

樊嘉琦, 贾芳, 李宇思, 等. 黄芪多糖及黄芪甲苷干预对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症的作用 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(4): 16-28.
FAN Jiaqi, JIA Fang, LI Yusi, et al. Effects of astragalus polysaccharide and astragaloside IV on lipopolysaccharides-induced inflammation of bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(4): 16-28.

黄芪多糖及黄芪甲苷干预对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症的作用

樊嘉琦, 贾芳, 李宇思, 周学章

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750000)

摘要:【目的】考察黄芪提取物黄芪甲苷 (Astragalus IV, AS-IV) 及黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 干预对脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导奶牛乳腺上皮细胞 (Bovine mammary epithelial cells, BMECs) 炎症的作用及对炎症细胞中 β -酪蛋白表达的影响。【方法】使用 APS、AS-IV 干预 LPS 诱导的 BMECs, 检测细胞炎症因子、氧化因子、凋亡因子、 β -酪蛋白的变化。【结果】CCK-8 筛选发现, 1 g/L APS 及 50、75、100 mg/L AS-IV 为刺激 BMECs 的最适质量浓度, 0.5 mg/L LPS 刺激 BMECs 24 h 后成功建立炎症细胞模型。AS-IV、APS 可显著抑制炎症细胞中乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 的表达, 缓解炎症状态下细胞膜的持续损伤; 显著抑制炎症细胞中丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的表达, 缓解细胞的氧化损伤; 显著抑制炎症细胞中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 炎症因子的表达, 降低细胞的炎症反应; 显著抑制炎症细胞中凋亡蛋白的表达, 抑制细胞凋亡; 显著激活 BMECs 炎症细胞及正常细胞中 β -酪蛋白, 显著抑制 TGF- β 和 ERK1/2 的表达。【结论】使用最适浓度的 AS-IV、APS 可抑制 LPS 诱导的 BMECs 炎症反应, 激活炎症细胞中 β -酪蛋白的表达。

关键词: 黄芪多糖; 黄芪甲苷; 炎症; 奶牛; 乳腺炎; 上皮细胞; β -酪蛋白

中图分类号: S823

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)04-0016-13

Effects of astragalus polysaccharide and astragaloside IV on lipopolysaccharides-induced inflammation of bovine mammary epithelial cells

FAN Jiaqi, JIA Fang, LI Yusi, ZHOU Xuezhong

(School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750000, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of astragaloside IV (AS-IV) and astragalus polysaccharides (APS) of astragalus extract on the lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation of bovine mammary epithelial cells (BMECs) and the effect on the expression of β -casein in inflammatory cells. 【Method】APS and AS-IV were used to intervene LPS-induced BMECs to detect the changes of cell inflammatory factors, oxidative factors, apoptosis factors and β -casein. 【Result】CCK-8 screening found the concentrations of 1g/L APS and 50, 75, 100 mg/L AS-IV were optimal to stimulate BMECs. After stimulating BMECs with 0.5 mg/L

收稿日期: 2021-06-22 网络首发时间: 2022-03-11 10:10:39

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220309.1704.007.html>

作者简介: 樊嘉琦, 博士研究生, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: 2090883224@qq.com; 通信作者: 周学章, 教授, 博士, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: zhouxuezhong@nxu.edu.cn

基金项目: 宁夏自然科学基金 (2020AAC03111); 大学生创新创业训练计划 (Q2020107490063)

LPS for 24 h, the inflammatory cell model was successfully established. Experiments found that AS-IV and APS could significantly inhibit the expression of lactate dehydrogenase (LDH) in inflammatory cells and alleviate the continuous damage of cell membranes in the inflammatory state; Significantly inhibit the expression of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in inflammatory cells and alleviate the oxidative damage of cells; Significantly inhibit the expression of IL-6, IL-8, TNF- α inflammatory factors in inflammatory cells, and reduce the inflammatory response of cells; Significantly inhibit the expression of apoptotic proteins in inflammatory cells and inhibit cell apoptosis; Significantly activate β -casein in BMECs inflammatory cells and normal cells, and inhibit the expression of TGF- β and ERK1/2. 【Conclusion】 AS-IV and APS can inhibit the inflammatory response of BMECs induced by LPS and activate the expression of β -casein in inflammatory cells at the optimal concentrations.

Key words: Astragalus polysaccharide; Astragaloside IV; Inflammation; Bovine; Mastitis; Epithelial cell; β -casein

奶牛乳腺炎是影响奶牛养殖业发展的重要疾病之一, 奶牛乳腺炎发生时会导致乳腺组织的损伤, 也会导致奶牛乳腺上皮细胞 (Bovine mammary epithelial cells, BMECs) 的存活率降低, 牛奶中乳蛋白表达量减少^[1]。研究发现, 中药及中药提取物可提高细胞免疫活性, 调动组织的自身防御机制, 达到治疗乳腺炎的目的^[2]。黄芪提取物黄芪甲苷 (Astragaloside IV, AS-IV)、黄芪多糖 (Astragalus polysaccharin, APS) 因具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗应激等多种活性被广泛报道^[3-4]。AS-IV 和 APS 是黄芪的主要活性成分, 可通过清除自由基、降低炎症因子、保持 Ca^{2+} 平衡等方式起到消炎作用。AS-IV 可通过抑制细胞的氧化应激与炎症反应, 减少氨对 BMECs 的破坏作用^[5]; APS 可通过提高细胞中抗氧化酶的活性, 抑制氧化应激因子的表达, 以减弱过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的 BMECs 的凋亡^[6]; 奶牛乳房组织灌注 APS 注射液可有效抑制隐性奶牛乳腺炎的发病情况, 并提高乳腺组织的免疫水平^[7]; 使用添加 APS 的饲料饲喂奶牛可提高奶牛乳腺的免疫力, 降低隐性乳腺炎的发病率^[8]; 使用发酵的黄芪粉饲喂奶牛可显著提高牛奶中乳蛋白含量, 降低奶牛乳腺组织中体细胞脱落数量^[9]。上述研究表明 APS 能抑制隐性奶牛乳腺炎, 并能提高动物的免疫力, 但是系统的作用机制还不清楚, 因此本文研究关于 AS-IV、APS 干预脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 刺激 BMECs 的炎症反应机制以及对 β -酪蛋白表达的影响, 以明确 AS-IV、APS 抑制 BMECs 炎症的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验细胞

BMECs 由宁夏大学生命科学学院王东老师惠

赠, 培养在含 10%(φ) 胎牛血清和 1%(φ) 青链霉素的高糖培养基中, 所有细胞均在含有 5%(φ) CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

1.2 主要仪器及试剂

GE 化学发光检测仪 (美国 Promega 公司), 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司), PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), Nanodrop2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司), 荧光定量 PCR 仪 IQ5、酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

AS-IV、APS、LPS、青霉素、林可霉素、Hoechst 33342 染色液、瑞氏-姬姆萨复合染液 (北京索莱宝公司), β -Actin、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 抗体 (Abcam 公司), TGF- β 、ERK1/2、p-ERK1/2、 β -酪蛋白抗体 (北京博奥森公司), ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司), CCK-8 试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司)。

1.3 BMECs 炎症模型建立

1.3.1 CCK-8 检测 LPS 刺激 BMECs 的生物学活性 BMECs 悬液以 1×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板中, 培养 24 h 使细胞完全贴壁。试验分为对照组 (CK), 试验组 (LPS 质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mg/L), 空白组, 孵育 6、12、18、24 h, 每组设置 6 次重复。弃去培养基, 在含 10%(φ) CCK-8 的培养液中避光孵育 3 h, 450 nm 处测量光密度, 并计算细胞存活率。

1.3.2 RT-qPCR 检测 LPS 刺激 BMECs 的炎症因子变化 BMECs 悬液以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中。试验分为对照组 (CK)、试验组 (LPS 质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L)。使用 Trizol 法提取细胞总 RNA。按照 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(R232) 试剂盒说明书步骤逆转录合成 cDNA。按照 ChamQ Universal

SYBR qPCR Master Mix (Q711-03) 试剂盒说明书步骤进行 RT-qPCR。引物设计参考文献 [10], 具体见表 1。

1.3.3 观察 LPS 刺激奶牛 BMECs 的细胞形态变化
BMECs 悬液以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中。试验分为对照组 (CK)、试验组 (LPS 质量浓度

