,离心机离心(4 ℃, 7 500 r/min, 5 min)。弃去上清,将装有沉淀的离心管放入超净台,打开风机吹干沉淀,加入 50 μ L 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解沉淀并用枪轻轻吹打均匀。测定细胞 RNA 浓度后,按照 2 \times TS-INGKE Master Mix 反转录试剂盒说明书对 RNA 进行反转录,获得 cDNA;测得 cDNA 浓度后,将各样品 cDNA 浓度稀释到 100 ng/ μ L, cDNA 放于 -20 ℃保存用于后续试验。按照 2 \times T5 Fast qPCR Mix(SYBR Green I)试剂盒说明书加入各反应试剂,在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测。试验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量计算,各个基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

项目 Items	引物序列 Sequence of primer (5'—3')	产物长度 Product length/bp
β -肌动蛋白 β -actin	F:CTGGAACGGTGAAGGTGA R:TTTGAAAGGCAGGGACT	175
肿瘤坏死因子- α <i>TNF-α</i>	F:CCACCAACGTTTCTCTCACT R:AATAAAGGGATGGACAGGGG	351
白细胞介素-6 <i>IL-6</i>	F:ATGAACTCCCTCTCCACAAGC R:TGGCTTTGTCTGGATTCTTTC	493
白细胞介素-10 <i>IL-10</i>	F:TCTGAGTGGAACTCAAGGAA R:CAGGTCTGTCACTGATCTTG	394

1.6 细胞 ROS 水平测定

首先将细胞爬片放入 12 孔板,打入 100 μ L 浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液,待细胞贴壁后,再打入 1 mL 培养基,培养至细胞融合度达到 80%,用 T-2 毒素和 NAC 溶液处理细胞 12 h,测定细胞 ROS 水平,测定方法参照 ROS 检测试剂盒说明书。

1.7 细胞抗氧化指标检测

细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接入 6 孔板,待细胞融合度达到 80%,用 T-2 毒素和 NAC 溶液处理细胞 12 h 后,用细胞刮板将细胞刮下来,和培养基一起放入新的 2 mL 离心管,离心机离心(4 ℃,

1 500 r/min, 5 min),收集上清液,放于 -20 ℃保存。测定细胞 T-SOD、CAT 活性和 MDA 含量,测定方法参照相应的试剂盒说明书。

1.8 免疫荧光检测蛋白相对表达量

首先将细胞爬片放入 12 孔板,打入 100 μ L 浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液,待细胞贴壁后,再打入 1 mL 培养基,培养至细胞融合度达到 80%,用 T-2 毒素和 NAC 溶液处理细胞 12 h。吸出培养基,每孔加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),置于摇床上清洗 3 次,每次 5 min;移除 PBS,加 1 mL 4%多聚甲醛,室温固定 1 h,吸掉多聚甲醛,加入 PBS,摇床清洗,重复 3 次,每次 5 min;加入

100 μ L TritonX-100(0.5%) 通透 10 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1 mL 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 室温封闭 1 h; 滴加 50 μ L 一抗到盖玻片上, 于湿盒中避光孵育 (37 $^{\circ}$ C, 1 h); PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 50 μ L Alexa Fluor 488 标记的二抗, 于湿盒中避光孵育 (37 $^{\circ}$ C, 1 h); 吸掉二抗, 加入 PBS, 摇床清洗, 重复 3 次, 每次 5 min; 滴加 50 μ L 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI), 湿盒中避光孵育 (室温, 10 min), PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 载玻片上滴加荧光抗淬灭剂, 将细胞爬片倒置在载玻片上进行封片, 激光共聚焦显微镜检测荧光强度并拍照记录。

