

运输应激对猪脾脏 IL-2、IL-6 和 IL-10 mRNAs 表达的影响及其调控机制

吕琼霞¹, 张书霞¹, 赵茹茜^{1,2}

(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:【目的】探讨不同时间运输应激对猪脾脏中 IL-2mRNA、IL-6mRNA、IL-10mRNA 及其 IL-2RmRNA、IL-6RmRNA 表达的影响, 并探讨 P38MAPK - NF- κ B 信号途径对其表达的调控作用。【方法】将 19 头体重 50 kg 左右的猪随机分为 4 组, 分别进行 0、1、2 和 4 h 公路运输, 运输结束后立即扑杀取脾脏, 液氮保存, 用荧光定量 PCR 的方法对 3 种细胞因子及其 IL-2RmRNA、IL-6RmRNA 进行定量; 另用 ELISA 方法检测试验猪脾脏组织匀浆液中 P38MAPK 含量的动态变化; 激光扫描共聚焦显微镜观察 NF- κ B 运输前后在脾脏细胞中的分布。【结果】经 1、2 和 4 h 的运输应激后, 脾脏中 IL-10、IL-6 及 IL-6RmRNA 的表达发生了显著的变化, P38MAPK 变化不明显, NF- κ B 在脾脏中的表达是先上升, 随后稍微下降, 到 4 h 时又升高并高于其它 3 个组; 且 NF- κ B 的入核率也呈现同样的变化趋势。【结论】运输应激可引起猪脾脏 IL-6mRNA、IL-10mRNA 和 IL-6RmRNA 表达的显著变化, 且存在时效性; 相关性分析表明, 在所检测的 3 种细胞因子中, 脾脏主要对运输过程中 IL-6 水平起重要的调节作用, 结合细胞因子表达调控的信号机制表明, NF- κ B 可能对运输过程中猪脾脏相关细胞因子变化起重要的调控作用。

关键词: 猪; 运输应激; 免疫功能; P38MAPK; NF- κ B

Effects of Transportation Stress on Expressions of IL-2, IL-6 and IL-10 mRNAs in Spleen and Regulation of Cytokines in Pigs

LÜ Qiong-xia¹, ZHANG Shu-xia¹, ZHAO Ru-qian^{1,2}

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

Abstract: 【Objective】 The objective of this study was to explore expressions of IL-2, IL-6, IL-10 mRNAs, IL-2RmRNA and IL-6RmRNA in spleen and regulation of cytokines by P38MAPK - NF- κ B in pigs during truck transportation. 【Method】 Nineteen pigs were randomly divided into 4 groups for 0 h, 1 h, 2 h and 4 h transportation when mean live weight was approximately (50 \pm 2) kg (mean \pm standard deviation; SD). At the end of the transportation trial, the spleen was removed and frozen in liquid nitrogen. SYBR Green I-based one-step real-time quantitative RT-PCR amplification was performed in quantitation of the three cytokines, IL-2RmRNA and IL-6RmRNA. P38MAPK in the homogenization sample of spleen was measured with homologous specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The distribution of NF- κ B in the spleen was examined using confocal laser scanning microscope (CLSM). 【Result】 After 1 h, 2 h and 4 h of transportation, the expression level of IL-6, IL-10 and IL-6RmRNAs in spleen were significantly changed compared with the control group during transportation stress. NF- κ B in the spleen has a sharp rise at 1 h, followed by a slight decline, rise again at 4 h and higher than the other three groups. The rates of NF- κ B entry nuclear showed a similar trend, but there was no significant change with respect to P38MAPK. 【Conclusion】 The IL-6mRNA, IL-10mRNA and the expression of IL-6RmRNA could be significantly changed by transportation stress and were also related to the time of post-stress in pigs. Correlation analysis showed that the spleen is an important regulator of IL-6 levels among the detected three kinds of cytokines

收稿日期: 2009-03-02; 接受日期: 2009-11-03

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30430420)

作者简介: 吕琼霞, 博士研究生。E-mail: lvqx20001@163.com。通信作者张书霞, 教授。Tel: 025-84395316; E-mail: zsxnjau@yahoo.com.cn。
赵茹茜, 教授。E-mail: zhao.ruqian@gmail.com

during transportation stress. Combination of expression and regulation of cytokine signaling mechanism shows that the activation of NF- κ B in the spleen may be play an important role in the peripheral immune-related cytokines change in transport-stressed pigs.

