

乙酰乙酸抑制脂多糖诱导的奶牛中性粒细胞炎症信号通路的激活

于春微¹ 张玉明² 邓清华²

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古民族大学 动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要 为研究乙酰乙酸 (Acetoacetic acid, AcAc) 对奶牛中性粒细胞炎症信号通路的影响, 以脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的奶牛中性粒细胞炎症模型为研究对象, 利用 qRT-PCR、生化和酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IKK β 激酶活性。结果表明: 1) qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比较, LPS 处理组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达显著增强 ($P < 0.01$)。与 LPS 处理组比较, LPS+AcAc 混合处理组, 其表达量显著下调 ($P < 0.05$); 2) 生化检测结果显示, 与对照组相比较, LPS 处理组中性粒细胞 IKK β 激酶活性显著增强 ($P < 0.01$)。与 LPS 处理组比较, LPS+AcAc 混合处理组 IKK β 激酶活性则显著降低 ($P < 0.05$); 3) ELISA 结果显示, 与对照组相比较, LPS 增加促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放。相对于 LPS 处理组, LPS+AcAc 混合处理组促炎因子的释放则显著降低 ($P < 0.01$)。综上, AcAc 可以抑制 LPS 诱导的奶牛中性粒细胞炎症信号通路的激活, 具有一定的抗炎功能。

关键词 奶牛; 中性粒细胞; 酮体; 炎症; 先天免疫

中图分类号 S856.5

文章编号 1007-4333(2019)08-0088-06

文献标志码 A

Acetoacetic acid inhibits the activation of inflammatory signal pathway in lipopolysaccharide-stimulated cow neutrophils

YU Chunwei¹, ZHANG Yuming², DENG Qinghua²

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract To study the effect of acetoacetic acid (AcAc) on neutrophil inflammatory signaling pathway in dairy cows, a cow neutrophil inflammation model induced by lipopolysaccharide (LPS) was used as the research object. qRT-PCR, biochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods were adopted in this study. The results showed that: 1) Compared with the control group, the qRT-PCR results showed that the mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly increased in LPS treatment group ($P < 0.01$), while their expression levels were significantly decreased in LPS + AcAc treated group than those in LPS treated group ($P < 0.05$); 2) Compared with the control group, the biochemical test results showed that the activity of IKK β kinase was significantly increased in LPS treated group ($P < 0.01$), Its activity was significantly decreased in LPS + AcAc treated group than that in LPS treated group ($P < 0.05$); 3) Compared with the control group, the ELISA results showed that LPS increased the release of pro-inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β . These pro-inflammatory factors were significantly decreased in LPS + AcAc treated group than that in LPS treated group ($P < 0.01$). The results suggested that AcAc inhibited the activation of inflammation signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated cow neutrophils and played anti-inflammatory function.

Keywords cow; neutrophils; ketosis; inflammation; innate immune

收稿日期: 2018-11-22

基金项目: 青年科学基金项目(31602121)

第一作者: 于春微, 博士研究生, E-mail: yuchunweio@sina.com

酮病是过渡期奶牛高发的营养代谢性疾病,以酮体(乙酰乙酸、 β -羟丁酸和丙酮)居高为临床病理学特征^[1],可导致酮病奶牛先天免疫功能受到抑制,尤其是针对中性粒细胞的炎症调节功能。奶牛酮病主要是由于机体大量的能量需求,调动脂肪分解来满足机体能量需求,导致血液游离脂肪酸含量上升,游离脂肪酸经肝脏 β -氧化的生理过程产生乙酰乙酸、丙酮和 β -羟丁酸,即酮体^[2]。