为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L)。加入 500 μ L 瑞氏-姬姆萨染液初染 2 min, 加入 1 mL 的 PBS 缓冲液复染 5 min, 用 PBS 缓冲液洗掉染色液, 在油镜下观察细胞形态。加入 500 μ L 的 Hoechst 33342 染色液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20~30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 最后用荧光显微镜观察并拍照。

表 1 细胞炎症因子基因表达变化 RT-qPCR 引物
Table 1 RT-qPCR primers for expression changes of inflammatory genes

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length
<i>IL-1β</i>	F: ATGAAGAGCTGCATCCAACACCTG R: ACCGACACCACCTGCCTGAAG	110
<i>TNF-α</i>	F: CTGGCGGAGGAGGTGCTCTC R: GGAGGAAGGAGAAGAGGCTGAGG	85
<i>IL-6</i>	F: CACTGACCTGCTGGAGAAGATGC R: CCGAATAGCTCTCAGGCTGAACTG	115
<i>IL-8</i>	F: AGTGGGCCACACTGTGAAAA R: CCCACAGTACATACATGAGGCA	113
<i>β-Actin</i>	F: CGTCCGTGACATCAAGGAGAAGC R: GGAACCGCTCATTGCCGATGG	143

1.4 AS-IV、APS、青霉素和林可霉素对 BMECs 生物学活性的影响

BMECs 悬液以 1×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板中, 培养 24 h 使细胞完全贴壁, 每组设置 6 次重复。AS-IV CCK-8 试验分为对照组 (CK), AS-IV 试验组 (AS-IV 质量浓度为 12.5、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、300.0 mg/L) 和空白组, 孵育 1、2、3、4 h。APS、青霉素、林可霉素 CCK-8 试验分为对照组 (CK), APS 试验组 (APS 质量浓度为 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 g/L), 青霉素试验组 (青霉素质量浓度为 50、100、250、500、1 000 mg/L), 林可霉素试验组 (林可霉素质量浓度为 50、100、250、500、1 000 mg/L) 和空白组, 孵育 1 h。试验方法同“1.3.1”。

1.5 AS-IV、APS 干预对 LPS 诱导 BMECs 中 LDH、MDA、ROS 表达的影响

BMECs 悬液以 2×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 培养 24 h 使细胞完全贴壁。试验分为 9 组, A 组为阴性对照组 (CK); B 组为 LPS 刺激组; C 组为 LPS+1 g/L APS 组; D 组为 LPS+50 mg/L 林可霉素组; E 组为 LPS+50 mg/L 青霉素组; F 组为 LPS+1%(φ) 乙醇组; G 组为 LPS+50 mg/L AS-IV 组; H 组为 LPS+75 mg/L AS-IV 组; I 组为 LPS+100 mg/L

AS-IV 组。收集处理组样品上清液, 按照乳酸脱氢酶 (Lactic dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (Malonaldehyde, MDA) 和活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒说明书进行检测, 每组设置 3 次重复。

1.6 AS-IV、APS 干预对 LPS 诱导 BMECs 中炎症因子表达的影响

培养、处理细胞同“1.5”, 试验方法同“1.3.2”。检测细胞中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子基因表达变化, 引物见表 1。另外, 收集处理组样品上清液, 3 000 r/min 离心 10 min。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测细胞上清液中炎症因子的分泌。

1.7 AS-IV、APS 干预对 LPS 诱导 BMECs 中凋亡因子表达的影响

培养、处理细胞同“1.5”, 试验方法同“1.3.2”。检测细胞凋亡相关基因表达变化, 引物设计参考文献 [11], 引物见表 2。使用凯基全蛋白提取试剂盒提取细胞全蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。在含 125 g/L 分离胶、50 g/L 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜。转膜完成后的 PVDF 膜转移至 0.5%(w) 的脱脂奶粉中, 封闭 4 h。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, TBST 缓冲液清洗 3 次。辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 2 h, TBST

缓冲液清洗 3 次。使用 ECL 化学发光显色液曝光和拍照。Western blot 法检测 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白表达。

1.8 AS-IV、APS 干预对 LPS 诱导 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达的影响

BMECs 悬液以 2×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 培养 24 h 使细胞完全贴壁。试验分为 6 组:

对照组 (CK)、1 g/L APS 组、乙醇组 (φ 为 1%)、50 mg/L AS-IV 组、75 mg/L AS-IV 组、100 mg/L AS-IV 组, 试验方法同 “1.3.2”。检测细胞中 TGF-β、ERK1/2、CSN2 基因表达变化, 引物设计参考文献 [11], 引物见表 3。培养、处理细胞同 “1.5”, 试验方法同 “1.7”, Western blot 法检测 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达。

表 2 细胞凋亡相关基因表达变化 RT-qPCR 引物
Table 2 RT-qPCR primers for expression changes of apoptosis related genes

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length
Caspase 3	F: GAACCAACGGACCCGTCAAT R: GCCATGTCATCCTCAGCACC	163
Caspase 8	F: GCTTCATCTGCTGCATCCTCACC R: AGTCGGTCTCAACGGCTACACC	198
Caspase 9	F: GACGCTGGTTCTGGAGGATTAC R: GCGGCAGAAGTTCACGTTGTTG	132
β-Actin	F: CGTCCGTGACATCAAGGAGAAGC R: GGAACCGCTCATTGCCGATGG	143

表 3 TGF-β、ERK1/2、CSN2 表达变化 RT-qPCR 引物
Table 3 RT-qPCR primers for TGF-β, ERK1/2 and CSN2 expression changes

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length
TGF-β	F: CTGTGCTGAATGGCTCTTG R: CATCATCGCTGTCCACACCT	153
ERK1/2	F: GACGCAACACCTCAGCA R: GCCAAGCCAAAGTCACAG	162
CSN2	F: TGGGCAAAGGGGTGGATT R: ACCTGGTGAGATTGTGGAAAGC	139
β-Actin	F: CGTCCGTGACATCAAGGAGAAGC R: GGAACCGCTCATTGCCGATGG	143

1.9 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件对试验数据进行方差分析, 所有试验均重复 3 次, 数据均以 “平均值±标准差” 表示, $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 BMECs 炎症模型建立

通过 CCK-8 法检测 LPS 刺激 BMECs 的活性, 结果如图 1 所示, 随着作用时间的延长和浓度的升高, LPS 对 BMECs 有明显的抑制作用, 选取刺激时间 24 h 为后续试验基础。通过 RT-qPCR 检