Key words: pigs; transportation stress; immune function; P38MAPK; NF- κ B

0 引言

【研究意义】掌握运输应激对猪脾脏细胞因子表达的影响, 初步了解调节细胞因子表达的信号转导机制, 可为应激相关疾病的防治和动物福利的改善提供重要的理论依据。【前人研究进展】国内外研究已经证实, 应激能影响动物和人体的免疫机能^[1-2]。1977年, Besedovsky^[3]首次提出神经-内分泌-免疫网络假说, 揭示了神经内分泌系统与免疫系统之间存在的双向生物作用, 并且提出该作用最核心的问题就是应激对这个网络的影响。神经内分泌系统是调节机体内环境和沟通各系统之间关系的重要系统, 作为机体防御屏障的免疫系统与之必然存在着相互关系。这种联系是以共有的化学信息分子(神经递质、神经肽、细胞因子等)及其受体来实现的^[4-5]。有研究表明^[6-7], 细胞因子主要由免疫细胞生成, 是具有调节免疫功能的一些蛋白质, 它们的受体也可以在神经内分泌细胞上找到, 甚至某些神经内分泌细胞也可合成和释放细胞因子, 调节其功能^[8-9]。因此, 细胞因子不仅是调节免疫功能的蛋白质, 也是神经内分泌系统与免疫系统之间信息交流的重要介质。【本研究切入点】随着养猪业的发展, 猪的运输越来越普遍, 长途运输对猪产生的影响越来越受到国内外的关注^[10-13], 运输过程中免疫机能的变化是大多研究者关注的焦点。细胞因子的变化又是免疫机能变化的重点, 运输应激对猪脾脏细胞因子 mRNA 表达的影响究竟如何? 它又是受什么调控的? 至今仍知之甚少。笔者先前对运输过程中猪血清中细胞因子的研究已经证实, 受影响的细胞因子主要有 IL-2、IL-6 和 IL-10。本研究在此基础上, 进一步了解运输过程中, 猪重要免疫器官—脾脏中这 3 种细胞因子 mRNA 的动态变化及 P38MAPK - NF- κ B 信号系统对它们的调节作用。【拟解决的关键问题】利用荧光定量 PCR 方法测定运输过程中猪脾脏 IL-2、IL-6 和 IL-10 及其 IL-2R、IL-6R mRNAs 的动态变化, 用 ELISA 法测定运输过程中脾脏 P38MAPK 的表达变化, 并用激光共聚焦扫描显微镜观察脾脏细胞中 NF- κ B 的激活情况, 探讨运输过程中细胞因子表达的调节机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试验设计

将 19 头体重为 50 kg 的猪随机分为 A、B、C 和 D 4 组, 除对照组(A 组)4 头猪安置于正常饲养环境外, 其它试验组猪各 5 头用动物运输车辆分别进行 1 h (B 组)、2 h (C 组)、4 h (D 组)的运输应激, 路途运输模拟国内正常等级公路上的运输环境, 时速 50—60 km·h⁻¹。及时扑杀运输到设定时间的试验猪, 立即采集脾脏分别于 10%中性福尔马林中固定和液氮速冻后置-70℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗猪 NF- κ B 单克隆抗体(美国 UsncLife 公司产品), TRITC 标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德公司产品), 封闭用羊血清(北京索来宝公司产品), 染料 Hoechst33258 (Sigma), 猪特异性 P38MAPK ELISA 检测试剂盒(美国 ADL 公司产品), 荧光 PCR 仪 (Bio-Rad, USA), 激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Fluoview FV 1000, 日本), pGEM-T 载体、琼脂糖凝胶回收试剂盒和一步法反转录 PCR 试剂盒均为大连宝生物公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 荧光定量 PCR 法测定受试猪脾脏中 IL-2mRNA、IL-6mRNA、IL-10mRNA、IL-2RmRNA 和 IL-6RmRNA 的表达 将-70℃冰箱冷冻的猪脾脏样品置于盛有液氮的研钵中, 研成粉末, 适时补加液氮, 维持样品为粉末状。分装到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 每管 100 mg 左右, 冻存于-70℃冰箱备用。利用 TRIZOL 提取试验猪脾脏样品中的总 RNA (TRNA)。根据猪 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogease gene, GAPDH)、IL-2mRNA、IL-6mRNA、IL-10mRNA、IL-2RmRNA 和 IL-6RmRNA 的基因序列, 利用 primer premier 5.0 引物设计软件, 设计 GAPDH 基因和以上细胞因子及受体引物。并且通过 NCBI 中 Blast 功能, 初步检测引物的特异性。引物由宝生物(大连)工程有限公司合成, 用时溶解于 DEPC 处理的灭菌超纯水中, 引物浓度为 25 μ mol·L⁻¹, 分装并保存于-20℃。引物序列见表 1。