酮体产生后,奶牛血液中先天免疫细胞-中性粒细胞的免疫机能发生改变,如炎症、细胞趋化、吞噬、氧化爆发等免疫机能均受到抑制,从而增加传染性疾病的易感性^[3]。已有研究表明酮病奶牛存在持续性炎症^[4],这可能与中性粒细胞的炎症功能有关,其作为主要的炎症性细胞促进细胞因子的释放,过渡性炎症则造成机体长期处于炎症状态中,这一循环过程导致细胞和组织损伤。酮体可使白细胞介素-1 I 型受体(IL-1R1), II 型受体(IL-1R2),肿瘤坏死因子受体超家族成员 25(TNFRSF25)和 IL-6 表达显著增加^[5]。中性粒细胞通过激活 Toll 样受体(TLRs)和核因子 κ B(NF- κ B)/Rel 家族产生促炎细胞因子,酯多糖(LPS)作为 TLRs 的配体,可以激活 Toll 样受体,继而激活炎症信号通路,促进炎症细胞因子的释放^[6]。酮体中 β -羟丁酸能够抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症信号 NF- κ B 通路的激活,发挥抗炎作用^[7]。乙酰乙酸作为酮体成分之一,在血液中的含量比 β -羟丁酸要少,只有 20% 左右^[8]。然而,当乙酰乙酸浓度升高后,其调节细胞内脂质代谢的能力要强于丙酮和 β -羟丁酸^[9]。

目前对乙酰乙酸抑制脂多糖诱导的奶牛中性粒细胞炎症信号通路的激活方面的研究较少,尚不清楚其是否会影响中性粒细胞的炎症应答过程。本试验拟以 LPS 诱导的奶牛中性粒细胞炎症模型为研究对象,通过添加不同浓度的乙酰乙酸(AcAc)(0、0.36、0.50、1.00、2.00 mmol/L)及 LPS(100 ng/mL)作用于分离的奶牛中性粒细胞,探究高浓度的 AcAc 是否抑制 LPS 诱导中性粒细胞炎症信号通路的激活,从而进一步阐明酮病奶牛免疫受抑制的机制。

1 材料与方法

1.1 主要抗体及试剂

肝素钠(sigma 公司),牛的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β ELISA 试剂盒(上海将来试剂有限公司);

Trizol (Invitrogen 公司);牛外周血中性粒细胞分离试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);胎牛血清和 RPMI-1640 培养基 Gibco; β -actin 抗体(Santa 公司);24 孔板和滤器等(Corning 公司);乙酰乙酸(AcAc)粉末(Sigma 公司);脂多糖(LPS)(Sigma);IKK β 活性检测试剂盒(GenMed Scientifics 公司)。

1.2 中性粒细胞的分离

按张玉明等^[10]的分离方法,取经产奶牛(内蒙古农业大学)50 mL 新鲜抗凝血,与全血及组织稀释液按体积比 1:1 混匀后加于 1 份 A 液(试剂盒里面包含)液面上,1 800 r/min 离心 25 min(半径为 15 cm 的水平转子),此时离心管中由上至下分 4 层:第 1 层为血浆层;第 2 层为环状乳白色的单个核细胞层;第 3 层为略带混浊的分离液层(富集一定量的中性粒细胞);第 4 层为红细胞层。弃去第 1 层血浆层及第 2 层细胞,收集第 3 层分离液层和第 4 层红细胞层,放入含有洗涤液的试管中,充分混匀后,2 100 r/min 离心 30 min。沉淀经 1 次洗涤后用红细胞裂解液裂解红细胞,再经 3 次洗涤去除红细胞内容物和碎片后取沉淀细胞即为所需中性粒细胞。

1.3 细胞培养

按张玉明等^[10]的研究方法进行操作,将细胞密度调整为 2×10^6 个/mL,用含 10% 犊牛血清的 RM-1640 培养基接种于 24 孔培养板内,预培养 30 min 后,添加 LPS(100 ng/mL)作用 1 h,再添加 AcAc 培养 4 h 后,收集细胞及培养液上清,备用。

1.4 样品 cDNA 的制备

按张玉明等^[10]的研究方法进行操作,收集 LPS 处理的中性粒细胞,加入 Trizol 抽提试剂,提取总 RNA,测定其 mRNA 浓度,并经反转录获得 cDNA,后进行 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等基因转录水平的检测。

1.5 荧光定量试验

按张玉明等^[10]的研究方法进行操作,采用 SYBR Green I qRT-PCR 方法检测炎症通路关键分子 mRNA 表达水平,根据 GenBank 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 β -actin mRNA 序列和引物设计原则,利用 Primer 5.0 软件设计引物。荧光定量 PCR 反应体系(20 μ L)如下:Rox (10 μ L);上游引物(1 μ L)、下游引物(1 μ L);模板 cDNA 1 μ L;ddH₂O

(7 μL)。反应条件均为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,共计 45 个循环。采用 ABI7500 型荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)进行 qRT-PCR。