1.9 数据统计与分析

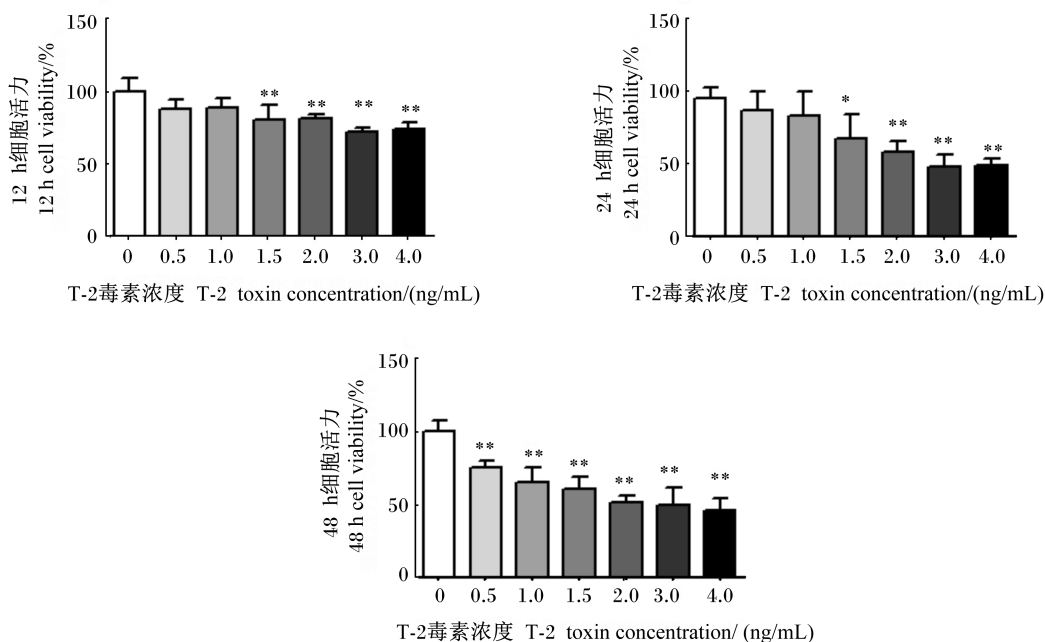
数据分析用 GraphPad Prism 6.01 软件完成。首先进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 然后进行 Tukey 多重比较检验, 结果表示为平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE)。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P <$

0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 T-2 毒素对 IPEC-J2 活力的影响

为了确定 T-2 毒素对 IPEC-J2 的毒性, 用不同浓度的 T-2 毒素 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 ng/mL) 处理细胞 12、24、48 h 后检测细胞活力。如图 1 所示, 随着 T-2 毒素浓度增加, 细胞活力降低, 且处理时间越长, 细胞活力越低。与 0 ng/mL T-2 毒素相比, 1.5、2.0、3.0 和 4.0 ng/mL T-2 毒素处理细胞 12、24、48 h 后, 细胞活力显著或极显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, 4.0 ng/mL T-2 毒素处理细胞 12 h 后, 细胞活力为 74.5%; 处理细胞 24 h 后, 细胞活力为 49.5%; 处理细胞 48 h 后, 细胞活力低至 45.5%。因此, 本试验选择的 T-2 毒素浓度和处理时间分别为 4.0 ng/mL 和 12 h。



* 表示与 0 ng/mL T-2 毒素相比差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与 0 ng/mL T-2 毒素相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

* mean significant difference compared with 0 ng/mL T-2 toxin ($P < 0.05$), and ** mean extremely significant difference compared with 0 ng/mL T-2 toxin ($P < 0.01$).

图 1 T-2 毒素对 IPEC-J2 活力的影响

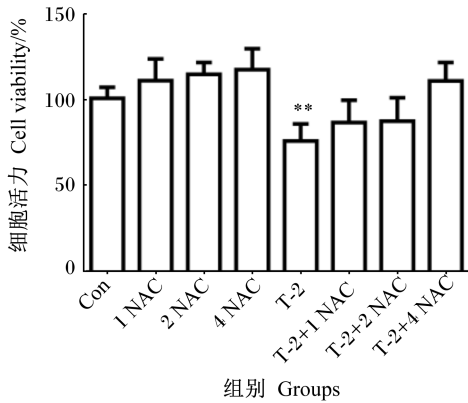
Fig.1 Effects of T-2 toxin on IPEC-J2 viability

2.2 抗氧化剂 NAC 浓度筛选

如图 2 所示, 与对照组相比, T-2 组细胞活力极显著降低 ($P < 0.01$); T-2+1 mmol/L NAC、T-2+

2 mmol/L NAC、T-2+4 mmol/L NAC 组细胞活力均无显著差异 ($P > 0.05$)。T-2+4 mmol/L NAC 组细胞活力高于 T-2 + 1 mmol/L NAC 和 T-2 +