表 1 猪 IL-2mRNA、IL-6mRNA、IL-10mRNA、IL-2RmRNA、IL-6RmRNA 和 GAPDHmRNA 5'-3'引物序列

Table 1 Sequences (5'-3') of the primers used for the detection of mRNA specific for IL-2, IL-6, IL-10, IL-2R, IL-6R and GAPDH

名称	序列号	上游引物	下游引物	目的产物
Target	Accession number	Sense primer	Antisense primer	Amplicon (bp)
IL-2	X56750	CTGGATTTACAGTTGCTTTTG	AGTCAGTGTGAGTAGATGCTTT	347
IL-6	M80258	GGCTGCTTCTGGTGATGG	AGAGATTTTGCCGAGGATGTA	146
IL-10	L20001	GCATCCACTTCCCAACCA	GCAACAAGTCGCCCATCT	108
IL-2R	U78317	CACGAATCTTTGAAGCGAGT	CCTGGTTGGTTAGGAAGTTTATGTC	255
IL-6R	AF147881	CGCAGGCACCTACCACTA	GCTGTCCCAAGGAATACGG	246
GAPDH	AF017079	GAAGGTCGGAGTGAACGGAT	CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	149

以提取的 TRNA 作为模板, PCR 扩增目的片段。按照以下反应体系进行: 模板, 5 μ L; 10 \times PCR buffer, 2.5 μ L; RNA 酶抑制剂, 1 μ L; dNTP Mixture, 1 μ L; AMV 反转录酶, 1 μ L; Hs-Taq 聚合酶, 0.5 μ L; 上游引物, 1 μ L; 下游引物, 1 μ L; 灭菌蒸馏水加至 25 μ L。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳(含 EB), 在紫外灯下用刀片割取特异性条带, 用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 操作按试剂盒说明进行。将各扩增产物通过琼脂糖凝胶回收纯化后作连接反应: PCR 回收产物 1 μ L (约 60 ng), pGEM-T 载体 (50 ng $\cdot\mu$ L $^{-1}$) 1 μ L, 2 \times Rapid Ligation Buffer 5 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, DEPC 处理水 2 μ L, 混匀后置 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 轻轻混匀, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 s, 快速取出转移至冰浴 3 min, 加入 800 μ L SOC 培养基, 37 $^{\circ}$ C 150 r/min 振荡培养 3 h, 使抗性复苏。取 200 μ L 培养液涂布 LB 固体培养基平板(含 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 氨苄青霉素, 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ IPTG 和 50 μ g \cdot mL $^{-1}$ X-Gal), 37 $^{\circ}$ C 温箱中倒置培养过夜, 进行蓝白斑筛选。挑选白斑单克隆菌落在 LB 液体培养基(含 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 氨苄青霉素)中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 采用碱裂解法进行小量质粒的提取, 1%凝胶琼脂糖电泳检测。重组质粒进行 PCR 鉴定, PCR 结果经 1%凝胶琼脂糖电泳分析。阳性质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序, 测序正确即可以此质粒作为标准曲线的模板, 样品中相关基因 mRNA 的定量结果用 GAPDHmRNA 的含量作最后归一化处理。

1.3.2 ELISA (酶联免疫)法检测脾脏 P38MAPK 的含量 用电子天平准确称取样品组织 0.2 g, 液氮冷冻条件下于研钵内充分研磨组织成粉末。转移研磨后的组

织于玻璃匀浆器, 加入裂解缓冲液 1.0 mL (含蛋白酶抑制剂), 匀浆以充分裂解组织细胞。将匀浆液移至 Eppendorf 管, 静置 10 min, 12 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min。上清液转移至另一 Eppendorf 管, -20 $^{\circ}$ C 保存, 所有操作均在冰浴中进行。ELISA 法检测 P38MAPK 含量, 严格按试剂盒说明书操作, 每样品做 2 个复孔。按绘制的标准曲线, 换算出各样品中 P38MAPK 的浓度。