1.6 IKK β 激酶活性检测

将培养的中性粒细胞收集到 1.5 mL 离心管中,3 500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃去培养液,将细胞用 PBS 洗涤 2 遍,用移液器将细胞转移到新的离心管中,用 IKK β 活性检测试剂盒检测 IKK β 激酶活性,具体步骤严格按照说明书进行操作。

1.7 ELISA 试验

按张玉明等^[10]的研究方法进行操作,分别测定培养液上清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量,方法及步骤严格按照试剂盒说明书进行(上海将来试剂有限公司)。

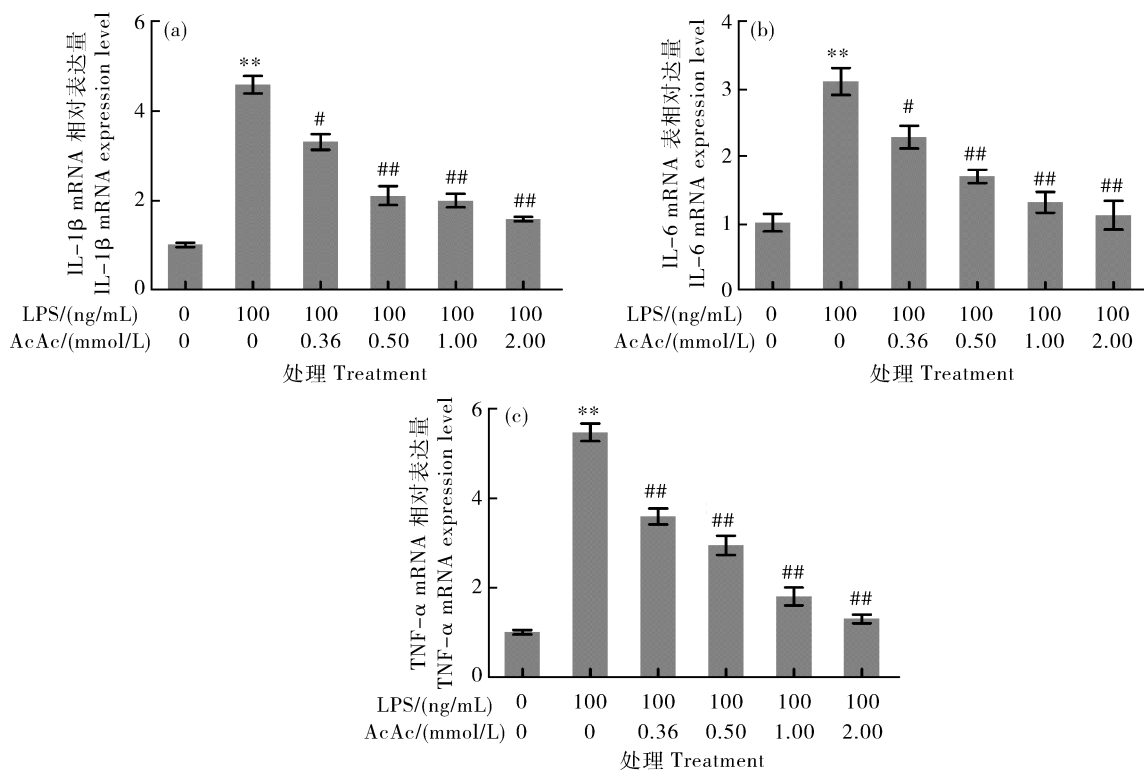
1.8 数据处理

采用 SPSS 17.0 进行数据处理,采用单因素方差分析(ANOVA)和多重比较分析(LSD), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 AcAc 抑制 LPS 诱导的奶牛中性粒细胞促炎细胞因子 mRNA 的表达

以 LPS 和不同浓度 AcAc 处理的奶牛中性粒细胞 cDNA 为模板,进行 qPCR 分析。如图 1 所示,与对照组相比较,LPS 显著增加 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达($P < 0.01$);与 LPS 处理组相比较,LPS + AcAc 混合处理组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达显著下降,且对 AcAc 具有一定的浓度依赖性($P < 0.01$)。



与 0 ng/mL LPS 处理组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与 100 ng/mL LPS 处理组相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。下同。
Compared with the 0 ng/mL LPS treated group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the 100 ng/mL LPS treated group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. The same below.