2 mmol/L NAC 组 ($P>0.05$)。因此,本试验选择 4 mmol/L NAC 作为后续试验浓度。

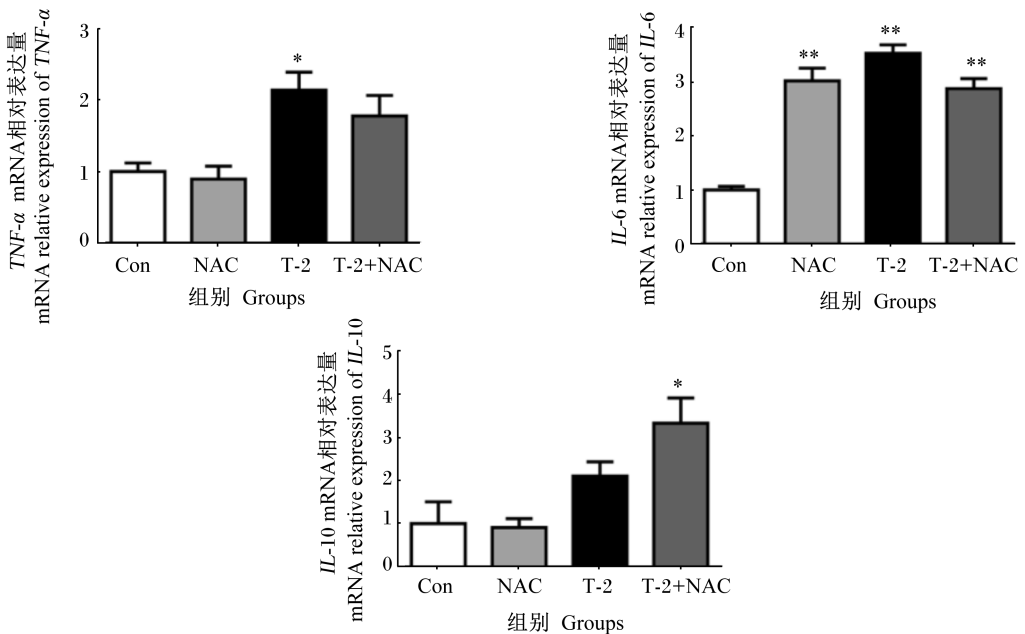


1、2、4 NAC 分别表示 1、2、4 mmol/L NAC; ** 表示与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)。

1, 2, 4 NAC mean 1, 2, 4 mmol/L NAC, respectively; ** mean extremely significant difference compared the control group ($P<0.01$).

图2 抗氧化剂 NAC 浓度筛选

Fig.2 Antioxidant NAC concentration screening



* 表示与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), ** 表示与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)。下图同。

* mean significant difference compared with the control group ($P<0.05$), and ** mean extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$). The same as below.

图3 T-2 毒素对 IPEC-J2 中炎症相关基因表达的影响

Fig.3 Effects of T-2 toxin on expression of inflammation related genes in IPEC-J2

2.3 T-2 毒素对 IPEC-J2 中炎症相关基因表达的影响

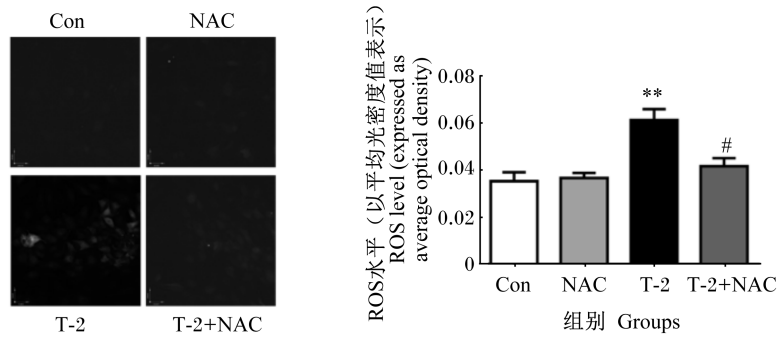
如图 3 所示,与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$), NAC、T-2 和 T-2+NAC 组 IPEC-J2 中白细胞介素-6 ($IL-6$) mRNA 相对表达量极显著升高 ($P<0.01$), T-2+NAC 组 IPEC-J2 中白细胞介素-10 ($IL-10$) mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。

2.4 T-2 毒素对 IPEC-J2 中 ROS 水平的影响

如图 4 所示,与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 ROS 水平极显著升高 ($P<0.01$)。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组 IPEC-J2 中 ROS 水平显著降低 ($P<0.05$)。