1.3.3 激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM) 检测 NF- κ B 在脾脏细胞中的分布 每个福尔马林固定组织各做 5 张连续切片, 切片厚度为 5 μ m, 60 $^{\circ}$ C 烘烤 0.5 h, 切片于二甲苯 I 和二甲苯 II 中各脱蜡 15 min; 无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%乙醇 I、95%乙醇 II、85%乙醇和 75%乙醇中各浸洗 5 min; 蒸馏水中漂洗 5 min 后, 双氧水/甲醇液处理 20 min; 蒸馏水中漂洗 5 min; 0.001 mol \cdot L $^{-1}$ 乙二胺四乙酸缓冲液 (pH 8.0) 中微波修复 20 min, 待冷却后, PBS 漂洗 5 min; 吸擦多余液体, 滴加 100 μ L 10%羊血清封闭液, 孵育 20 min; 甩去封闭液, 吸擦多余封闭液后, 滴加 100 μ L 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育; PBS 液中漂洗 10 min; 吸擦多余液体后, 滴加 100 μ L TRITC 标记的二抗, 孵育 60 min; PBS 液中漂洗 10 min; 吸擦多余液体后, 滴加 100 μ L 染料 Hoechst33258, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min; 甘油封片。另取 PBS 取代一抗作为阴性对照。激光共聚焦扫描显微镜观察并照相。照片中着染 Hoechst33258 染料的细胞核为蓝色, 粉红色部分为 NF- κ B 阳性染色, 紫红色为前面二者的同时着色。随机选取 300 个细胞, 可以计数出 NF- κ B 阳性细胞数和入核率。

1.4 数据处理

所有数据均以平均数 \pm 标准差 (X \pm SD) 表示, 统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件, 两组间比较采用独立样本 T 检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析。显著性差异水平为 $P < 0.05$, 极显著性差异水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 运输应激对猪脾脏中 IL-2mRNA 和 IL-2RmRNA 表达的影响

经 1、2、4 h 运输应激后, 猪脾脏中 IL-2mRNA 先下降, 随后开始上升, 2 h 时达最大值, 随后又逐渐下降, 但 4 h 时仍高于对照组。IL-2RmRNA 的表达呈逐渐上升趋势。但 IL-2mRNA 和 IL-2RmRNA 运输前后和运输过程中的表达统计学上均没有显著差异 (图 1)。

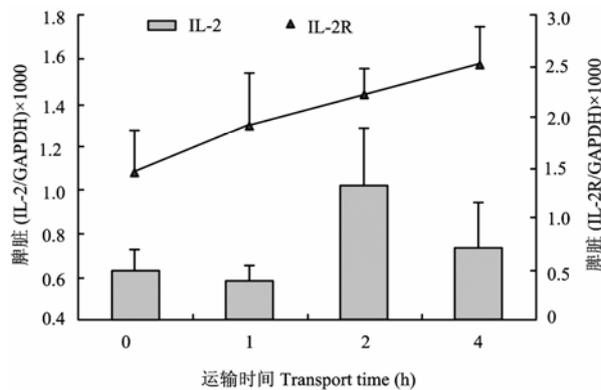


图 1 运输应激对猪脾脏中 IL-2 mRNA 和 IL-2 R mRNA 表达的影响

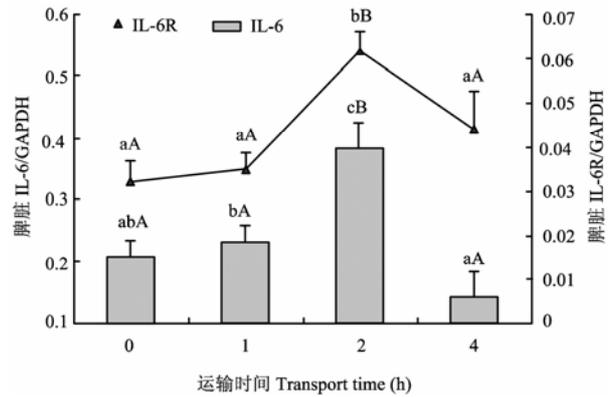
Fig. 1 The expression levels of IL-2 mRNA and IL-2 R mRNA in the spleen of transport stressed pigs