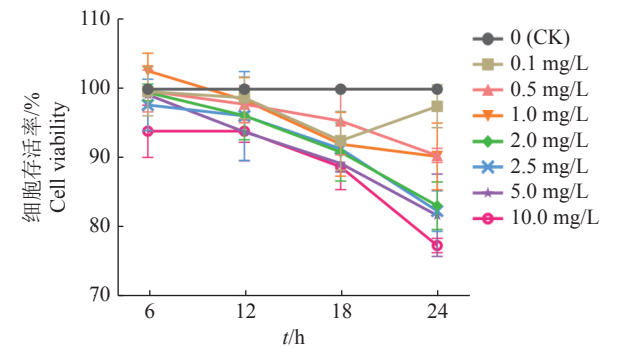
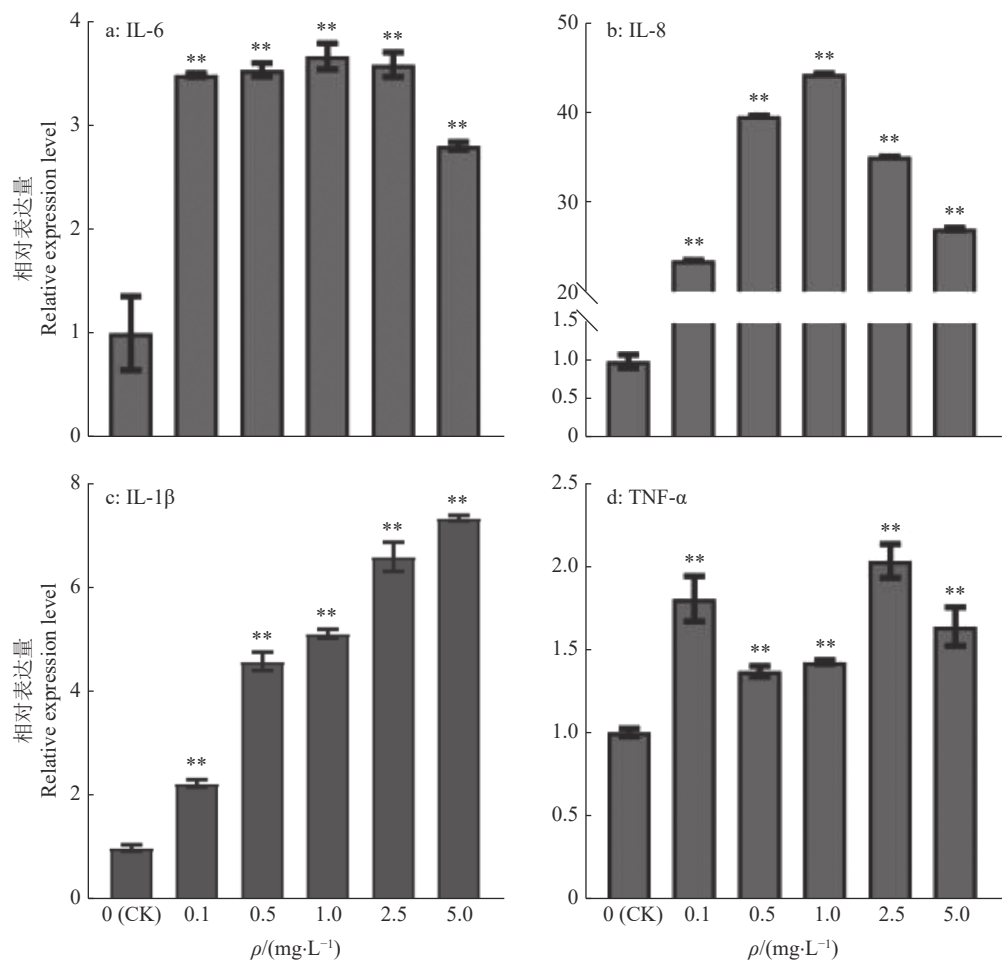


图 1 不同 LPS 质量浓度和作用时间下 BMECs 生物学活性
Fig. 1 BMECs bioactivities under different concentrations and action time of LPS

测 LPS 刺激 BMECs 中炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 表达变化, 结果如图 2 所示, 在 0.1~5.0 mg/L LPS 刺激细胞 24 h 时, IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子基因相对表达量均显著升高 ($P<0.01$)。之后分别通过瑞氏-姬姆萨染色和 Hoechst 33342 染色观察细胞形态及细胞核形态。

LPS 刺激细胞 24 h 时细胞形态及细胞核形态发生变化。细胞形态变化如图 3a 所示, 与对照组相比, 试验组中细胞核消失, 细胞之间连接明显被破坏; 2.5 mg/L LPS 处理组细胞形态显著改变, 细胞出现明显的凋亡小体。细胞核形态变化如图 3b 所示, 与对照组相比, 0.1、0.5 mg/L LPS 处理组细胞



“**” 表示处理与对照在 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)
“**” indicates significant difference at $P<0.01$ level between the treatment and control (t test)

图 2 不同 LPS 质量浓度对 BMECs 炎症因子基因表达的影响

Fig. 2 Effects of different LPS concentrations on the gene expression of inflammatory factor in BMECs

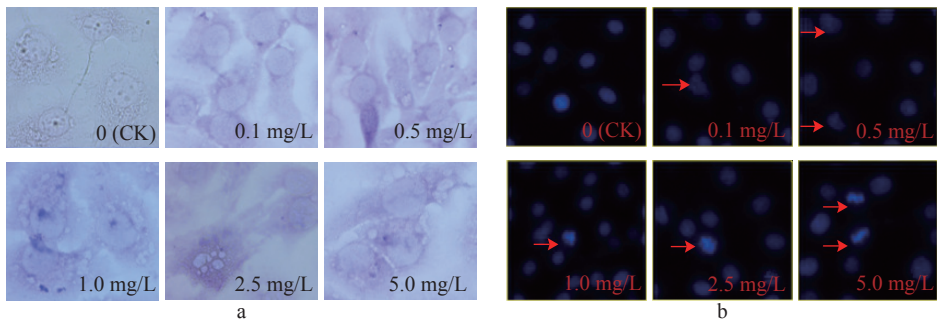


图 3 不同质量浓度 LPS 刺激的 BMECs 细胞形态 (a) 及细胞核形态 (b) 变化

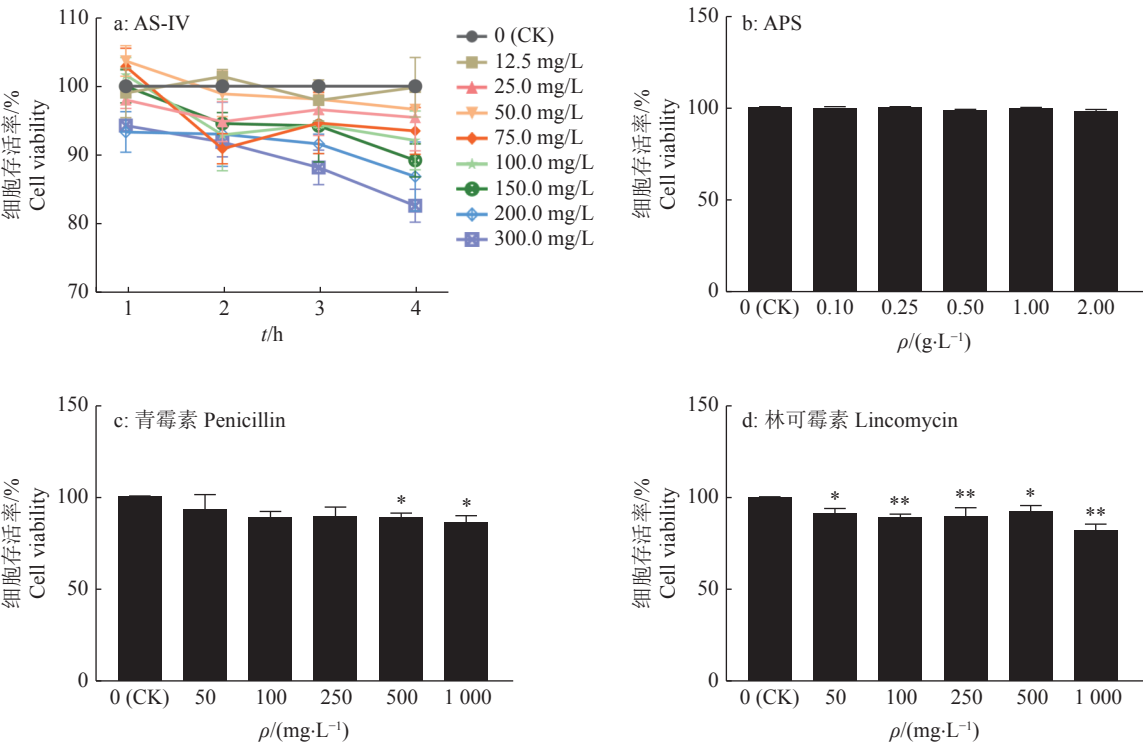
Fig. 3 Cell morphology (a) and nuclear morphology (b) changes of BMECs stimulated by different concentrations of LPS

核形态变为不规则圆形, 1.0、2.5、5.0 mg/L LPS 处理组细胞核出现断裂, 随着 LPS 浓度的升高细胞核的断裂增多。将使用 0.5 mg/L LPS 刺激 BMECs 24 h 建立炎症模型。

2.2 AS-IV、APS、青霉素、林可霉素刺激 BMECs 的生物学活性检测

CCK-8 法检测 AS-IV、APS、青霉素、林可霉素对 BMECs 生物学活性的影响。随着作用时间的延长和浓度的升高, AS-IV 对 BMECs 有抑制作用,