2.5 T-2 毒素对 IPEC-J2 中抗氧化指标的影响

如图 5 所示,与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 CAT 和 T-SOD 活性极显著降低 ($P<0.01$), IPEC-J2 中 MDA 含量极显著升高 ($P<0.01$)。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组 IPEC-J2 中 CAT 和 T-SOD 活性极显著升高 ($P<0.01$), IPEC-J2 中 MDA 含量极显著降低 ($P<0.01$)。



#表示与 T-2 组相比差异显著 ($P < 0.05$), ##表示与 T-2 组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。下图同。

mean significant difference compared with the T-2 group ($P < 0.05$), and ## mean extremely significant difference compared with the T-2 group ($P < 0.01$). The same as below.

图 4 T-2 毒素对 IPEC-J2 中 ROS 水平的影响

Fig.4 Effects of T-2 toxin on level of ROS in IPEC-J2

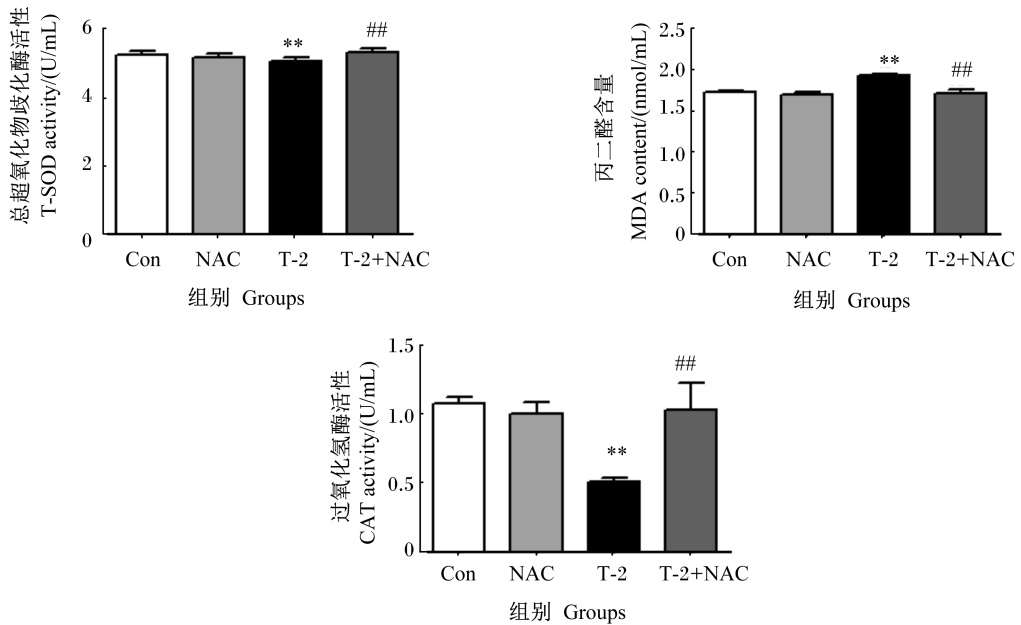


图 5 T-2 毒素对 IPEC-J2 中抗氧化指标的影响

Fig.5 Effects of T-2 toxin on antioxidant indices in IPEC-J2

2.6 T-2 毒素对 IPEC-J2 中 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组相比,T-2 组 IPEC-J2 中 NF- κ B 蛋白相对表达量极显著升高 ($P < 0.01$)。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组 IPEC-J2 中 NF- κ B 蛋白相对表达量极显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

肠道是机体的第1道物理屏障,动物摄入被

霉菌毒素污染的饲料后,胃肠道可能暴露于高浓度的霉菌毒素中,引起胃肠道损伤。IPEC-J2 是一种永生的肠细胞系,可在体外保持分化特征,与原代肠上皮细胞高度相似^[28]。此外,IPEC-J2 保留了其上皮的性质,可模拟肠道上皮先天免疫功能,分泌黏蛋白,产生细胞因子和趋化因子^[15],常被用于研究肠道病原体与宿主的相互作用、猪特异性病原体的生成以及先天免疫反应^[16,29]。