2.2 运输应激对猪脾脏中 IL-6mRNA 和 IL-6RmRNA 表达的影响

相对于对照组 (0.206 ± 0.029), IL-6mRNA 的表达先缓慢上升, 运输后 2 h 极显著提高 IL-6mRNA 在脾脏中的表达 ($P < 0.01$), 且此时达到最大值 (0.385 ± 0.041), 随后, IL-6mRNA 的表达开始下降, 到 4 h 时降到最低 (0.145 ± 0.039), 且在运输过程中, 4 h 相对 1 h 显著下降 ($P < 0.05$), 相对 2 h 极显著下降 ($P < 0.01$); IL-6RmRNA 的变化趋势与 IL-6mRNA 基本一致, 也是运输后 2 h 达最大值 (0.062 ± 0.004), 和对照组、1 h 组、2 h 组相比均有显著差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 运输应激对猪脾脏中 IL-10mRNA 表达的影响

IL-10mRNA 的表达先上升, 到运输后 2 h 时能明显提高 IL-10mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 且此时达到本试验过程的最大值 (0.189 ± 0.031); 然后逐渐下降,



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

The different capital and small letters in the same column stand for significance at 0.01 and 0.05 levels, respectively

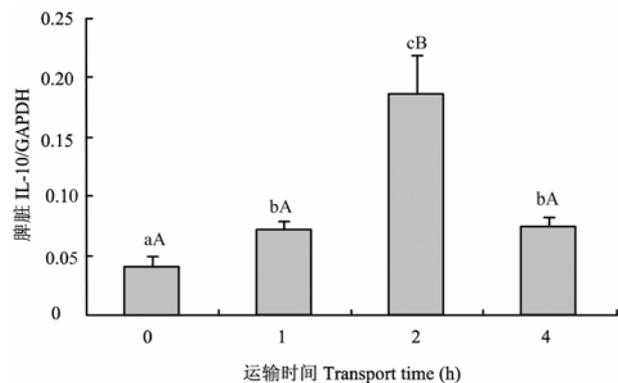
图 2 运输应激对猪脾脏 IL-6mRNA 和 IL-6RmRNA 表达的影响

Fig. 2 The expression levels of IL-6mRNA and IL-6RmRNA in the spleen of transport-stressed pigs

但到 4 h 仍显著高于对照组 ($P < 0.05$), 极显著低于 2 h ($P < 0.01$) (图 3)。

2.4 运输应激对猪脾脏中 P38MAPK 表达的影响

经 1、2、4 h 运输应激后, P38MAPK 含量是先微弱上升, 后下降, 随后又开始上升, 4 h 时又升高并高于其它 3 个组, 但运输前后和运输过程中 P38MAPK 含



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

The different capital and small letters in the same column stand for significance at 0.01 and 0.05 levels, respectively

图 3 运输应激对猪脾脏中 IL-10mRNA 表达的影响

Fig. 3 The expression levels of IL-10mRNA in the spleen of transport-stressed pigs

量的变化均没有统计学的差异（图 4）。

2.5 运输应激对 NF-κB 在猪脾脏细胞中分布的影响

图 5 表示的是不同时间脾脏细胞中 NF-κB 的表达和分布情况。图中可见，运输前，大多细胞中无 NF-κB 的表达，且 NF-κB 主要位于细胞浆；随着运输时间的增加，表达 NF-κB 的细胞数逐渐增加，同时进入核内的 NF-κB 也增加，到运输后 4 h 表达 NF-κB 的细胞达到 87.3%，入核率达到 95.8%（表 2）。

2.6 运输应激过程中猪脾脏各种细胞因子表达间的相关性

猪运输过程中各种细胞因子在血清中的含量^[14]和脾脏中细胞因子及其受体表达的相关性分析结果见表 3。

3 讨论

随着养猪业的发展，猪的运输越来越普遍，运输对猪造成的应激越来越受到国内外的关注^[10-13]。运输

过程中，猪免疫机能变化的动态过程以及与此相关的机理，是制定抗应激措施的重要依据。脾脏作为一种重要的外周免疫器官，观察其应激后细胞因子的表达变化及调控机制对阐明运输应激对猪免疫机能的影响

