

运输对仔猪抗氧化功能和促炎细胞因子产生的影响

邵斌¹, 张彩霞¹, 赵茹茜^{1,2*}, 张书霞^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 南京农业大学农业部动物生理生化重点
开放实验室, 南京 210095)

摘要: 仔猪运输能引起应激反应, 从而增加对疾病的易感性, 这与应激导致的免疫和抗氧化能力改变有关。本研究的目的是了解 2 h 运输对仔猪重要器官抗氧化功能和主要促炎细胞因子的影响, 为进一步制定抗应激措施提供理论依据。将 30 头体质量约 20 kg 的仔猪平均分为试验组和对照组, 试验组仔猪用卡车在公路上运输 2 h, 比较试验组和对照组仔猪肝脏和心脏抗氧化指标和血清 IL-1 β 和 IL-2 的变化。结果显示, 2 h 运输对仔猪心脏抗氧化能力有一定的影响, 试验组仔猪心脏活性氧(ROS)量[(14 536.0 \pm 4 313.5)AU \cdot mg⁻¹]多于对照组仔猪[(12 778.0 \pm 2 589.6)AU \cdot mg⁻¹], 但无统计学差异($P>0.05$); 运输后仔猪肝脏总抗氧化能力(T-AOC)和过氧化氢酶(CAT)活性显著下降($P<0.05$), 脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量显著上升($P<0.05$); 肝脏和心脏中主要抗氧化酶——铜锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)mRNA 水平虽均有所降低, 但与对照组相比差异不显著($P>0.05$); 运输后仔猪主要促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-2 在血清中的含量与对照组相比虽无显著性差异($P>0.05$), 但均有所升高。以上结果表明, 2 h 运输可从基因转录和表达水平上降低仔猪肝脏的抗氧化功能, 使肝细胞脂质过氧化程度增强, 血清中促炎细胞因子的升高也可直接损伤组织, 因此, 抗氧化能力的下降和促炎细胞因子的生成增加, 是运输仔猪组织损伤的重要原因。

关键词: 运输应激; 仔猪; 抗氧化功能; 细胞因子

中图分类号: S852.33

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)10-1545-05

Effect of Transportation on the Antioxidative Capacity and Proinflammatory Cytokines in Piglets

SHAO Bin¹, ZHANG Cai-xia¹, ZHAO Ru-qian^{1,2*}, ZHANG Shu-xia^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture, Nanjing
Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The transportation of piglets results in stress that is associated with increased susceptibility to diseases, presumably due to alteration of immune function and antioxidative ability. The objective of present study was to determine if a 2 h transportation of piglets by road induced changes in antioxidative ability and proinflammatory cytokines. Thirty piglets weighting about 20 kg were divided into experimental and control group on the average. The animals in experimental group were transported by truck on road for 2 h. Then hearts and livers were collected, blood was harvested from all piglets. The antioxidative capacity of hearts and livers and serum concentration of IL-1 β and IL-2 were assayed. The result were as follows, the antioxidative ability was not obviously changed in hearts after transportation, although production of reactive oxygen species (ROS) in hearts of transported animals was greater than that of control group($P>0.05$). In livers, the activities of total antioxidative capacity (T-AOC) and catalase (CAT) were obviously

收稿日期: 2009-01-12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30430420)

作者简介: 邵斌(1982-), 男, 江西南昌人, 硕士, 主要从事兽医病理学研究

* 通讯作者: 张书霞(1950-), Tel: 025-84395316; E-mail: shuxia@njau.edu.cn

decreased ($P < 0.05$) following transportation, and the decrease was accompanied with significant rise of the maleic dialdehyde (MDA) concentration ($P < 0.05$). Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD), a important antioxidative enzyme, was down-regulated in hearts and livers following transportation in mRNA level ($P > 0.05$). The serum contents of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-2 were risen slightly. It was concluded that 2 h transportation of piglets induces decrease of antioxidative capacity only in the liver and increase of proinflammatory cytokines of IL-1 β and IL-2 concentration in sera slightly. It was indicated that the decreased antioxidative capacity and increased proinflammatory cytokine concentration lead to tissue lesion of piglets following transportation.