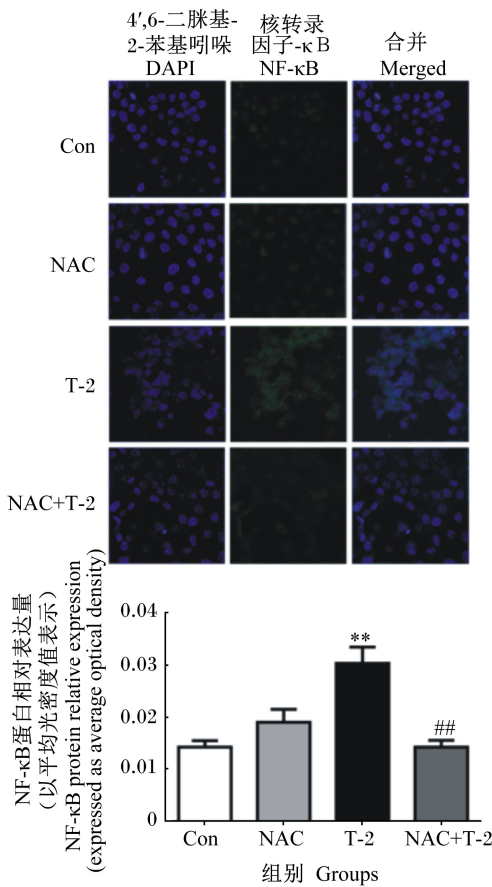


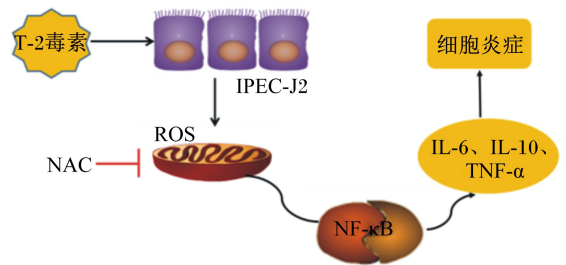
图 6 T-2 毒素对 IPEC-J2 中 NF-κB 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of T-2 toxin on NF-κB protein expression in IPEC-J2

体外细胞活力测定在预测毒素毒性中起着核心作用。研究表明,不同浓度的 T-2 毒素处理 IPEC-J2,细胞活力显著降低,而且 T-2 毒素浓度越高,细胞活力越低^[20],这与本试验的研究结果一致。细胞氧化应激主要表现为细胞 ROS 水平增加,抗氧化能力降低,如 T-SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等抗氧化酶活性降低,MDA 含量增加,脂质过氧化程度增加^[30]。在本试验中,T-2毒素极显著降低了 IPEC-J2 中 CAT 和 T-SOD 活性,极显著升高了 IPEC-J2 中 MDA 含量,极显著增加 IPEC-J2 中 ROS 水平,从而导致氧化应激并使细胞发生炎症反应。与 T-2 毒素单独处理相比,T-2+NAC 处理可以极显著降低 IPEC-J2 中 ROS 水平,极显著升高 IPEC-J2 中 CAT 和 T-SOD 活性,极显著降低 IPEC-J2 中 MDA 含量,减缓细胞的氧化应激和炎症反应。上述结果表明,T-2 毒素诱导 IPEC-J2 发生炎症反应主要通过诱导 ROS 的过量产生,破坏氧化平衡,导致肠上皮细胞发生

氧化应激。

NF-κB 参与诱导多种基因的表达,在调控肠道免疫和炎症反应的多种基因的表达中起着核心作用。细胞因子和病原体刺激细胞表面受体启动信号级联反应,从而激活 NF-κB 驱动细胞增殖以及抗坏死因子分子和细胞因子释放,以激活免疫应答^[31]。同时,NF-κB 调控不同类型的免疫细胞的分化,驱动单核细胞分化为巨噬细胞, M1 巨噬细胞产生白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、TNF-α 和其他促炎细胞因子, M2 巨噬细胞产生抗炎因子 IL-10^[32]。IL-6 是典型的多效细胞因子,由淋巴样和非淋巴样细胞(包括上皮细胞、成纤维细胞和肌肉细胞)产生,参与调控免疫应答,在许多类型的肠道炎症和手术损伤中均观察到 IL-6 的过量表达^[33-34]。在本试验中,T-2 毒素处理 IPEC-J2 12 h 后,NF-κB 蛋白相对表达量极显著增加,细胞中促炎细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 相对表达量显著或极显著升高,这与其他霉菌毒素对 IPEC-J2 的研究结果^[25]一致。与 T-2 组相比,T-2+NAC 组的 IPEC-J2 中 NF-κB 蛋白相对表达量极显著降低,抗炎因子 IL-10 的 mRNA 相对表达量升高, TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 相对表达量降低。以上研究结果表明,T-2 毒素诱导 IPEC-J2 产生过量 ROS,从而激活 NF-κB 蛋白的表达,促进炎症因子的释放,引起炎症反应。如图 7 所示,T-2毒素通过 ROS/NF-κB 信号通路诱导 IPEC-J2 发生炎症反应。