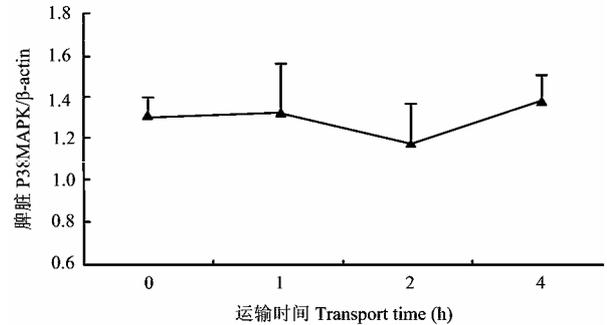


图 4 运输应激猪脾脏中 P38MAPK 含量的变化

Fig. 4 The concentration of P38MAPK in the spleen of transport-stressed pigs

表 2 NF-κB 在运输应激猪脾脏细胞中的表达和分布

Table 2 The expression and distribution of NF-κB in the spleen of transport-stressed pigs

运输时间 Transport time (h)	细胞总数 Total cells	阳性细胞数 Positive cells	阳性率 Positive rate (%)	NF-κB 的位置 Location of NF-κB		
				细胞浆 Cytoplasm	细胞核 Nucleus	入核率 Into the nucleation rate (%)
0	300	78	26	68	10	12.8
1	300	224	74.7	32	192	85.7
2	300	191	63.7	38	153	80.1
4	300	262	87.3	11	251	95.8

表 3 猪运输过程中血清细胞因子含量和脾脏中相关细胞因子及其受体表达之间的皮尔森相关系数

Table 3 Pearson correlation coefficients (top number) and P-values (lower number) between the serum cytokine and cytokine mRNA, cytokine receptor in the spleen of transport-stressed pigs during transportation

	IL-2	IL-6	IL-10	IL-2mRNA	IL-6mRNA	IL-10mRNA	IL-2RmRNA	IL-6RmRNA
IL-2	-							
IL-6	0.554 0.014*	-						
IL-10	0.659 0.002**	0.870 0.000***	-					
IL-2mRNA	0.497 0.050	-0.299 0.172	0.279 0.190	-				
IL-6mRNA	0.515 0.043*	0.669 0.009**	0.663 0.009**	0.232 0.234	-			
IL-10mRNA	0.413 0.091	0.208 0.258	0.307 0.166	0.460 0.066	0.743 0.003**	-		
IL-2RmRNA	-0.316 0.158	-0.352 0.131	-0.388 0.106	0.046 0.444	-0.103 0.375	0.302 0.170	-	
IL-6RmRNA	0.115 0.361	0.120 0.355	0.079 0.404	0.445 0.074	0.604* 0.019	0.874 0.000***	0.350 0.132	-

*, **和 ***分别表示 P<0.05, 0.01 和 0.001 在对应列和行之间差异的显著性

*, **, and *** indicate P<0.05, 0.01, and 0.001, respectively, for significant differences between the corresponding row and line

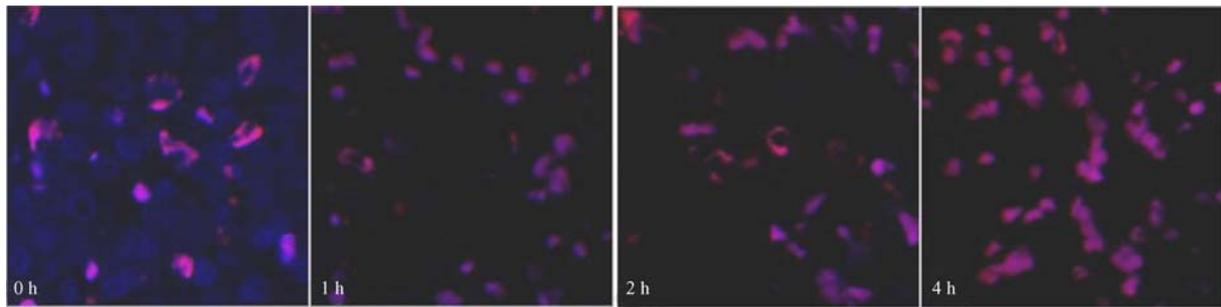


图 5 运输应激猪脾脏细胞中 NF- κ B 的分布情况

Fig. 5 The distribution of NF- κ B in the spleen of transport-stressed pigs

至关重要。

笔者之前的研究表明,猪在运输过程中,血清中受影响的细胞因子主要是 IL-2、IL-6 和 IL-10,其它细胞因子的变化不大(数据未列出)。为深入了解运输过程中细胞因子变化的本质及其调控规律,笔者测定了脾脏中这 3 种细胞因子及其受体 mRNA 表达及其 P38MAPK-NF- κ B 对它们的调控作用。