图 1 奶牛中性粒细胞 IL-1 β (a)、IL-6(b)和 TNF- α (c) mRNA 表达水平

Fig. 1 mRNA expression levels of IL-1 β (a), IL-6 (b) and TNF- α (c) in the neutrophils of cow

2.2 AcAc 抑制 LPS 诱导的奶牛中性粒细胞 IKK β 激酶的活性

用 IKK β 活性检测试剂盒检测中性粒细胞

IKK β 激酶活性,结果如图 2 所示,与对照组相比较,LPS 显著增加 IKK β 激酶活性($P < 0.01$);与 LPS 处理组相比较,LPS + AcAc 混合处理组的

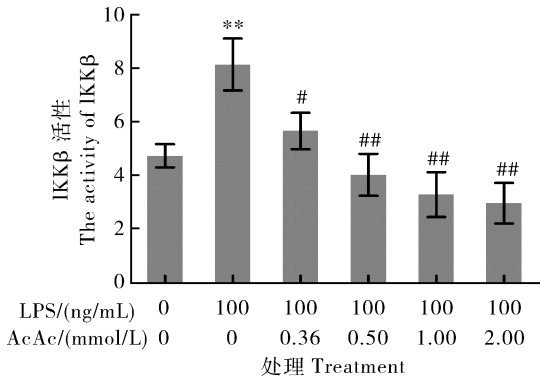


图 2 奶牛中性粒细胞 IKKβ 激酶活性

Fig. 2 The activity of IKKβ in the neutrophils of cow

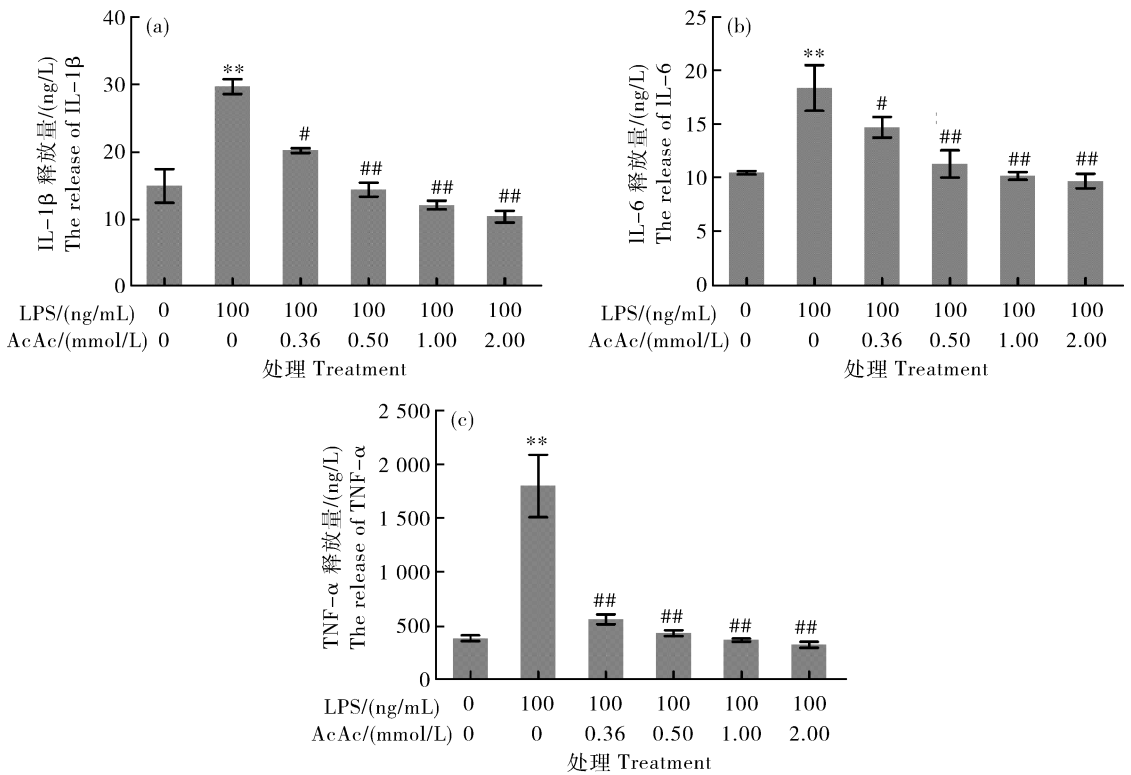


图 3 奶牛中性粒细胞 IL-1β(a)、IL-6(b)和 TNF-α(c)分泌量

Fig. 3 Secretion of IL-1β (a), IL-6 (b) and TNF-α (c) in the neutrophils of cow

3 讨论与结论

奶牛酮病在某些方面与人糖尿病相似^[11]，都属于代谢性疾病。在对人糖尿病的研究中证明 AcAc 可以作为信号分子在细胞内信号通路方面发挥作用^[12]。乙酰乙酸是酮体的主要成分，其能否调节酮病奶牛中性粒细胞内炎症信号通路尚不清楚。脂多糖是一种细菌毒力因子，是一种常见的炎症触发因子^[13-14]。Toll 样受体 4(TLR4)是一种能被 LPS 激活的模式识别受体。一旦被 LPS 激活，TLR4 可通

IKKβ 激酶活性显著下降，同时也对 AcAc 有一定浓度依赖性($P < 0.01$)。

2.3 AcAc 抑制 LPS 诱导的奶牛中性粒细胞促炎细胞因子的释放

用 ELISA 法检测中性粒细胞培养液上清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量，结果见图 3；与对照组相比较，LPS 显著增加 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的释放量($P < 0.01$)；与 LPS 处理组相比较，混合处理组的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的释放量显著下降，同时也对 AcAc 有一定浓度依赖性($P < 0.01$)。