Key words: transportation stress; piglets; antioxidant capacity; proinflammatory cytokines

运输是猪的重要应激原。随着养猪业集约化程度的提高,阶段饲养或功能猪场饲养模式的推广,仔猪与肥猪的长途运输将越来越普遍,运输引起的应激将严重影响动物生产性能、健康状况和肉品质量,造成重大的经济损失^[1]。运输应激影响猪的健康,增加对疾病的易感性与两方面因素有关,一是免疫功能的改变^[2],尤其是某些促炎细胞因子的释放增加,可直接损伤组织;二是机体抗氧化功能的变化,特别是机体重要脏器,如心脏和肝脏抗氧化功能的下降,自由基生成增加,清除自由基的能力不足,自由基以脂质过氧化的方式对细胞造成损害,导致组织产生器质性变化^[3],甚至突然死亡。每年有关应激引起自由基损伤和细胞因子变化的报道较多^[4-7],但主要是对人类的研究,运输对猪抗氧化功能和促炎细胞因子的影响则鲜见报道。因此了解运输过程中仔猪重要脏器抗氧化能力和重要促炎细胞因子的变化有利于防治应激性损伤。作者测定了运输仔猪重要器官——心脏和肝脏的抗氧化功能的变化,检测了运输过程中仔猪重要促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-2 的变化,为进一步制定应激性损伤的防治措施提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验用动物

体质量 20 kg 左右的仔猪 30 头,平均分成对照组与运输组。运输组猪在 65 kg·m⁻² 密度下用卡车进行 2 h 公路运输,整个运输过程中仔猪相互隔离,运输期间,猪自由采食和饮水。运输结束后,所有猪注射巴比妥钠麻醉后宰杀,取血,离心,血清置-20℃ 保存;取心脏和肝脏置液氮速冻后转入-70℃ 冷冻保存。

1.2 主要试剂和仪器

T-AOC 检测盒、T-SOD 检测盒、Cu-Zn SOD 检测盒、CAT 检测盒、GPx 检测盒和 MDA 检测盒均为南京建成生物工程研究所产品,2',7'-二氯荧光乙酰乙酸盐(DCFH-DA)为 Sigma 公司产品,反转录酶(M-MLV)、DNA 聚合酶(*Taq*)购于大连宝生生物公司,白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-2(IL-2)放射免疫测定试剂盒为北京北方生物技术研究所产品。

γ -计数器(FMJ-182 型,中科院上海原子能研究所),冷冻离心机(德国 Heraeus Biofue PrimoR),电子天平(德国 Sartorius BS-210S),PCR 扩增仪(新加坡 Applied Biosystems),721 型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),DY89-I 型电动匀浆器(宁波新芝科器研究所),数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),TECAN infinite M200 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司)等。

1.3 试验方法

1.3.1 抗氧化功能指标的检测 用荧光发光法检测 ROS;TBA 法检测 MDA;T-AOC、CAT、GPx 用比色法测定;T-SOD 和 Cu-Zn SOD 用羟胺法检测。各种指标的测定均按试剂盒说明书操作。

1.3.2 促炎细胞因子的检测 用放免法检测血清中 IL-1 β 和 IL-2 含量,按试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 心脏和肝脏中 Cu-Zn SOD mRNA 的测定 采用半定量 RT-PCR 法,主要操作步骤:(1)按说明书采用 Invengen 总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,提取的总 RNA 经紫外分光光度计测得 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0,作为逆转录反应的模板;(2)反转录合成 cDNA 第一链,按 TaKaRa 公司反转录酶(M-MLV)说明书操作;(3)根据 GenBank 中猪 Cu-Zn SOD 的序列,用 primer premier 5.0 合成 1 对引物(序列见表 1),以 *Cyclophilin* 基因作内参;(4)

PCR 反应:95 °C 3 min,95 °C 45 s,58 °C 45 s,72 °C 1 min,29 个循环;(5)取 15 μ L PCR 扩增产物,2%

琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪分析,以 Cu-Zn SOD/*Cyclophilin* 灰度的比值进行相对定量。

表 1 Cu-Zn SOD 和 *Cyclophilin* 的引物序列

Table 1 The oligonucleotide sequence of primers for amplifying Cu-Zn SOD and *Cyclophilin*

基因 Gene	引物序列 Oligonucleotide sequence	长度/bp Length /bp	GenBank 登录号 Accession number
Cu-Zn SOD	上游(S)5'-TGAAGGGAGAGAAGACAGTGTAGT-3'	380	AF396674
	下游(AS)5'-AATTACACCACAGGCCAAACGACTT-3'		
<i>Cyclophilin</i>	上游(S)5'-TAACCCACCGTCTTCTT-3'	366	F14571
	下游(AS)5'-TGCCATCCAACCACTCAG-3'		

