

子宫内膜炎急性相蛋白与 IL-6 变化的研究

李德军^{1,2}, 刘运枫¹, 裴小英², 郭定宗^{2*}

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070)

摘要: 探讨急性相蛋白(C-反应蛋白、结合珠蛋白、血清淀粉样蛋白 A)和细胞因子(IL-6)在不同程度的子宫内膜炎中的变化及其对子宫内膜炎的诊断意义。选用产后健康荷斯坦奶牛 10 头(N)为对照组;亚临床型子宫内膜炎组(SE),共 28 头;临床型子宫内膜炎组(CE),共 30 头,经颈静脉、子宫腔内分别获取血液样本及子宫分泌物,对其进行急性相蛋白和细胞因子的检测。结果表明,CE 组和 SE 组血清和子宫分泌物中 C-反应蛋白(CRP)、结合珠蛋白(Hp)、血清淀粉样蛋白 A(SAA)和 IL-6 水平明显高于对照组($P < 0.01$),且 CE 组比 SE 组变化明显;在对照组子宫分泌物中未检测到 Hp 和 SAA。随着子宫内细菌污染程度的加重,CRP、Hp、SAA、IL-6 的水平也随着升高,血清和子宫分泌物中 CRP、Hp、SAA、IL-6 水平均可作为诊断子宫内膜炎的敏感指标。

关键词: 子宫内膜炎; C-反应蛋白; 结合珠蛋白; 血清淀粉样蛋白 A; 白介素-6

中图分类号: S857.23

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)10-1333-04

Research on Change of Acute Phase Protein and IL-6 in Cows with Endometritis

LI De-jun^{1,2}, Liu Yun-feng¹, PEI Xiao-ying², GUO Ding-zong^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To observe the changes of acute phase protein and IL-6 in the serum and uterine secretions in cattle with endometritis and search their significance on diagnose. Sixty-eight cows were selected and divided into three groups: N(Normal cows), SE(Subclinical Endometritis) and CE(Clinical endometritis). The concentration of acute phase proteins and cytokine in serum and uterine secretions of endometritis cows were detected. The results showed that the concentrations of CRP, Hp, SAA and IL-6 in the serum and uterine secretions of cows with clinical endometritis and subclinical endometritis were higher than that of control group($P < 0.01$), and group CE was significant variable than group SE, but Hp and SAA were not detected in control group. The concentration of CRP, Hp, SAA and IL-6 were increased by different degree bacterial contamination in uterine and they can be the sensitive index for diagnosis with endometritis inflammation.

Key words: endometritis; C-reactive protein; haptoglobin; serum amyloid protein A; interleukin-6

大多数奶牛的子宫产后会受到广泛的细菌感染^[1],正常情况下在产犊 7 周后,由于子宫的生理和解剖学结构的特点,在子宫复旧时又能够恢复到无菌状态,为再次妊娠提供一个适合的环境。然而,仍有部分奶牛会受到细菌的持续感染。继而引发子宫内膜炎,导致产犊间隔延长和低繁殖率。

子宫复旧时,子宫细菌得到清除,同时机体的防御系统也被动员起来抵抗细菌的感染。外周血中急性相蛋白(APP)的增加^[2-3],就是其中的一个应激反应。这些主要由肝细胞分泌的物质,在防止组织被破坏和加速组织修复的过程中有着重要的作用。而且在炎症反应中,炎症部位的单核细胞/巨噬细胞产

收稿日期: 2010-01-25

基金项目: 国家支撑计划子课题(2006BAD04A05)

作者简介: 李德军(1974-),女,黑龙江哈尔滨人,讲师,博士,主要从事临床诊断和检验工作, Tel: 0451-55190203, E-mail: ldjldj_2004@163.com