50、75、100 mg/L AS-IV 作用 1 h 对细胞没有毒性, 细胞存活率为 100%(图 4a)。0.1、0.25、0.5、1 g/L APS 作用 1 h 对细胞没有毒性, 细胞存活率为 100%(图 4b)。50 mg/L 青霉素 (约 86 U/mL) 刺激细胞时, 细胞存活率达到 90% 以上 (图 4c)。50 mg/L 林可霉素刺激细胞时, 细胞存活率达到 90% 以上 (图 4d)。将选取 50、75、100 mg/L AS-IV, 1 g/L APS, 50 mg/L (86 U/mL) 青霉素, 50 mg/L 林可霉素, 作为后续试验的基础。



“*” 和 “**” 分别表示处理与对照在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)
“*” and “**” indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively between the treatment and control (t test)

图4 AS-IV、APS、青霉素、林可霉素对 BMECs 存活率的影响

Fig. 4 Effects of AS-IV, APS, penicillin and lincomycin on the viabilities of BMECs

2.3 AS-IV 及 APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 损伤的影响

LDH 的表达量可反映细胞膜被破坏程度; MDA 是细胞中自由基和脂质发生氧化反应产生的最终产物, 可直接反映脂质过氧化程度; ROS 是线粒体有氧代谢时的副产物, 一般在细胞中保持平衡状态, 当其失去平衡时会导致细胞氧化损伤^[12]。LDH、MDA、ROS 表达分别见图 5a、5b、5c。与对照组 (A 组) 相比, LPS(B 组) 显著激活细胞中 LDH、MDA、ROS 的表达 ($P<0.01$)。AS-IV、APS、林可霉素、青霉素均能显著抑制炎症细胞上清液中 LDH 的分泌 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其

中 100 mg/L AS-IV(I 组) 和 1 g/L APS(C 组) 对 LDH 的抑制效果最佳; 4 种药物均可显著抑制炎症细胞中 MDA 的表达 ($P<0.01$), 其中 100 mg/L AS-IV(I 组) 对 MDA 的抑制效果最好。AS-IV、APS、青霉素能显著抑制炎症细胞 ROS 的表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中 APS(C 组) 的抑制效果最佳。

2.4 AS-IV 及 APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 中炎症因子表达的影响

通过 RT-qPCR 试验和 ELISA 试验检测 4 种药物干预炎症细胞中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子的变化。RT-qPCR 试验结果如图 6 所示, AS-

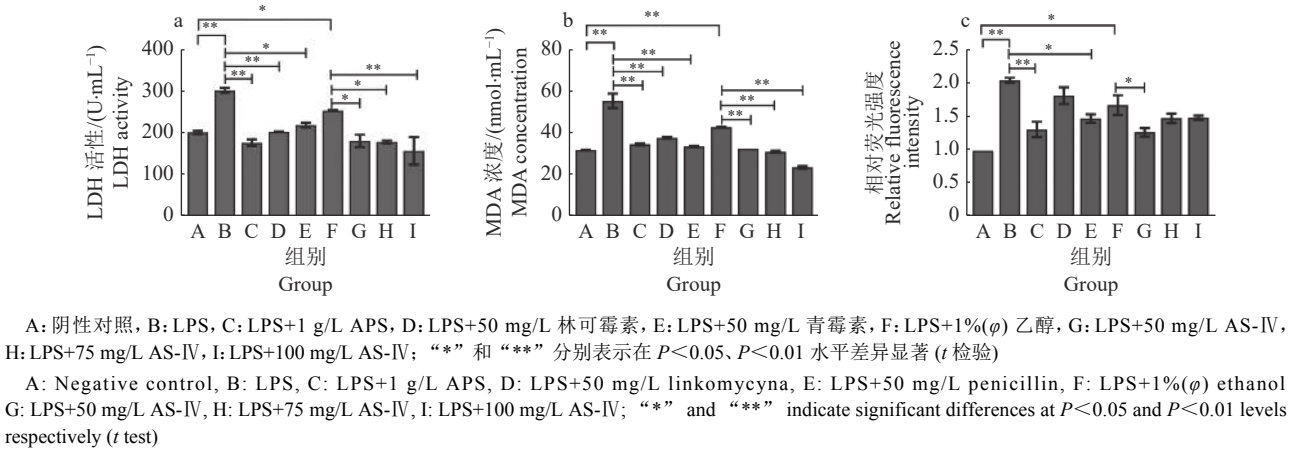


图 5 AS-IV、APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 损伤的影响
Fig. 5 Effects of AS-IV and APS interference on LPS damaging BMECs

IV、APS 均能显著抑制炎症细胞中 *IL-6*、*IL-8*、*TNF-α* 3 种基因的相对表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但 *IL-1β* 基因的相对表达无显著变化 ($P>0.05$); 林可霉素显著激活炎症细胞中 *IL-6*、*IL-8*、*IL-1β* 3 种基因的相对表达 ($P<0.01$), *TNF-α* 基因的相对表达无显著变化 ($P>0.05$); 青霉素显著提高炎症细胞中 *IL-6*、*IL-8* 基因的相对表达 ($P<0.01$), *IL-1β*、*TNF-α* 基因的

的相对表达无显著变化 ($P>0.05$). ELISA 试验结果如图 7 所示, AS-IV、APS 可显著抑制炎症细胞中 *IL-6*、*IL-8*、*TNF-α* 蛋白的表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其结果与基因变化一致; 林可霉素显著抑制炎症细胞 *IL-8* 蛋白的表达 ($P<0.05$); 青霉素显著抑制 *IL-6*、*IL-8* 蛋白的表达 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$); 4 种药物对 *IL-1β* 蛋白的分泌无显著影响 ($P>0.05$). 综上发现 AS-

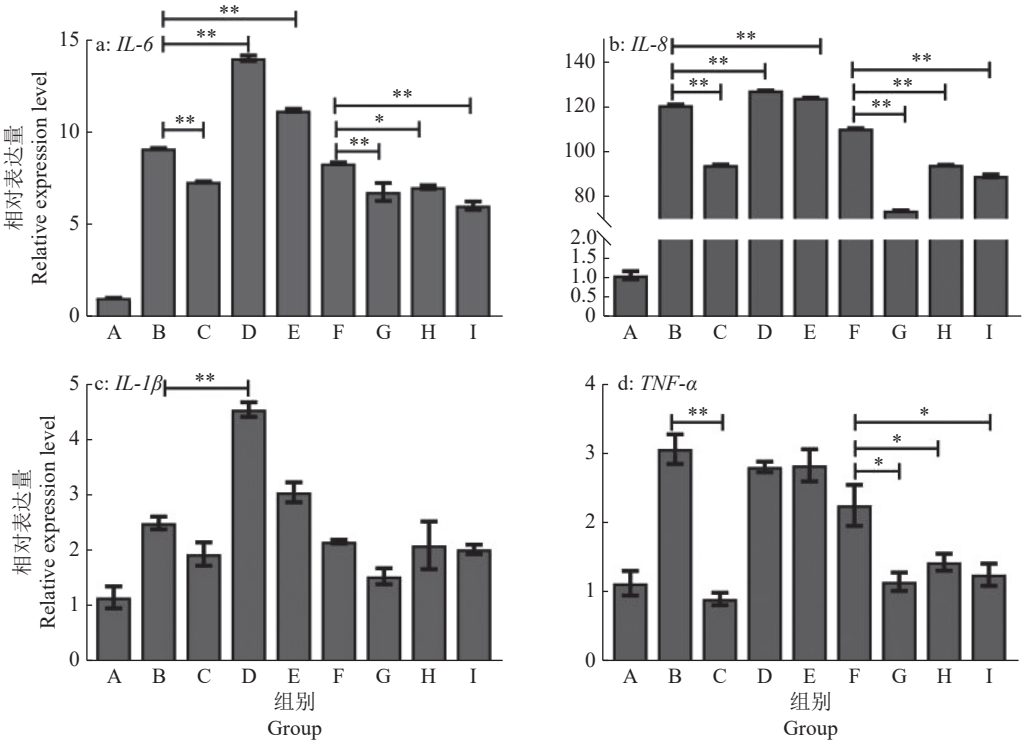
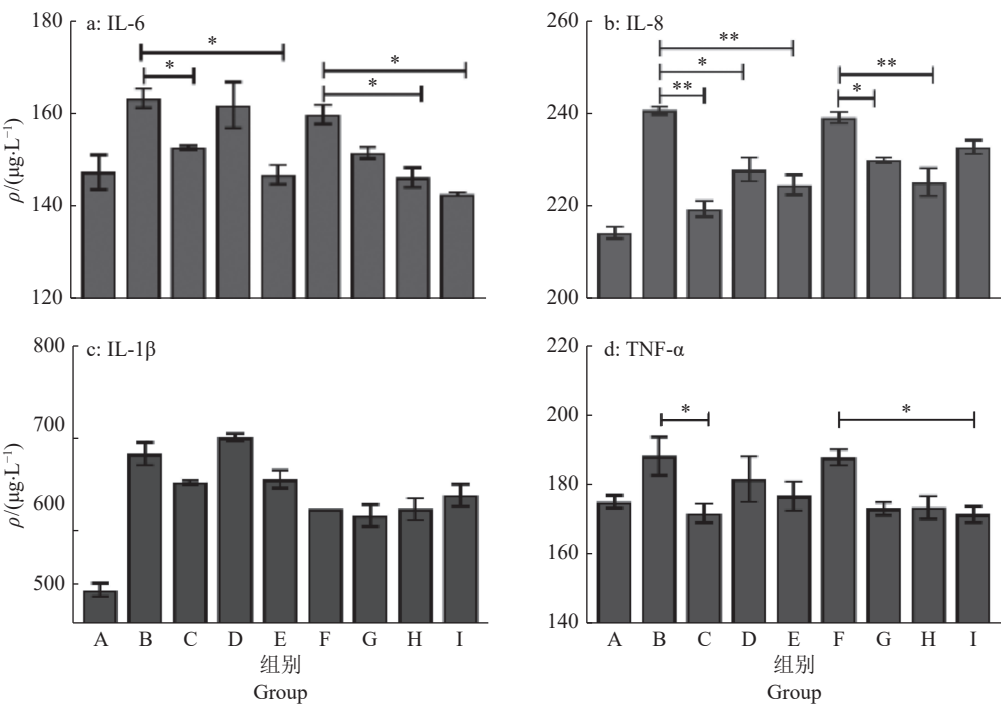