1.4 统计学处理

试验结果用平均数 (Mean \pm SE) 表示,采用 SPSS13.0 软件的“*t* test”程序进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 运输对仔猪心脏和肝脏抗氧化能力的影响

总体上看,运输 2 h 对仔猪心脏的抗氧化能力影响不大,经过运输仔猪心脏中 ROS[(14 536.0 \pm

4 313.5) AU \cdot mg⁻¹] 的产生多于对照组仔猪 [(12 778.0 \pm 2 589.6) AU \cdot mg⁻¹],前者 T-SOD 的活性也有所增强,心脏中 MDA 并未增加。运输组仔猪肝脏中的 T-AOC 和 CAT 活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$),其它抗氧化指标 T-SOD、Cu-Zn SOD、GPx 也比对照组有所降低,而运输后仔猪的 ROS 产生则高于对照组仔猪,因此,运输后仔猪肝脏中 MDA 的含量显著上升 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 运输对仔猪心脏和肝脏抗氧化能力的影响 (n=15)

Table 2 The effects of transportation on antioxidative ability in hearts and livers of piglet's

组别 Group	心脏 Heart		肝脏 liver	
	试验组 Transportation	对照组 Control	试验组 Transportation	对照组 Control
T-AOC/(U \cdot mg ⁻¹)	0.91 \pm 0.30	0.81 \pm 0.20	2.4 \pm 0.3 ^a	2.8 \pm 0.4 ^b
ROS/(AU \cdot mg ⁻¹)	14 536.0 \pm 4 313.5	12 778.0 \pm 2 589.6	2 656 \pm 936	2 373 \pm 591
T-SOD/(U \cdot mL ⁻¹)	34.1 \pm 5.9	30.7 \pm 4.5	101.2 \pm 18.2	103.5 \pm 18.8
Cu-ZnSOD/(U \cdot mL ⁻¹)	26.9 \pm 4.7	28.4 \pm 4.1	90.1 \pm 13.0	96.2 \pm 18.0
CAT/(U \cdot mg ⁻¹)	13.7 \pm 4.0	15.8 \pm 9.4	298.6 \pm 52.0 ^a	407.4 \pm 97.1 ^b
GPx/(U \cdot mg ⁻¹)	-	-	67.8 \pm 20.3	69.0 \pm 18.9
MDA/(nmol \cdot mg ⁻¹)	5.5 \pm 1.4	5.7 \pm 1.8	1.3 \pm 0.4 ^a	1.0 \pm 0.2 ^b

不同小写字母代表同一脏器运输组和对照组仔猪间差异显著 ($P < 0.05$);-, 未检测出

Different letters indicate significant difference between different groups in same organ of piglets ($P < 0.05$); -, Not detected

2.2 运输对仔猪血清中 IL-1 β 和 IL-2 的影响

运输猪血清中 IL-1 β 和 IL-2 含量与对照组相比有所升高 ($P > 0.05$,表 3)。

2.3 仔猪肝脏和心脏中 Cu-Zn SOD mRNA 的变化

仔猪肝脏和心脏中 Cu-Zn SOD mRNA 见图 1 和图 2。运输后仔猪肝脏 (0.86 \pm 0.40) 和心脏 (0.99 \pm 0.13) 中 Cu-Zn SOD mRNA 水平比对照组仔猪 (肝脏:1.69 \pm 0.80,心脏:1.18 \pm 0.24) 虽都有所下降,但无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 3 血清中 IL-1 β 和 IL-2 水平的变化 (Mean \pm SE)

Table 3 Changes of IL-1 β and IL-2 levels in serum

组别 Group	ng \cdot mL ⁻¹	
	试验组 (n=7) Transportation	对照组 (n=14) Control
IL-1 β	0.140 \pm 0.009	0.120 \pm 0.004
IL-2	2.71 \pm 0.27	2.14 \pm 0.14



1、7. 对照组仔猪肝脏和心脏 Cu-Zn SOD 基因；2、8. 对照组仔猪肝脏和心脏 *Cyclophilin* 基因；3、5 试验组仔猪肝脏和心脏 Cu-Zn SOD 基因；4、6. 试验组仔猪肝脏和心脏 *Cyclophilin* 基因
mRNA of Cu-Zn SOD in liver from control group (Lane 1) and transportation group (Lane 3). mRNA of *cyclophilin* housekeeping gene in liver from control group (Lane 2) and transportation group (Lane 4); mRNA of Cu-Zn SOD in heart from transportation group (Lane 5) and control group (Lane 7), mRNA of *cyclophilin* housekeeping gene in heart from transportation group (Lane 6) and control group (Lane 8)