* 通讯作者: 郭定宗, E-mail: hlgdz@163.com

生的细胞因子是急性相蛋白的主要调节因子,包括 IL-6、IL-8 等。在人类医学中,急性相蛋白和细胞因子作为炎症指标的一部分,在临床诊断中的应用已得到广泛推广^[4],但在兽医临床诊断中特别是对子宫内膜炎的诊断少有报道。IL-6 是急性相蛋白生成过程中的主要调节因素,所以本研究通过对血清和子宫分泌物中 IL-6 和急性相反应蛋白(CRP、SAA、Hp)浓度的检测,探讨急性相蛋白和 IL-6 在奶牛子宫内膜炎临床诊断中的意义。

1 材料与方法

1.1 试验动物的选择及分组

在某大型奶牛场选择 3~8 岁、膘情良好、没有外伤和乳房炎疾病的荷斯坦奶牛,分别于产后 7、14、21、28、35、42 和 49 d 7 个时间点进行血液及子宫分泌物的采集。然后根据报道^[5-6],在产后 21 d 时对试验牛的阴道分泌物进行细胞学检查,将阴道内有黏液脓性和脓性分泌物排出的奶牛作为临床型子宫内膜炎组(CE),共 30 头;将阴道分泌物中中性粒细胞>18%作为亚临床型子宫内膜炎组(SE),共 28 头;产后健康奶牛 10 头,作为对照组(N)。

1.2 血液及子宫分泌物样品的采集和处理

颈静脉采血,室温下(不超过 20 °C)自然凝固 1~2 h,然后 1 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,置-20 °C 冰箱中保存备用。

采集子宫分泌物时,先消毒外阴,借助开口器,将含有 20 mL 灭菌生理盐水的子宫清洗器送入子宫体内,通过直肠内的手将子宫内的液体由子宫体移到子宫角进行反复冲洗。然后用一个长 60 cm 的硬质塑料管将分泌物吸出贮存于无菌试管中,进行急性期蛋白和 IL-6 的检测。

1.3 检测方法

CRP、Hp、SAA 和 IL-6 采用 ELISA 法,试剂由美国 Adlitteram diagnostic laboration 公司生产。

1.4 数据处理

用 SPSS12.0 软件进行数据统计、处理,分析组间差异。在结果列表中,数据肩标大写字母不相同者表示组间差异显著($P<0.05$),数据肩标小写字母不同者表示组间差异极显著($P<0.01$)。

2 结果

2.1 血清和子宫分泌物中急性相蛋白的变化

由表 1~3 可见,临床型子宫内膜炎组和亚临床型子宫内膜炎组血清中 CRP、Hp、SAA 水平明显高于对照组($P<0.01$),Hp 和 SAA 变化较 CRP 显著,且两组间也差异极显著。CE 组和 SE 组子宫分泌物中 Hp 和 SAA 差异显著,表中“—”表示在对照组中未检测到 Hp 和 SAA。产后 7 d 时,Hp 和 SAA 急性相蛋白均达到最大值,随着产后时间的延长,其水平也逐渐在降低。

表 1 奶牛血清和子宫分泌物中 CRP 变化

项目 Item	组别 Group	产后时间/d Day postpartum						
		7	14	21	28	35	42	49
血清 Serum	N	1.16±0.62 ^{Aa}	1.54±0.68 ^{Aa}	1.38±0.85 ^{Aa}	1.25±0.62 ^{Aa}	1.13±0.84 ^{Aa}	1.30±0.48 ^{Aa}	1.11±0.75 ^{Aa}
	SE	8.21±1.44 ^{Bb}	7.32±0.76 ^{Bb}	7.70±0.60 ^{Bb}	7.32±1.35 ^{Bb}	6.87±1.16 ^{Bb}	6.22±0.60 ^{Bb}	5.52±0.48 ^{Bb}
	CE	10.16±1.25 ^{Cb}	9.83±1.07 ^{Cc}	9.06±1.37 ^{Bb}	9.65±1.02 ^{Cc}	9.29±0.93 ^{Cc}	9.21±1.33 ^{Cc}	8.47±1.39 ^{Cc}
子宫分泌物 Uterine secretions	N	1.27±0.56 ^{Aa}	1.04±0.41 ^{Aa}	1.00±0.16 ^{Aa}	1.16±0.34 ^{Aa}	1.08±0.34 ^{Aa}	1.11±0.15 ^{Aa}	0.89±0.15 ^{Aa}
	SE	8.07±0.87 ^{Bb}	8.26±0.93 ^{Bb}	7.22±1.50 ^{Bb}	6.62±1.34 ^{Bb}	6.76±1.34 ^{Bb}	5.89±1.36 ^{Bb}	5.38±0.79 ^{Bb}
	CE	10.37±1.65 ^{Cc}	11.16±1.22 ^{Cc}	9.82±1.83 ^{Cb}	9.02±1.68 ^{Cb}	8.58±1.68 ^{Cb}	8.07±2.05 ^{Cb}	7.71±2.28 ^{Cb}