在运输前后和过程中猪脾脏中上述 3 种细胞因子及 IL-2RmRNA 和 IL-6RmRNA 的表达均发生了变化,但以 IL-6mRNA、IL-6RmRNA 及 IL-10mRNA 表达的变化更为显著,这说明运输应激对猪脾脏细胞因子转录的影响存在选择性。关于应激过程中细胞因子释放的时相,一些研究已经证明 TNF 似乎是失血性应激后释放的第一个细胞因子,而 IL-6, IL-8 的产生较晚,但两者在体内持续的时间较长。Schroder 等^[15]也证实,在应激原刺激下能引起肠道单核细胞释放 TNF 增高,但不引起脾脏巨噬细胞释放 TNF 增高,却能引起脾脏巨噬细胞释放 IL-6 显著增加。本试验结果可见,运输对猪脾脏表达 IL-6mRNA 和 IL-10mRNA 的影响较大,均是运输后 2 h 达到最大值,且 IL-6mRNA 水平与血清 IL-6 含量又明显正相关($F=0.669$, $P=0.009$),因此脾脏是猪运输过程中调节 IL-6 水平的重要器官。且从相关性分析来看,脾脏中 IL-6mRNA 的表达和血清中的 IL-10 也存在明显的正相关($F=0.663$, $P=0.009$),IL-6 被认为是具有促炎和抗炎双重作用的细胞因子^[16],也是猪健康状况重要的早期指示物^[17],而 IL-10 是主要的抗炎细胞因子^[18],这两种细胞因子在应激后 2 h 时达到峰值,说明运输应激在影响免疫机能的同时,又可以通过细胞因子的释放控制损伤的发生和发展。

P38 丝裂素活化蛋白激酶(P38MAPK),是有丝

分裂素活化的蛋白激酶家族的一个成员,通过对细胞内信号的传递参与细胞对外界许多刺激的调节反应,是多种细胞因子、炎症介质调控细胞增殖、分化与凋亡的共同早期信号通路^[19-20]。本试验结果显示,脾脏 P38MAPK 的表达在运输前后和运输过程中没有发生显著变化,可能暗示 P38MAPK 在脾脏 IL-2mRNA、IL-6mRNA 和 IL-10mRNA 及其受体的表达中不是关键的调控因子。

细胞因子的大量释放导致机体过度的炎症反应(即所谓的“瀑布样效应”)从而引起多器官损害,然而促炎性细胞因子、趋化因子、黏附因子等基因的活化和表达均受到 NF- κ B 调控^[21-22]。NF- κ B 是普遍存在于真核细胞的一种快反应转录因子,在静息状态的细胞中与抑制性蛋白 I κ B 结合并以非活性状态存在于胞浆中,细胞受到刺激后,IKK 被激活,从而使 I κ B 经快速磷酸化、泛素化后降解,暴露出 NF- κ B 的核定位序列, NF- κ B 发生核移位,并与特定的 κ B 序列结合,引起相应靶基因的转录激活^[21]。在许多炎症反应性疾病中, NF- κ B 可被高度激活,但是目前还是不太清楚,炎性细胞因子的产生是 NF- κ B 发生核移位的原因还是结果。本研究结果显示,运输应激后 NF- κ B 的入核率呈较大幅度的升高。Clemens 等^[23]发现,大鼠全脑缺血 30 min,再灌注 72 h 后海马 CA1 区 NF- κ B 发生核转位,几种实验动物模型已证实,抑制 NF- κ B 的激活可持续有效的控制炎性反应性疾病,可以推测正是由于 NF- κ B 在应激后 2 h 突然升高而引起的炎性细胞因子释放,使炎性反应逐级扩大,导致应激后 4 h 炎性反应的高峰。虽然从笔者的结果上看, NF- κ B 入核率的变化和 IL-10mRNA, IL-6mRNA 及其 IL-6RmRNA 的变化并非一对一的对应关系,但也暗示 NF- κ B 对脾脏细胞因子表达可能起一定的调控作用。

4 结论

本试验条件下, 运输应激能改变猪脾脏中 IL-10mRNA, IL-6mRNA 及其 IL-6RmRNA 的表达, 并与 NF- κ B 信号有关; 相关性分析表明, 在所检测的 3 种细胞因子中, 脾脏主要对 IL-6 表达起重要的调节作用。