图1 仔猪肝脏(A)和心脏(B)中 Cu-Zn SOD 和 *Cyclophilin* mRNA

Fig. 1 The mRNA of Cu-Zn SOD and *Cyclophilin* in the piglet's livers(A)and hearts(B)

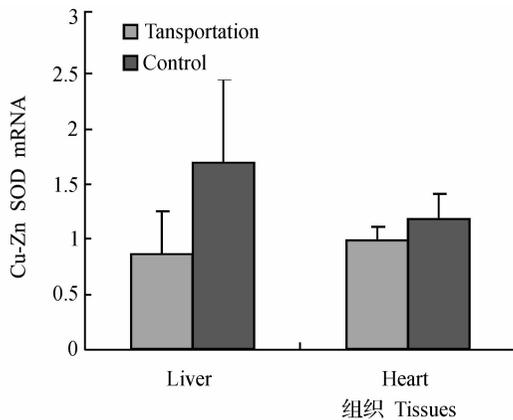


图2 运输对仔猪肝脏和心脏 Cu-Zn SOD mRNA 的影响

Fig. 2 Gene transcription for Cu-Zn SOD in liver and heart from piglets

3 讨论

3.1 2 h 运输应激降低了仔猪肝脏抗氧化功能

本研究表明,2 h 运输应激使仔猪肝脏抗氧化功能显著降低,除 T-AOC、CAT 比对照组仔猪显著降低外,其它反映细胞抗氧化功能的指标(T-SOD、Cu-ZnSOD、GSH)虽与对照组仔猪相比差异不显著,但也均有所下降,而 ROS 则有所升高,可能与下列因素有关:① 运输应激导致肝细胞缺血缺氧。众所周知,机体在应激时发生的血液再分配,使腹腔脏器血流量明显减少,肝细胞缺血缺氧,引起线粒体吸收大量 Ca^{2+} ,形成线粒体总钙超载^[8],使氧化磷酸化效率降低,ATP 合成减少,呼吸链得不到足够的电子,而致终末电子受体——氧分子发生还原,生成 O_2^- 并同时加剧细胞供能障碍。由于 Ca^{2+} 转运受影响, Ca^{2+} 通过蛋白激酶使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,进一步催化黄嘌呤氧化,生成大量 ROS; Ca^{2+} 还可激活磷脂酶 A2,产生的四烯酸增

加,经环氧化酶分解,产生 ROS,本试验结果也证实,运输应激后,肝脏中 ROS 有所增加。② 应激使机体能量消耗增多,引起细胞内 ATP 向 ADP、AMP 转变,致使次黄嘌呤氧化酶活性增强,在次黄嘌呤和黄嘌呤与氧反应生成尿酸的同时产生氧自由基^[9]。正常机体内,氧自由基的产生和清除处于动态平衡之中,当产生大于清除时,即造成自由基损伤。本试验中反应细胞自由基损伤的脂质过氧化产物 MDA 在运输组猪显著升高也证实了运输后仔猪肝细胞的抗氧化能力显著降低。由此可知,过量自由基对肝细胞的攻击是肝脏应激损伤的重要机制。

3.2 2 h 运输应激对仔猪心脏抗氧化功能的影响

2 h 运输对心脏的抗氧化能力影响不大。虽然运输后仔猪心脏产生的 ROS 有所上升,但由于其 T-AOC、T-SOD 活性也有所增强,说明本运输模式应激 2 h 的仔猪可代偿性增强抗氧化酶的活性以应对过多 ROS 的产生。主要原因可能是:其一,应激时神经内分泌变化的总效应,通常表现为血液的重新分配,使大脑、心脏等生命重要器官血量增多^[10],因此保证了心肌的氧供应,减缓了自由基的产生;其二,热休克蛋白(HSP)的保护作用,郁红等^[11]研究指出,2 h 运输能诱导仔猪心脏 HSP70 的表达,从而使心脏中 HSP70 蛋白含量升高。HSP 一方面可抑制产生自由基的关键酶,即 NADPH 氧化酶,反馈性地减少氧自由基的产生^[12];另一方面可增加内源性过氧化酶活性,从而增加清除氧自由基的功能;再者,HSP 作为分子伴侣保护细胞内抗氧化酶免受损伤,从而增强了心脏的抗氧化能力。