同列数据肩标大写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),小写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$),字母相同为差异不显著($P>0.05$)。下同

Different capital letters in the same column mean significant difference between the groups($P<0.05$), different lowercase in the same column mean remarkably difference between the groups($P<0.01$), the same letter in the same column means no significant difference between treatments($P>0.05$). The same as below

表 2 奶牛血清和子宫分泌物中 Hp 变化

项目 Item	组别 Group	产后时间/d Day postpartum						
		7	14	21	28	35	42	49
血清 Serum	N	5.31±1.83 ^{Aa}	3.74±2.62 ^{Aa}	5.78±2.10 ^{Aa}	4.43±1.92 ^{Aa}	3.91±2.04 ^{Aa}	5.28±2.33 ^{Aa}	4.33±2.32 ^{Aa}
	SE	45.25±5.85 ^{Bb}	32.21±7.56 ^{Bb}	29.92±6.12 ^{Bb}	22.96±2.53 ^{Bb}	16.52±2.42 ^{Bb}	14.19±3.70 ^{Bb}	11.92±1.86 ^{Bb}
	CE	90.41±6.61 ^{Cc}	79.47±5.03 ^{Cc}	73.92±9.59 ^{Cc}	55.78±4.24 ^{Cc}	44.84±4.02 ^{Cc}	28.46±3.81 ^{Cc}	21.78±4.07 ^{Cc}
子宫分泌物 Uterine secretions	N	—	—	—	—	—	—	—
	SE	25.51±7.87 ^{Aa}	20.76±3.29 ^{Aa}	17.20±2.19 ^{Aa}	15.45±2.31 ^{Aa}	11.33±1.08 ^{Aa}	7.52±1.97 ^{Aa}	7.23±1.16 ^{Aa}
	CE	47.01±4.90 ^{Bb}	38.16±5.59 ^{Bb}	34.37±4.45 ^{Bb}	27.83±3.43 ^{Bb}	20.53±2.78 ^{Bb}	15.97±3.48 ^{Bb}	9.27±1.10 ^{Aa}

表 3 奶牛血清和子宫分泌物中 SAA 变化

项目 Item	组别 Group	产后时间/d Day postpartum						
		7	14	21	28	35	42	49
血清 Serum	N	1.262±0.16 ^{Aa}	1.384±0.18 ^{Aa}	1.371±0.07 ^{Aa}	1.390±0.04 ^{Aa}	1.385±0.08 ^{Aa}	1.344±0.08 ^{Aa}	1.320±0.09 ^{Aa}
	SE	66.22±8.62 ^{Bb}	117.83±4.37 ^{Bb}	187.52±8.94 ^{Bb}	155.09±7.82 ^{Bb}	137.62±4.40 ^{Bb}	91.03±4.11 ^{Bb}	70.32±4.93 ^{Bb}
	CE	356.19±11.43 ^{Cc}	323.58±11.6 ^{Cc}	289.90±16.60 ^{Cc}	262.47±8.69 ^{Cc}	220.49±10.27 ^{Cc}	117.80±2.16 ^{Cc}	91.49±9.17 ^{Cc}
子宫分泌物 Uterine secretions	N	—	—	—	—	—	—	—
	SE	75.82±6.36 ^{Aa}	109.97±4.60 ^{Aa}	89.36±4.47 ^{Aa}	62.09±1.96 ^{Aa}	58.62±1.63 ^{Aa}	46.23±3.04 ^{Aa}	34.44±2.19 ^{Aa}
	CE	156.19±11.43 ^{Bb}	134.78±4.05 ^{Bb}	128.28±2.21 ^{Bb}	114.27±1.91 ^{Bb}	80.09±1.73 ^{Bb}	65.68±2.24 ^{Bb}	57.69±3.32 ^{Bb}