过下游 NF-κB 信号传递途径调控促炎因子(IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等)的基因表达^[15]。Li 等^[16]研究发现，单独添加 AcAc 能增加肝细胞 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达。在本试验 LPS 诱导的炎症模型中，qRT-PCR 结果表明，与对照组相比，LPS 显著增加 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达，说明 LPS 可以激活炎症信号通路。LPS+AcAc 混合处理组则抑制了促炎细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达，说明 AcAc 可以抑制炎症信号通路的活化。

NF- κ B 是重要的炎症核转录因子,抑制状态时与抑制蛋白 I κ B α 结合^[17]。当被外界炎症性物质刺激后,NF- κ B 单位 p65 与其抑制蛋白 I κ B 分离,发生转移,从而促进细胞因子基因表达^[18]。细胞因子不仅造成炎症环境,还会循环作用于释放细胞,导致炎症的循环发生^[19]。已有研究表明乳房炎的发生可能是由于巨噬细胞等释放过多的促炎因子造成微生物侵入所致^[20-21]。Li 等^[16] 研究发现,单独添加 AcAc 能增加肝细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放。本试验中,与对照组相比,LPS 显著增加促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放;LPS+AcAc 混合处理组则表现出相反的趋势,抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,进一步证实了 AcAc 可以抑制炎症信号通路激活,具有一定的抗炎功能。本试验与 Li 等^[16] 研究结果不同,可能是在其试验中 AcAc 作为毒力因子,改变了细胞的脂毒性造成炎症反应,而在本试验 LPS 诱导的炎症模型中发现 AcAc 与 β -羟丁酸一样,发挥抗炎作用。

IKK β 直接调节 I κ B α 的磷酸化,只有 I κ B α 发生磷酸化后,才能激活 NF- κ Bp65,促进细胞因子释放^[22-24]。本试验中,与对照组相比,LPS 显著增强 IKK β 激酶活性,AcAc 和 LPS 混合处理组则表现为抑制状态。进一步证实 AcAc 抑制了 LPS 诱导中性粒细胞炎症信号通路的激活。