图 6 AS-IV、APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 中炎症因子基因相对表达量的影响
Fig. 6 Effect of AS-IV and APS intervention on LPS stimulating relative expression of inflammatory factor genes in BMECs



A: 阴性对照, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L 林可霉素, E: LPS+50 mg/L 青霉素, F: LPS+乙醇 (φ 为 1%), G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” 和 “**” 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)

A: Negative control, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L linkomycyna, E: LPS+50 mg/L penicillin, F: LPS+ethanol ($\varphi=1\%$), G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” and “**” indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively(t test)

图 7 AS-IV、APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 炎症因子表达量的影响

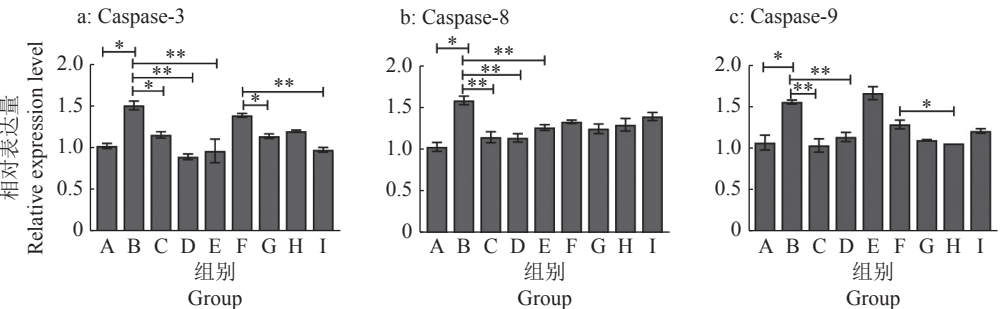
Fig. 7 Effect of AS-IV and APS intervention on LPS stimulating the expression of inflammatory factors in BMECs

IV、APS 对 LPS 刺激的 BMECs 炎性因子表达的抑制效果强于林可霉素、青霉素 2 种抗生素的抑制效果。

2.5 AS-IV 及 APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 中凋亡因子表达的影响

为研究 AS-IV、APS 对 LPS 诱导的 BMECs 凋亡过程中的细胞保护机制,通过 RT-qPCR 试

验和 Western blot 试验检测细胞中凋亡相关因子 Caspase-3/8/9 表达变化。RT-qPCR 结果如图 8 所示, AS-IV 可以下调炎症细胞中 *caspase-3* 基因的表达, APS 和林可霉素对于炎症细胞中 *caspase-3/8/9* 基因均有显著抑制效果 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 青霉素可以显著抑制炎症细胞中 *caspase-3/8* 的表达 ($P<0.01$)。蛋白变化如图 9、10 所示, AS-

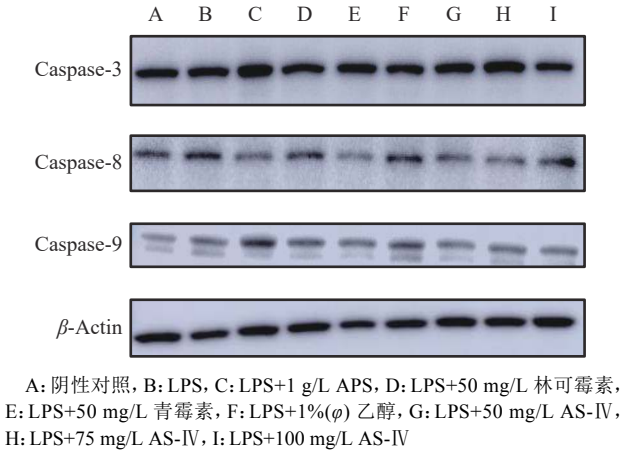


A: 阴性对照, B: LPS, C: LPS+1 g/LAPS, D: LPS+50 mg/L 林可霉素, E: LPS+50mg/L 青霉素, F: LPS+1%(φ) 乙醇, G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” 和 “**” 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)

A: Negative control, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L linkomycyna, E: LPS+50 mg/L penicillin, F: LPS+1%(φ) ethanol , G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” and “**” indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively(t set)

图 8 AS-IV、APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 凋亡因子 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 8 Effect of AS-IV and APS intervention on LPS stimulating relative expression of apoptosis factor mRNA in BMECs



A: Negative control, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L linkomycyna, E: LPS+50 mg/L penicillin, F: LPS+1%(φ) ethanol, G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV

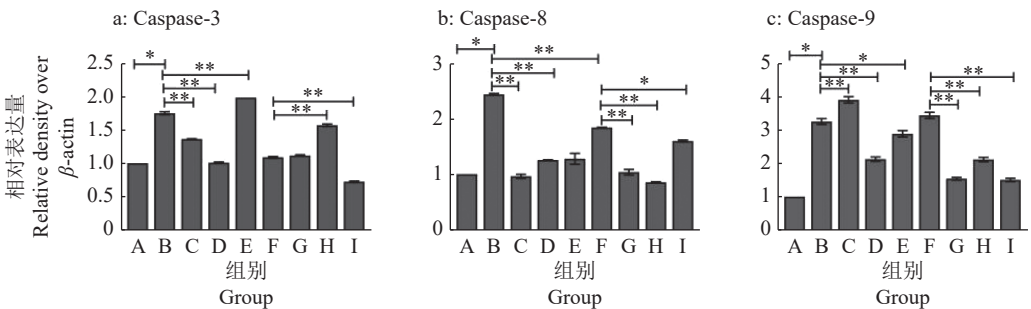
图 9 AS-IV、APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 凋亡蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of AS-IV and APS intervention on LPS stimulating expression of apoptotic protein in BMECs

IV对炎症细胞中 Caspase-3/8/9 蛋白的表达均有抑制效果 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); APS 能显著抑制炎症细胞中 Caspase-3/8 蛋白的表达 ($P<0.01$), Caspase-9 表达量却显著上升 ($P<0.01$)。因此推测 AS-IV 可以通过死亡受体途径和线粒体途径共同抑制细胞凋亡; APS 则通过死亡受体途径抑制细胞凋亡。