References

- [1] Lawrence DA, Kim D. Central/peripheral nervous system and immune responses. *Toxicology*, 2000, 142(3): 189-201.
- [2] Padgett D A, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 2003, 24: 444-448.
- [3] Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clinical and Experimental Immunology*, 1977, 27(1): 1-12.
- [4] Besedovsky H O, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 1996, 17(1): 64-102.
- [5] Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annual Review Immunology*, 1995, 13(1): 307-338.
- [6] 杨竞平, 杨贵贞. 人参皂甙对应激免疫抑制小鼠模型中中枢神经肽 Y 和儿茶酚胺类递质的影响. *中国免疫学杂志*, 1993, 9(1): 36-38.
Yang J P, Yang G Z. The effects of ginsenoside on the central neuropeptide Y and catecholamines in amputation-stressed mice. *Chinese Journal of Immunology*, 1993, 9(1): 36-38. (in Chinese)
- [7] Glaser R, MacCallum R C, Laskowski B F, Malarkey W B, Sheridan J F, Kiecolt-Glaser J K. Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *The Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2001, 56: 477-482.
- [8] 张彩霞, 邵 斌, 赵茹茜, 张书霞. 运输应激对二花脸仔猪细胞免疫机能的影响. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 985-988.
Zhang C X, Shao B, Zhao R Q, Zhang S X. The influence of transportation stress on cell-mediated immune functions in erhualian piglets. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(7): 985-988. (in Chinese)
- [9] Carrasco G A, Van de Kar L D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 463(1/3): 235-272.
- [10] 李玉保, 鲍恩东, 王志亮, 赵茹茜. 荧光定量 RT-PCR 法检测运输应激猪热休克蛋白 mRNA 转录水平. *中国农业科学*, 2006, 39(1): 187-192.
Li Y B, Bao E D, Wang Z L, Zhao R Q. Detection of HSP mRNA transcription in transport stressed pigs by fluorescence quantitative RT-PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(1): 187-192. (in Chinese)
- [11] Yu H, Bao E D, Zhao R Q, Lv Q X. Effect of transportation stress on heat shock protein 70 concentration and mRNA expression in heart and kidney tissues and serum enzyme activities and hormone concentrations of pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 2007, 68: 1145-1150.
- [12] Li L A, Xia D, Bao E D, Wei S, Xiao J S, Bao J W, Chen W H, Chen J, Hartung J, Zhao R Q. Erhualian and Pietrain pigs exhibit distinct behavioral, endocrine and biochemical responses during transport. *Livestock Production Science*, 2008, 113: 169-177.
- [13] Bao E D, Sultan K R, Nowak B, Hartung J. Localization of heat shock proteins and histopathological changes in the kidneys of transported pigs. *Livestock Production Science*, 2008, 118(3): 231-237.
- [14] 吕琼霞, 张书霞, 赵茹茜. 运输应激对猪免疫功能的影响及其细胞因子的调控. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2579-2585.
Lü Q X, Zhang S X, Zhao R Q. Effects of transportation stress on immune function and regulation of cytokines in pigs. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2579-2585. (in Chinese)
- [15] Schröder J, Kahlke V, Fändrich F, Zabel P, Kremer B. Tumor necrosis factor- α hyporesponsiveness of rat intestinal mononuclear cells and whole portal venous blood after hemorrhagic. *Critical Care Medicine*, 1998, 26(3): 526-532.
- [16] Adrew S, Mark H, Yoichi C. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2007, 21: 901-912.
- [17] Leanne S S, Ken M C, Isabelle V, Deirdre F G, Artur S, Jens N, Francis M C, Brain M A, Gordon M A. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunology*, 2006, 19(2): 189-195.
- [18] Norman J G. New approaches to acute pancreatitis: role of inflammatory mediators. *Digestion*, 1999, 60(1): 57-60.
- [19] Tian W, Zhang Z, Cohen D M. MAPK signaling and the kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2000, 279: F593-604.
- [20] Lee J C, Kumar S, Griswold D E, Underwood D C, Votta B J, Adams J L. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2/3): 185-201.
- [21] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 1994, 12: 141-179.
- [22] Campbell K J, Perkins N D. Regulation of NF- κ B function. *Biochemical Society Symposium*, 2006, 73: 165-180.
- [23] Clemens J A, Stephenson D T, Yin T, Smalstig E B, Panetta J A, Little S P, Dietrich W D, Bethea J. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor- κ B in rats. *Stroke*, 1998, 29 (3): 677-682.

(责任编辑 林鉴非)