2.2 血清和子宫分泌物中细胞因子的变化

由表 4 可见,血清和子宫分泌物中 IL-6 极显著

高于对照组 ($P < 0.01$)。从数值的变化来看,CE 组较 SE 组变化显著。

表 4 奶牛血清和子宫分泌物中 IL-6 变化

项目 Item	组别 Group	产后时间/d Day postpartum						
		7	14	21	28	35	42	49
血清 Serum	N	0.238±0.17 ^{Aa}	0.338±0.46 ^{Aa}	0.473±0.16 ^{Aa}	0.269±0.36 ^{Aa}	0.216±0.14 ^{Aa}	0.248±0.25 ^{Aa}	0.248±0.06 ^{Aa}
	SE	0.793±0.14 ^{Bb}	0.987±0.25 ^{Bb}	0.848±0.09 ^{Bb}	0.818±0.11 ^{Bb}	0.788±0.10 ^{Bb}	0.661±0.14 ^{Bb}	0.587±0.07 ^{Bb}
	CE	3.235±0.39 ^{Cc}	3.065±0.09 ^{Cc}	3.065±0.20 ^{Cc}	2.619±0.11 ^{Cc}	2.618±0.47 ^{Cc}	2.422±0.41 ^{Cc}	2.416±0.06 ^{Cc}
子宫分泌物 Uterine secretions	N	0.136±0.12 ^{Aa}	0.124±0.21 ^{Aa}	0.180±0.11 ^{Aa}	0.154±0.21 ^{Aa}	0.146±0.11 ^{Aa}	0.217±0.12 ^{Aa}	0.146±0.21 ^{Aa}
	SE	0.509±0.23 ^{Bb}	0.569±0.34 ^{Bb}	0.734±0.22 ^{Bb}	0.595±0.13 ^{Bb}	0.440±0.22 ^{Bb}	0.512±0.21 ^{Bb}	0.461±0.14 ^{Bb}
	CE	1.292±0.13 ^{Cc}	1.240±0.24 ^{Cc}	1.160±0.23 ^{Cc}	1.071±0.32 ^{Cc}	0.853±0.28 ^{Cc}	0.786±0.24 ^{Cc}	0.741±0.22 ^{Cc}

血液中 CRP、SAA、Hp 与 IL-6 呈正相关,相关系数分别为 0.59、0.68、0.77,子宫分泌物中 CRP、SAA、Hp 的含量与 IL-6 浓度也呈正相关,相关系数分别为 0.62、0.74、0.83。

3 讨论

急性期蛋白 (APP) 有助于提高炎症过程后子宫组织的修复^[7]。因此,在炎症早期 APP 被迅速诱导,是抵御外源性污染的第一道防线,对机体受损伤起到重要的缓冲作用,以便有充足时间去激活特异

性免疫反应^[8-9]。CRP 主要由肝细胞在 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 刺激下合成。炎症部位局部巨噬细胞也可少量产生。CRP 在绝大多数病毒感染的血清浓度变化不大或不变,这是由于大多数病毒感染是在细胞内增殖进行,而完整的细胞膜上缺乏暴露的磷脂蛋白质,故不能触发 CRP 的产生和结合。相反,直接创伤和多数细菌感染发生在细胞外,足以使细胞膜损伤,暴露出磷酸胆碱和提拱 CRP 的附着点,通过 IL-6 将信息传递给肝,并刺激肝产生有活性的 CRP。Hp 和 SAA 的主要功能被认为能够清除由