IPEC-J2:猪空肠上皮细胞 intestinal porcine epithelial cells; NAC: N-乙酰-L-半胱氨酸 N-acetyl-L-cysteine; ROS: 活性氧 reactive oxygen species; NF-κB:核转录因子-κB nuclear factor-κB; IL-6: 白细胞介素-6 interleukin-6; IL-10: 白细胞介素-10 interleukin-10; TNF-α: 肿瘤坏死因子-α tumor necrosis factor-α。

图 7 T-2 毒素激活 ROS/NF-κB 信号通路诱导 IPEC-J2 发生炎症反应

Fig.7 T-2 toxin induced inflammatory response of IPEC-J2 by activating ROS/NF-κB signaling pathway

4 结 论

T-2 毒素通过诱导 IPEC-J2 产生过量的 ROS, 促进炎症相关基因和 NF- κ B 蛋白的表达, 导致 IPEC-J2 发生炎症反应。当利用 NAC 抑制细胞产生 ROS, 可明显抑制 T-2 毒素诱导的细胞炎症反应。

参考文献:

- [1] ESCRIVÁ L, FONT G, MANYES L. *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 78: 185–206.
- [2] MATEO J J, MATEO R, JIMÉNEZ M. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 72(1/2): 115–123.
- [3] HUSSEIN H S, BRASEL J M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. *Toxicology*, 2001, 167(2): 101–134.
- [4] KANORA A, MAES D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review [J]. *Veterinárni Medicína*, 2010, 54(12): 565–576.
- [5] SCHOTHORST R C, VAN EGMOND H P. Report from SCOOP task 3.2.10 “collection of occurrence data of fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”: subtask: trichothecenes [J]. *Toxicology Letters*, 2004, 153(1): 133–143.
- [6] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed [J]. *Efsa Journal*, 2011, 9(12): 2481.
- [7] GRUBER-DORNINGER C, JENKINS T, SCHATZMAYR G. Global mycotoxin occurrence in feed: a ten-year survey [J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 375.
- [8] WANG Y, LIU S L, ZHENG H, et al. T-2 toxin, zearalenone and fumonisin B1 in feedstuffs from China [J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2013, 6(2): 116–122.
- [9] MORCIA C, TUMINO G, GHIZZONI R, et al. Occurrence of *Fusarium langsethiae* and T-2 and HT-2 toxins in Italian malting barley [J]. *Toxins*, 2016, 8(8): 247.
- [10] PLEADIN J, VASILJ V, KUDUMIJA N, et al. Survey of T-2/HT-2 toxins in unprocessed cereals, food and feed coming from Croatia and Bosnia & Herzegovina [J]. *Food Chemistry*, 2017, 224: 153–159.
- [11] EDWARDS S G. Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional oats [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2009, 26(7): 1063–1069.
- [12] SIFRIN V I, ANDERSON P. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(20): 13985–13992.
- [13] CELI P, COWIESON A J, FRU-NJI F, et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 234: 88–100.
- [14] DEVREESE M, PASMANS F, DE BACKER P, et al. An *in vitro* model using the IPEC-J2 cell line for efficacy and drug interaction testing of mycotoxin detoxifying agents [J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27(1): 157–163.
- [15] GEENS M M, NIEWOLD T A. Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization [J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(4): 415–423.
- [16] ARCE C, RAMÍREZ-BOO M, LUCENA C, et al. Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-21) in response to LPS from *Salmonella typhimurium* [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 33(2): 161–174.
- [17] HERMES R G, MANZANILLA E G, MARTÍN-ORÚ E S M, et al. Influence of dietary ingredients on *in vitro* inflammatory response of intestinal porcine epithelial cells challenged by an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 34(6): 479–488.
- [18] MA X, FAN P X, LI L S, et al. Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions [J]. *Journal of Animal Science*, 2013, 90(Suppl.4): 266–268.
- [19] PINTON P, GUZYLACK-PIRIOU L, KOLF-CLAUW M, et al. The effect on the intestine of some fungal toxins: the trichothecenes [J]. *Current Immunology Reviews*, 2012, 8(3): 193–208.