2.6 AS-IV 及 APS 刺激对 BMECs 中 TGF- β 、ERK1/2、 β -酪蛋白表达的影响

本试验将通过 RT-qPCR 试验和 Western blot 试验, 检测 AS-IV 和 APS 2 种药物作用于 BMECs 后, 细胞中 TGF- β 、ERK1/2、 β -酪蛋白的表达变化。RT-qPCR 检测结果如图 11 所示, 与对照组相比, APS 组显著激活了 TGF- β 、ERK1/2 基因的相对表达 ($P<0.01$), 显著抑制了 CSN2 基因的相对表达 ($P<0.05$); 与乙醇组相比, AS-IV 能显著

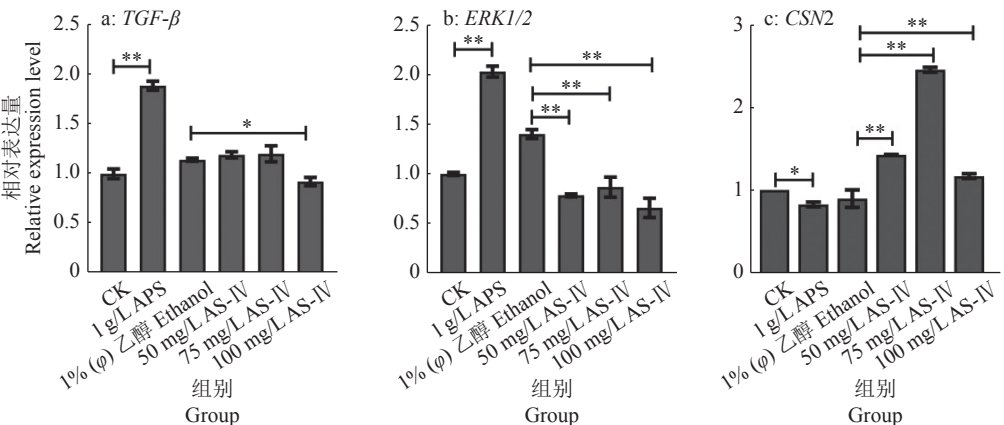


A: 阴性对照, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L 林可霉素, E: LPS+50 mg/L 青霉素, F: LPS+1%(φ) 乙醇, G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” 和 “**” 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)

A: Negative control, B: LPS, C: LPS+1 g/L APS, D: LPS+50 mg/L linkomycyna, E: LPS+50 mg/L penicillin, F: LPS+1%(φ) ethanol, G: LPS+50 mg/L AS-IV, H: LPS+75 mg/L AS-IV, I: LPS+100 mg/L AS-IV; “*” and “**” indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively(t test)

图 10 AS-IV、APS 干预 LPS 对 BMECs 凋亡蛋白表达量的影响

Fig. 10 Effect of AS-IV and APS intervention on LPS affecting expression of apoptotic protein in BMECs



“*” 和 “**” 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平差异显著 (t 检验)

“*” and “**” indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively(t test)

图 11 AS-IV 和 APS 对 BMECs 中 TGF- β 、ERK1/2、CSN2 相对表达量的影响

Fig. 11 Effects of AS-IV and APS on relative expression level of TGF- β , ERK1/2 and CSN2 in BMECs

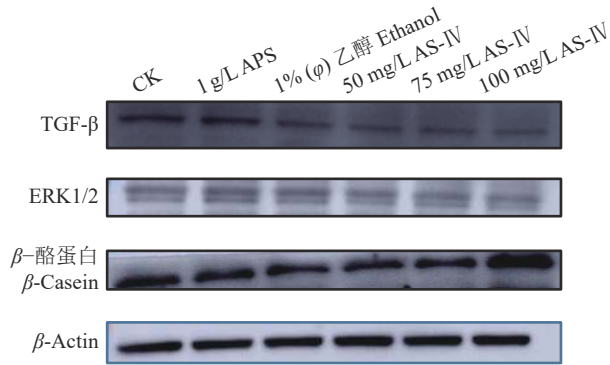


图 12 AS-IV 和 APS 对 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达的影响

Fig. 12 Effects of AS-IV and APS on expression of TGF-β, ERK1/2 and β-casein proteins in BMECs

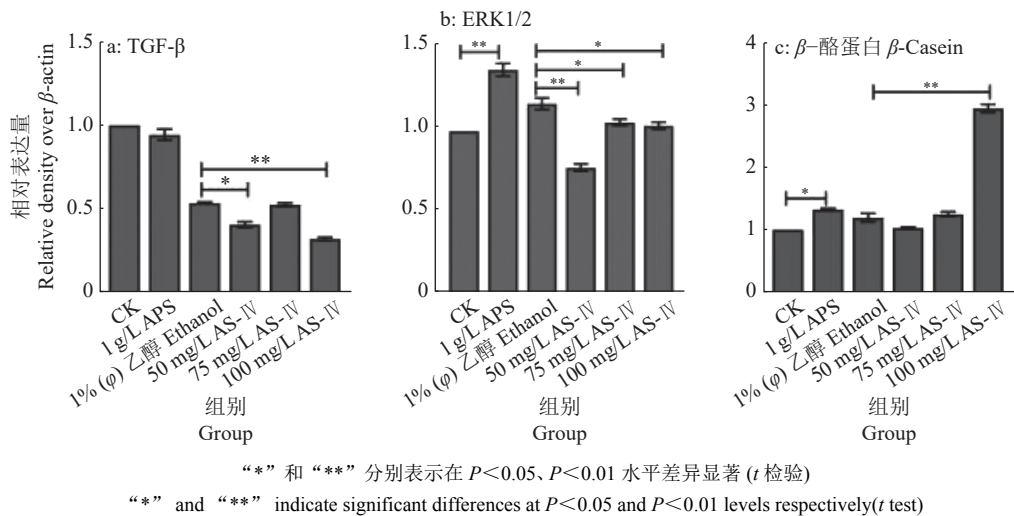


图 13 AS-IV 和 APS 对 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达的影响

Fig. 13 Effects of AS-IV and APS on expression of TGF-β, ERK1/2 and β-casein in BMECs

表达的效果更好。

2.7 AS-IV 及 APS 干预对 LPS 刺激 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达的影响

AS-IV 和 APS 这 2 种药物干预炎症细胞 β-酪蛋白及其拮抗蛋白的表达, 结果如图 14、15 所示。与对照组 (A 组) 相比, LPS (B 组) 能显著激活细胞中 p-ERK1/2 蛋白的表达 ($P<0.01$), 显著抑制细胞中 β-酪蛋白的表达 ($P<0.01$); 与炎症细胞 (B、F 组) 相比, AS-IV (G、H、I 组)、APS (C 组)、林可霉素 (D 组)、青霉素 (E 组) 多能显著抑制炎症细胞中 p-ERK1/2、TGF-β 的表达, 激活 β-酪蛋白的表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中 AS-IV、APS 对于激活炎症细胞 β-酪蛋白表达效果最好。说明 AS-IV、APS 可激活炎症细胞中 β-酪蛋白的表达, 抑制炎症细胞中 p-ERK1/2、TGF-β 蛋白的表达。

抑制细胞中 *ERK1/2* 基因的相对表达 ($P<0.01$), 显著激活 *CSN2* 基因的相对表达 ($P<0.01$), 100 mg/L AS-IV 能显著抑制细胞中 *TGF-β* 基因的相对表达 ($P<0.05$)。Western blot 检测结果如图 12、13 所示, 与对照组相比, APS 显著激活细胞中 β-酪蛋白 ($P<0.05$), 极显著激活 ERK1/2 蛋白的表达 ($P<0.01$), 对 TGF-β 蛋白无显著影响 ($P>0.05$); 与乙醇组相比, AS-IV 能显著抑制细胞中 TGF-β、ERK1/2 蛋白的表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 100 mg/L AS-IV 能显著激活 β-酪蛋白表达 ($P<0.01$)。说明 AS-IV 和 APS 均可激活细胞中 β-酪蛋白, 但正常状态下, AS-IV 刺激 BMECs 中 β-酪蛋白