损伤组织和巨噬细胞释放的细胞产物^[10]。

奶牛在分娩后,子宫内的炎症和子宫组织的损伤能够诱导肝细胞对 APP 的释放^[11]。另外,病原菌产生的脂多糖内毒素又能够诱导细胞因子的产生,IL-6 就是其中之一。IL-6 是调节 APP 在肝脏中合成最主要的细胞因子,大量研究表明,IL-6 对 APP 产生的调节随炎症性质、部位不同而有所差异。IL-6 可刺激肝产生急性期蛋白,包括 CRP、SAA 等,引起机体发热、白细胞增多等一系列生理变化^[8]。尽管上述变化是机体对外界因子刺激的非特异性反应,但是疾病类型的不同,血清 Hp、SAA、CRP 和 IL-6 水平的变化也是不同的。本研究发现,无论是 SE 组,还是 CE 组,血清中 CRP、SAA、Hp 浓度均明显高于对照组,且 CRP、SAA、Hp 浓度与 IL-6 浓度呈正相关,子宫分泌物中 3 种蛋白与 IL-6 的相关性高于血液中。据报道^[12],局部组织内细胞因子的浓度,对衡量细菌污染的严重程度和生物活性比血液中的浓度可能会更有效。本试验中,在正常奶牛的子宫分泌物中同时随着产后时间的延长,即在子宫复旧开始时,各项指标均有不同程度的减少,这与 Sheldon^[13]等的研究相一致。

急性相蛋白对细菌污染的反应的不同可能是由于肝细胞对细胞因子刺激作用的反应不同。说明在炎症过程中,IL-6 和 3 种急性相蛋白均参与了子宫内膜炎炎症反应的过程,同时 IL-6 的表达越多,CRP、SAA、Hp 的生成越多。而且 SAA、Hp 表现较 CRP 明显,本试验中,在正常奶牛的子宫分泌物中未检测到 Hp 和 SAA 的存在,说明当牛一旦感染或发炎引起组织损伤,牛的肝脏就大量产生这 2 种蛋白。其水平升高的早期警告,对诊断和治疗不同程度的子宫内膜炎有一定的提示作用^[14]。Sheldon^[13]曾报道在正常健康动物体内 SAA 和 Hp 的浓度很低,甚至只有痕量。本研究中,血液中 SAA、Hp 的含量很低,在子宫分泌物中的含量可能低到无法检测出来,也说明了这一点。

参考文献:

- [1] STEPHEN J, LEBLAN C. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review[J]. *Vet J*, 2008, 176: 102-104.
- [2] REGASSA F, NOAKES D E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation

to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria[J]. *Vet Rec*, 1999, 144: 502-506.

- [3] ALSEMGEEST S P, TAVERNE M A M, BOOSMAN R, et al. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses[J]. *Am J Vet Res*, 1993, 54: 164-167.
- [4] 河和忠. 炎症指标的再评价[J]. 日本医师会杂志, 1993, 110: 903.
- [5] LEBLANC S J, DUFFIELD T F, LESLIE K E, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85:2223-2236.
- [6] KASIMANICKAM R, DUFFIELD T F, FOSTER R A, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows[J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 9-23.
- [7] WILLIAMS E J, FISCHER D P, PFEIFFER D U. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 102-117.
- [8] TAN L N, HUANG J H. Recent advances in the investigation of haptoglobin [J]. *J Int Pathol Clin Med*, 2006, 26 (1):47-52.
- [9] MURATA H, SHIMADA N, YOSHIOKA M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview[J]. *Vet J*, 2004, 168(1):28-40.
- [10] WHICHER J T, WESTACOTT C I. Biochemistry of inflammation[M]. London: Kluwer Academic Publishers, 1992:243-269.
- [11] BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response[J]. *Immunol Today*, 1994, 15: 74-80.
- [12] MILLER A J, LUHESHI G N, ROTHWELL N J, et al. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: 857-861.
- [13] SHELDON I M, NOAKES D E, RYCROFT A, et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving [J]. *Vet Rec*, 2001, 10: 172-175.
- [14] HORADAGODA N U, KNOX K M G, GIBBS H A, et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation[J]. *Vet Rec*, 1999, 144: 437-441.