- [20] GOOSSENS J, PASMANS F, VERBRUGGHE E, et al. Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin [J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8 (1): 245.
- [21] VERBRUGGHE E, VANDENBROUCKE V, DHAENENS M, et al. T-2 toxin induced *Salmonella* Typhimurium intoxication results in decreased *Salmonella* numbers in the cecum contents of pigs, despite marked effects on *Salmonella*-host cell interactions [J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 22.
- [22] ROMERO A, ARES I, RAMOS E, et al. Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: protective effect of illite mineral clay [J]. *Toxicology*, 2016, 353/354: 21–33.
- [23] ADHIKARI M, NEGI B, KAUSHIK N, et al. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (20): 33933–33952.
- [24] WANG X, WU Q H, WAN D, et al. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro* [J]. *Archives of Toxicology*. 2016, 90(1): 81–101.
- [25] KANG R F, LI R N, DAI P Y, et al. Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 689–698.
- [26] HOU Y Q, WANG L, YI D, et al. N-acetylcysteine reduces inflammation in the small intestine by regulating redox, EGF and TLR4 signaling [J]. *Amino Acids*, 2013, 45(3): 513–522.
- [27] XU C C, YANG S F, ZHU L H, et al. Regulation of N-acetyl cysteine on gut redox status and major microbiota in weaned piglets [J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(4): 1504–1511.
- [28] SCHIERACK P, NORDHOFF M, POLLMANN M, et al. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 125(3): 293–305.
- [29] KOH S Y, GEORGE S, BRÖZEL V, et al. Porcine intestinal epithelial cell lines as a new *in vitro* model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 191–197.
- [30] HOU Y J, ZHAO Y Y, XIONG B, et al. Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60374.
- [31] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF- κ B signaling [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344–362.
- [32] MANTOVANI A, SICA A, LOCATI M. Macrophage polarization comes of age [J]. *Immunity*, 2005, 23(4): 344–346.
- [33] TÜRLER A, KALFF J C, HEECKT P, et al. Molecular and functional observations on the donor intestinal muscularis during human small bowel transplantation [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(7): 1886–1897.
- [34] FONSECA-CAMARILLO G, YAMAMOTO-FURUSHO J K Y. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2015, 21(9): 2188–2193.

T-2 Toxin Induced Inflammatory Response of Intestinal Porcine Epithelial Cells by Activating Reactive Oxygen Species/ Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway

KANG Ruifen WANG Meng SHEN Jiakun JIN Xiaoming LI Chunmei*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This experiment used the intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2) as model cells, to investigate the effects of T-2 toxin induced inflammatory response in IPEC-J2 and its related mechanism. The cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, and the appropriate concentrations of T-2 toxin and N-acetyl-L-cysteine (NAC) were selected. The experiment was divided into four groups, which were control group, NAC group (4.0 mmol/L NAC), T-2 group (4.0 ng/mL T-2 toxin) and T-2+NAC group (4.0 ng/mL T-2 toxin 4.0 mmol/L NAC), respectively. After 12 h treatment, the malondialdehyde (MDA) content, total superoxide dismutase (T-SOD) activity, catalase (CAT) activity, reactive oxygen species (ROS) level and relative expression of inflammation related genes and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in IPEC-J2 of each group were measured. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the activities of CAT and T-SOD in IPEC-J2 of T-2 group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the MDA content and ROS level in IPEC-J2 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the T-2 group, the activities of CAT and T-SOD in IPEC-J2 of T-2+NAC group were significantly increased ($P < 0.01$), and the MDA content and ROS level in IPEC-J2 were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 2) Compared with the control group, the mRNA relative expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05$), interleukin-6 (IL-6) ($P < 0.01$) and interleukin-10 (IL-10) ($P > 0.05$) in IPEC-J2 of T-2 group were increased. 3) Compared with the control group, the protein relative expression of NF- κ B in IPEC-J2 of T-2 group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the T-2 group, the protein relative expression of NF- κ B in IPEC-J2 of T-2+NAC group was significantly decreased ($P < 0.01$). In conclusion, T-2 toxin induce inflammatory response of IPEC-J2 by increasing ROS production and promoting expressions of inflammation related genes and NF- κ B protein. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(1):474-483]

Key words: T-2 toxin; IPEC-J2; ROS; inflammatory response