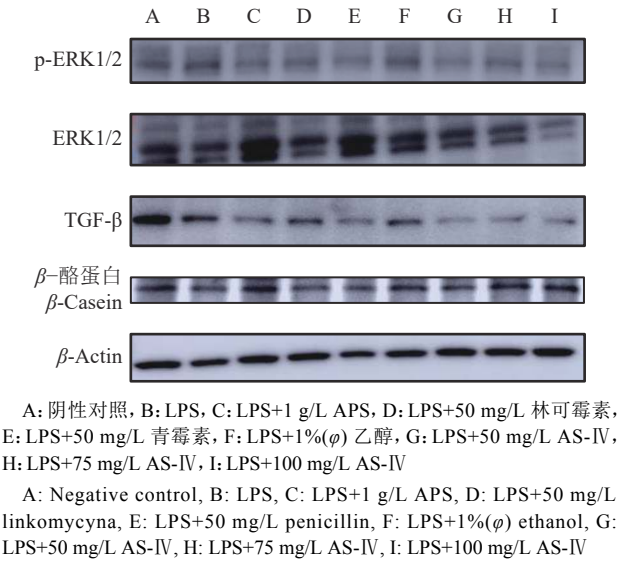


图 14 4 种药物干预对 LPS 刺激 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达量的影响

Fig. 14 Effect of four drugs intervention on LPS stimulating the protein expression of TGF-β, ERK1/2 and β-casein in BMECs

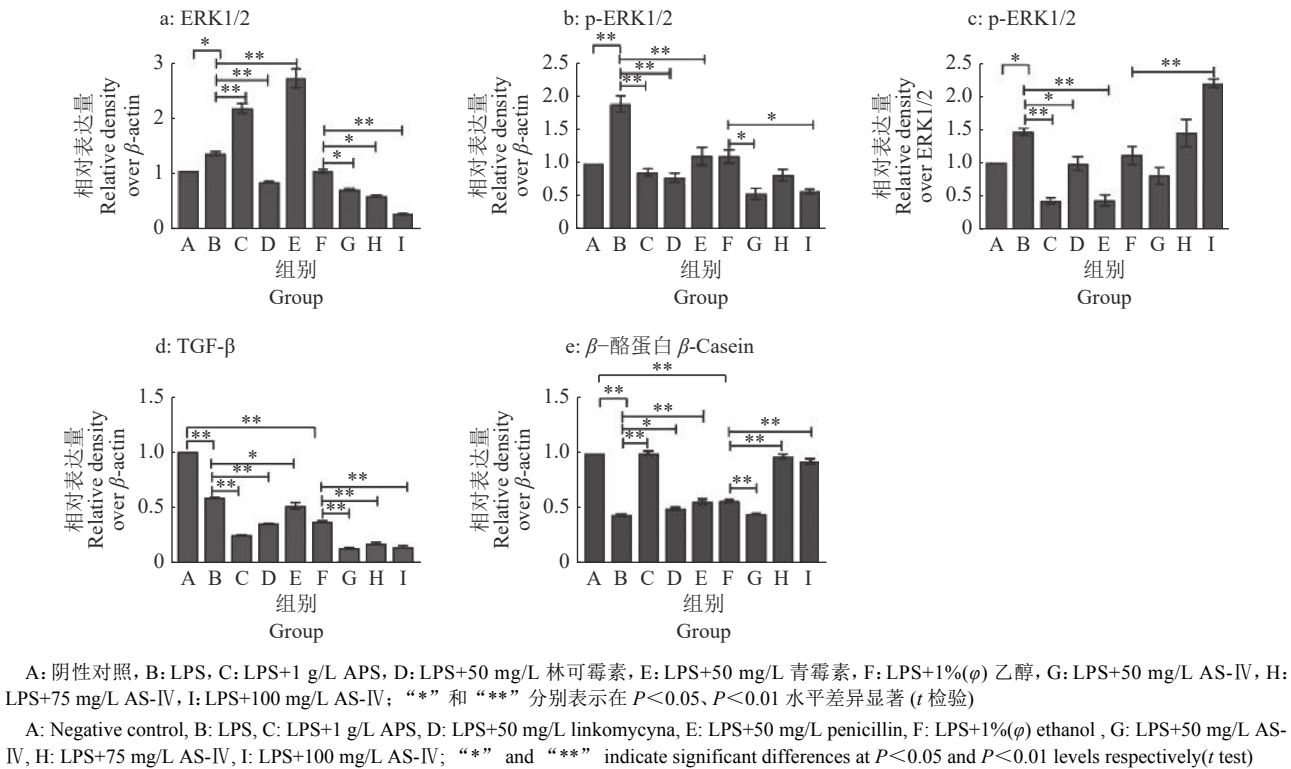


图 15 4 种药物干预对 LPS 刺激 BMECs 中 TGF-β、ERK1/2、β-酪蛋白表达量的影响

Fig. 15 Effect of four drugs intervention on LPS stimulating expression of TGF-β, ERK1/2 and β-casein in BMECs

3 讨论与结论

奶牛乳腺组织主要由上皮细胞、原代细胞、干细胞、神经细胞、脂肪细胞和巨噬细胞等组成，BMECs 是乳腺组织中唯一有泌乳功能且高度分化的免疫细胞，BMECs 在乳腺组织中正常的生长、分化、繁殖、死亡，一方面保障了乳汁成分的正常合成，另一方面保障了乳腺组织的动态重塑^[13]。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌在隐性奶牛乳腺炎和临床型奶牛乳腺炎中均是主要致病菌，大肠埃希菌常作为刺激乳腺炎模型的诱导细菌，其在刺激乳腺组织时主要引起急性临床型乳腺炎^[14]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分，其作为细菌的毒力因子是使乳腺炎加剧的主要因素之一。因试验条件与试验经费的问题常使用大鼠作为研究乳腺炎的试验模型动物，研究发现与使用大肠埃希菌刺激乳腺组织相比，使用 LPS 刺激乳腺组织会引起与大肠埃希菌相似的感染情况及临床特征，且 LPS 在刺激乳腺炎方面可表现更好的重复性^[15-16]。使用不同剂量的 LPS 刺激大鼠乳腺组织会导致如浆液性、出血性、卡他性等不同类型的急性乳腺炎，且病理特征与临床型奶牛乳腺炎的乳腺组织中的病理学特征相似，乳腺炎的损伤程度与 LPS 浓度呈剂量依赖性，LPS 已成为刺激乳腺炎的理想模型^[14, 17]。长期使用精料饲喂会导致奶牛瘤胃菌群紊乱，致病菌过度繁殖，

并持续释放 LPS，LPS 释放进入血液引起机体的低度炎症，并在乳腺组织中富集，破坏血乳屏障，诱发乳腺炎症反应^[18]。多项研究发现，当乳腺组织中发生乳腺炎时，不仅会引起组织中多种炎症因子表达被激活，而且会导致组织中乳蛋白及泌乳前体物的表达被抑制^[19-20]。林杰^[21]使用 50 mg/L 的 LPS 刺激奶牛乳腺上皮细胞 12 h，发现炎症因子表达量增加，建立炎症模型。田青等^[22]研究发现 500~25 000 μg/L 的 LPS 刺激大鼠乳腺上皮细胞 24 h，会激活细胞中 IL-6、IL-1β、TNF-α 炎症因子的表达，抑制 CSN2 和 α-LA 基因的表达。李莹莹^[11]采集奶牛养殖场的奶样发现，牛奶中乳蛋白率与 TGF-β1 含量成负相关，当外源添加 TGF-β1 刺激 BMECs 会抑制 BMECs 的细胞增殖，进而上调 ERK1/2 基因的表达，并抑制 CNS2 基因的表达。本研究中使用 LPS 刺激 BMECs 24 h，发现细胞中 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 炎症因子基因和蛋白的表达升高，细胞中 p-ERK1/2 蛋白的表达被激活，细胞中 β-酪蛋白的表达被抑制。本研究结果与田青等^[22]研究结果类似，证明炎症状态下 BMECs 中的 β-酪蛋白的表达会被抑制，并激活 β-酪蛋白拮抗蛋白 p-ERK1/2 蛋白的表达，以及诱导炎症因子中促炎因子 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 的表达。