综上,AcAc 可通过抑制 LPS 诱导中性粒细胞炎症信号通路的激活,这可能是酮病奶牛免疫被抑制的原因之一。

参考文献 References

- [1] Gordon J L, LeBlanc S J, Duffield T F. Ketosis treatment in lactating dairy cattle [J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2013, 29(2): 433-445
- [2] Holtenius P, Holtenius K. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: A review [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 1996, 43(10): 579-587
- [3] Hammon D S, Evjen I M, Dhiman T R, Goff J P, Walters J L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113(1-2): 21-29
- [4] Jain S K, Kannan K, Lim G, Matthews-Greer J, McVie R, Bocchini J A. Elevated blood interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by acetoacetate-treated cultured U937 monocytes [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(7): 2139-2143
- [5] Loor J J, Everts R E, Bionaz M, Dann H M, Morin D E, Oliveira R, Rodriguez-Zas S L, Drackley J K, Lewin H A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows [J]. *Physiological Genomics*, 2007, 32(1): 105-116
- [6] Zhou G X, Liu Z. Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease [J]. *Journal of Digestive Diseases*, 2017, 18(9): 495-503
- [7] Fu S P, Li S N, Wang J F, Li Y, Xie S S, Xue W J, Liu H M, Huang B X, Lv Q K, Lei L C, Liu G W, Wang W, Liu J X. BHBA suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Mediators of Inflammation*, 2014, 2014(2): 983401
- [8] 李建, 王银龙, 刘强, 木尔扎提, 桂光磊, 赛务加甫. 酮病奶牛乳液与血液中 β -羟丁酸浓度的相关性试验 [J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(1): 17-19
Li J, Wang Y L, Liu Q, Mu E Z T, Gui G L, Sai W J F. The study of relationship of the concentration of β -hydroxybutyric acid in milk with that in serum from ketotic cows [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(1): 17-19 (in Chinese)
- [9] Jain S K, McVie R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes *in vitro* and in type 1 diabetic patients [J]. *Diabetes*, 1999, 48(9): 1850-1855
- [10] 张玉明, 雷林, 蒋兴华, 杜希良, 高文文, 邓清华, 王哲, 李心慰, 刘国文. NEFA 对体外培养奶牛中性粒细胞 TLR2/4 介导的炎症信号通路的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(4): 626-630
Zhang Y M, Lei L, Jiang X H, Du X L, Gao W W, Deng Q H, Wang Z, Li X W, Liu G W. Effect of high concentrations of NEFA on TLR2/4-mediated inflammatory signaling pathway in dairy cattle neutrophils cultured *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(4): 626-630 (in Chinese)
- [11] Abdelmegeed M A. Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured rat hepatocytes: Role of oxidative stress [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004, 310(2): 728-736
- [12] Jain S K, McVie R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes *in vitro* and in type 1 diabetic patients [J]. *Diabetes*, 1999, 48(9): 1850-1855

- [13] Atabai K, Matthay M A. The pulmonary physician in critical care 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: Definitions and epidemiology[J]. *Thorax*, 2002, 57(5):452-458
- [14] Shi J J, Zhao Y, Wang Y P, Gao W Q, Ding J J, Li P, Hu L Y, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS[J]. *Nature*, 2014, 514(7521):187-192
- [15] Ibeagha-Awemu E M, Lee J W, Ibeagha A E, Bannerman D D, Paape M J, Zhao X. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells[J]. *Veterinary Research*, 2008, 39(2):11
- [16] Li Y, Ding H Y, Wang X C, Liu L, Huang D, Zhang R H, Guo L H, Wang Z, Li X B, Liu G W, Wu J J, Li X W. High levels of acetoacetate and glucose increase expression of cytokines in bovine hepatocytes, through activation of the NF- κ B signalling pathway[J]. *Journal of Dairy Research*, 2016, 83(1):51-57
- [17] Baeuerle P A, Baichwal V R. NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules [J]. *Advances in Immunology*, 1997, 65:111-137
- [18] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide; evidence for TLR4 as the Lps gene product[J]. *Journal of Immunology*, 1999, 162(7):3749-3752
- [19] Sordillo L M, Streicher K L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility [J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, 7(2):135-146
- [20] Aitken S L, Corl C M, Sordillo L M. Pro-inflammatory and pro-apoptotic responses of TNF- α stimulated bovine mammary endothelial cells[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 140(3-4):282-290
- [21] Sordillo L M, Pighetti G M, Davis M R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 49(3):263-270
- [22] Hu Y. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase[J]. *Science*, 1999, 284(5412):316-320
- [23] Li Q. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene[J]. *Science*, 1999, 284(5412):321-325
- [24] Ruocco M G, Maeda S, Park J M, Lawrence T, Hsu L C, Cao Y X, Schett G, Wagner E F, Karin M. I κ B kinase (IKK) β , but not IKK α , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(10):1677-1687

责任编辑: 杨爱东