3.3 运输应激产生的 ROS 对仔猪心脏和肝脏 Cu-Zn SOD 基因表达的影响

为了解运输应激产生的 ROS 对抗氧化酶基因

表达的影响,作者对仔猪肝脏和心脏中以 Cu-Zn SOD 为代表的抗氧化酶基因表达进行了检测,结果表明,运输应激后仔猪肝脏和心脏中 Cu-Zn SOD mRNA 均有所降低,但差异不显著,这与二器官中 Cu-Zn SOD 酶活性相一致。有研究表明^[13-15], ROS 可以和 DNA 的特异操纵子结合,调节转录因子,如核因子 κ B(NF- κ B)的活性,从而调节多种蛋白质的基因表达,其中包括 Cu-Zn SOD 基因表达。据此推测,运输应激产生的 ROS 作为细胞内第二信使,可抑制 Cu-Zn SOD mRNA 的转录,使组织中 Cu-Zn SOD 活性降低。

3.4 2 h 运输对仔猪促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-2 的影响

目前,对应激反应中促炎细胞因子改变的研究正引起广泛关注^[4-5,16-17],因为绝大多数细胞因子既能调节免疫反应,也是重要的炎症介质,它们在提高机体免疫机能的同时,可促进炎症反应,造成组织损伤,因此也是应激性损伤的直接介导体。各种不同的应激因素能诱导 IL-1 β 、TNF- α 等促炎细胞因子的分泌^[18]。本研究发现,2 h 运输后,仔猪血清中 IL-1 β 和 IL-2 水平与对照组相比虽无显著差异,但两者均有所升高。IL-1 β 和 IL-2 由 Th1 细胞合成,是猪体内两种早期促炎细胞因子,还能调节其它细胞因子的合成。二者除了参与细胞免疫功能外,尚能直接损伤组织。因此,运输对仔猪器官的损伤作用是多种因素共同作用的结果,其中包括抗氧化功能的降低和促炎细胞因子的增加。

参考文献:

- [1] LEWIS N J. Transport of early weaned piglets[J]. *Applied Animal Behavior Science*, 2008, 110(1-2): 128-135.
- [2] WIRTZ P H, Von KäNEL R, EMINI L, et al. Variations in anticipatory cognitive stress appraisal and differential proinflammatory cytokine expression in response to acute stress[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2007, 21(6):851-859.
- [3] COUSSONS-READ M E, OKUN M L, NETTLLES C D. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2007, 21(3):343-350.
- [4] 范少光,丁桂凤. 神经内分泌和免疫系统之间的相互调节作用(一)[J]. *生物学通报*, 2000, 35(3):1-3.
- [5] 侯公林. 非稳态噪声对动物行为及心脏自由基损伤的影响[J]. *应用心理学*, 2002, 8(4):47-50.
- [6] 林海,杜荣. 热应激对肉鸡组织过氧化状态的影响[J]. *动物营养学报*, 2001, 13(2):30-32.
- [7] MLADENOV M, GJORGOSKI I, TRAJCE STAFILOV T, et al. Effect of vitamin C on lipid hydroperoxides and carbonyl groups content of rat plasma depending on age and acute heat exposure[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2006, 31(8):588-593.
- [8] 石增立. 病理生理学[M]. 北京:人民军医出版社, 2003:133-135.
- [9] BOLCAL C, YILDIRIM V, DOGANCI S, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury[J]. *Journal of Surgical Research*, 2007, 139(2):274-279.
- [10] 王树人. 病理生理学[M]. 成都:四川大学出版社, 2004:115-119.
- [11] 郁红. 不同品种仔猪的运输应激性损伤与 Hsp70 相关性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2007.
- [12] 刘理,杨宗城,罗向东,等. 热休克蛋白对烧伤后肾脏抗氧化酶的保护作用[J]. *重庆医学*, 2003, 32(6):661-663.
- [13] BURDON R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, 18(4):775-794.
- [14] RHEE S G, KANG S W, JEONG W, et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17:183-189.
- [15] ALLEN R G, TRESINI M. Oxidative stress and gene regulation[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 28(3):463-499.
- [16] BUCKMAN SPORER K R, XIAO L, TEMPELMAN R J, et al. Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 121(3-4):300-320.
- [17] BUCKHAM SPORER K R, BURTON J L, EARLEY B, et al. Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 118(1-2):19-29.
- [18] APPELS A, BÄR FW, BÄR J, et al. Inflammation, depressive symptomatology, and coronary artery disease[J]. *Psychosomatic Medicine*, 2000, 62:601-605.