黄芪具有补阳血、补虚损、愈肾衰等功效，传统中医上被应用于治疗气虚、表虚、水肿及疮疡等多

种病症,是我国西北地区的特色中药产品之一,已经有 2000 多年的药用历史,其滋补效果温和,现已成为一种新兴的保健食品和饲料添加剂^[23-24]。黄芪中包含 200 多种活性成分,其中,AS-IV、APS 是有效成分,AS-IV、APS 具有免疫调节、抗炎、抗氧化、抗应激、抗病毒、抗肿瘤等多种生物功效^[25-26]。近年来,学者们使用 BMECs 作为体外研究的细胞模型,发现 AS-IV、APS 具有抑制炎症的作用;王凤鸽^[5]发现 AS-IV 通过抑制氯化铵刺激的 BMECs 中氧化因子 ROS,炎症因子 IL-6、IL-8,凋亡因子 BAX、Caspase-3 的表达,达到保护细胞的目的;曾涵芳等^[6]发现 APS 可抑制过氧化氢诱导的 BMECs 中 ROS 的表达,激活 SOD(超氧化物歧化酶)和 GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)的表达,从而缓解细胞的氧化损伤,起到保护细胞的作用。本研究发现 AS-IV、APS 这 2 种中药提取物均可显著抑制 LPS 诱导的 BMECs 炎症细胞中炎症因子(IL-6、IL-8、TNF- α)表达,降低促炎因子持续分泌,AS-IV、APS 2 种中药提取物可抑制炎症细胞中炎症因子的持续分泌,抗生素对炎症因子的抑制效果不如 AS-IV 及 APS。ROS 是细胞代谢过程中产生的氧分子衍生物,当细胞受到外界刺激时会大量产生,使细胞处于氧化应激状态,对细胞造成损伤;MDA 常用于反映细胞中内脂质过氧化程度。本试验发现 AS-IV、APS 可抑制炎症细胞中 ROS、MDA 的表达,从而提高细胞抗氧化能力,缓解细胞损伤,降低细胞功能紊乱;且 AS-IV 抑制炎症细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白的表达,APS 能抑制炎症细胞中 Caspase-3、Caspase-8 蛋白的表达,减缓炎症引起的细胞凋亡。本试验证明了 AS-IV、APS 对炎症细胞具有保护作用,研究结果与王凤鸽^[5]和曾涵芳等^[6]的试验结果相似。综上所述,AS-IV、APS 可通过抑制细胞中凋亡因子的表达,还原细胞中的氧化平衡,进而保护细胞,并且通过抑制炎症因子的分泌,缓解细胞持续的炎性损伤。

β -酪蛋白是乳蛋白的主要成分,在 BMECs 中合成并分泌,可通过 β -酪蛋白含量反映动物奶制品品质。中药成分复杂,具有多功能、多途径、多靶点的特点,且中药及中药提取物可补充动物营养,也可增强机体代谢,提高机体免疫力,多种中药提取物可激活乳腺上皮细胞中 β -酪蛋白的表达,目前对于中药的催乳机制研究越发增多^[27-28]。本研究发现 AS-IV 刺激的正常细胞及炎症细胞均可激活 β -酪蛋白的表达,抑制 β -酪蛋白拮抗蛋白 TGF- β 、ERK1/2 的表达;APS 可激活正常细胞及炎症细胞中 β -酪蛋白的表达,不可抑制正常细胞中

ERK1/2 蛋白表达,但可抑制炎症细胞中 TGF- β 、p-ERK1/2 蛋白表达;青霉素和林可霉素也可激活炎症细胞中 β -酪蛋白的表达,但 AS-IV、APS 对激活 β -酪蛋白表达的效果更好。李楠等^[28]研究发现,甲珠、漏芦、王不留行、蒲公英、通草等中药均可促进小鼠分泌乳汁,考虑到经济效益,推荐王不留行作为中药催乳剂为畜牧生产提供方向。本研究结果表明,AS-IV、APS 不仅可抑制炎症细胞中炎症因子、氧化因子、凋亡因子的表达,而且可提高正常细胞及炎症细胞中乳蛋白的表达与分泌,这证明 AS-IV、APS 对 BMECs 不仅有抗炎作用,还可激活细胞中乳蛋白分泌及细胞保护,存在有益影响。这为开发 AS-IV、APS 成为治疗奶牛乳腺炎的药物提供理论基础。

中药提取物 AS-IV、APS 可以激活 BMECs 中 β -酪蛋白的表达,且可抑制炎症细胞中炎症因子、凋亡因子、氧化因子的表达。本研究提示 AS-IV、APS 可作为饲料添加剂饲喂奶牛或制备成中药制剂治疗乳腺炎,为提高乳制品品质、预防治疗奶牛乳腺炎提供理论依据。

参考文献:

[1]

LI D, FU Y, ZHANG W, et al. Salidroside attenuates inflammatory responses by suppressing nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases activation in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice[J]. *Inflammation Research*, 2013, 62(1): 9-15.

[2]

赖金伦, 刘玉辉, 陈颖钰, 等. 中药防治奶牛乳腺炎的临床应用及作用机制研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(2): 381-385.

[3]

蒋微, 蒋式骊, 刘平. 黄芪甲苷的药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9): 2121-2124.

[4]

姜辉, 顾胜龙, 张玉婷, 等. 黄芪化学成分和药理作用研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(5): 93-96.

[5]

王凤鸽. 黄芪甲苷对氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化应激和凋亡的缓解作用及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.

[6]

曾涵芳, 张林, 陈孟姣, 等. 黄芪多糖对 H₂O₂ 诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤及凋亡的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5): 903-910.

[7]

张小强, 宣小龙. 黄芪多糖提高干奶期奶牛乳腺免疫力试验[J]. *中国草食动物*, 2010, 30(4): 55-57.

[8]

宣小龙. 黄芪多糖提高干奶期奶牛乳腺免疫力试验[J]. *草业与畜牧*, 2011(2): 4-6.

[9]

连慧香. 发酵黄芪粉对奶牛产奶量及乳成分的影响研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2015(1): 46-48.

[10]

JIA F, MA W W, ZHANG X J, et al. Matrine and baicalin inhibit apoptosis induced by Pantone-Valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(3):

2731-2742.

[11] 李莹莹. TGFβ1 对奶牛乳腺上皮细胞和成纤维细胞增殖的影响及其信号机制的初步研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.

[12] 卢金霞. 苦参碱干预金黄色葡萄球菌对奶牛乳腺上皮细胞粘附作用的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2017.

[13] 霍楠. PURB 在氨基酸调节 BMECs 乳合成中的作用和分子机理[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.

[14] 解颖颖, 胡学权, 崔京春, 等. 脂多糖诱导哺乳期 SD 大鼠乳腺炎模型的建立[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(2): 46-50.

[15] GAO X J, GUO M Y, ZHANG Z C, et al. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF-κB signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis[J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1142-1150.

[16] SONG X J, ZHANG W, WANG T C, et al. Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1588-1598.

[17] 齐宏亮, 李婧, 张涌, 等. 乳房炎奶牛组织和血液病理学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(8): 99-102.

[18] 胡晓宇. 奶牛瘤胃菌群紊乱与乳腺炎的关联性及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.

[19] KOBAYASHI K, OYAMA S, UEJYO T, et al. Underlying mechanisms involved in the decrease of milk secretion during *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in lactating mice[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 119. doi: 10.1186/1297-9716-44-119.

[20] SKELLY D T, HENNESSY E, DANSEREAU M A, et al. A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1B, TNF-α and IL-6 challenges in C57BL/6 mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69123.

[21] 林杰. 植物精油对 LPS 诱导的奶牛乳腺上皮细胞损伤的保护作用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.

[22] 田青, SPITZER A J, 赵凤启. 脂多糖对大鼠乳腺上皮细胞酪蛋白基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(7): 3365-3373.

[23] IONKOVA I, SHKONDROV A, KRASTEVA I, et al. Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of *Astragalus saponins*[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2014, 13(2): 343-374.

[24] GONG A, DUAN R, WANG H, et al. Evaluation of the pharmaceutical properties and value of *Astragali Radix*[J]. *Medicines*, 2018, 5(2). doi: 10.3390/medicines5020046.

[25] WU F, CHEN X. A review of pharmacological study on *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2004, 27(3): 232-234.

[26] FU J, WANG Z, HUANG L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi)[J]. *Phytotherapy Research*, 2014, 28(9): 1275-1283.

[27] 葛增广, 佟慧丽, 秦君, 等. 不同中药提取物对小鼠乳腺上皮细胞 β-酪蛋白表达的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(1): 66-71.

[28] 李楠, 高学军, 关力. 中药王不留行对奶牛乳腺细胞增殖及泌乳的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 45-48.

【责任编辑 李庆玲】