

引用格式:

占今舜, 江浩筠, 贾浩滨, 王海波, 谷志勇, 潘月, 钟小军, 马月辉, 霍俊宏. 脂多糖处理时间对山羊瘤胃上皮细胞损伤的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(3): 83–88.

ZHAN J S, JIANG H Y, JIA H B, WANG H B, GU Z Y, PAN Y, ZHONG X J, MA Y H, HUO J H. Anti-damage effects of goat rumen epithelial cells induced by lipopolysaccharide[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2024, 50(3): 83–88.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



脂多糖处理时间对山羊瘤胃上皮细胞损伤的影响

占今舜^{1,2}, 江浩筠^{1,2}, 贾浩滨^{1,2}, 王海波^{1,2,3}, 谷志勇^{1,2,4},
潘月^{1,2,4}, 钟小军^{1,2}, 马月辉⁵, 霍俊宏^{1,2*}

(1.江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200; 2.畜禽绿色健康养殖江西省重点实验室, 江西 南昌 330200; 3.甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 4.天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300191; 5.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 在羊瘤胃上皮细胞(GRECs)基础培养基中加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖(LPS), 培养 3、6、9 h 后, 检测细胞活性、抗氧化指标、炎症因子及紧密连接蛋白基因的表达。结果发现: 1) LPS 处理 3 h 组 GRECs 的活性显著低于处理 6 h 和 9 h 组的, 而处理 6 h 和 9 h 组 GRECs 的活性无显著差异; 2) LPS 处理 3 h 组 GRECs 的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性极显著低于处理 6 h 和 9 h 组的, 但 MDA 含量的变化则相反, GRECs 的 SOD 和 CAT 活性随 LPS 处理时间的延长而显著升高, ROS 含量则随 LPS 处理时间的延长而极显著降低; 3) LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 相对表达量极显著高于处理 6 h 和 9 h 组的, *IL-1 β* 相对表达量随 LPS 处理时间的延长而显著降低, 各组间 *IL-6* 相对表达量无显著差异; 4) LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 ZO-1 分布低, 随着处理时间延长 ZO-1 分布增加, LPS 处理 3 h 的 GRECs 紧密连接蛋白 *Claudin-1* 相对表达量显著高于处理 6 h 和 9 h 组的。说明随着 LPS 处理时间的延长, 山羊瘤胃上皮细胞能够通过提高自身抗氧化和抗炎能力来缓解氧化损伤, 进而改善细胞屏障功能。

关键词: 脂多糖; 山羊瘤胃上皮细胞; 抗氧化性能; 抗炎性; 紧密连接蛋白

中图分类号: S852.4+4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)03-0083-06

Anti-damage effects of goat rumen epithelial cells induced by lipopolysaccharide

ZHAN Jinshun^{1,2}, JIANG Haoyun^{1,2}, JIA Haobin^{1,2}, WANG Haibo^{1,2,3}, GU Zhiyong^{1,2,4},
PAN Yue^{1,2,4}, ZHONG Xiaojun^{1,2}, MA Yuehui⁵, HUO Junhong^{1,2*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Animal Green and Healthy Breeding, Nanchang, Jiangxi 330200, China; 3. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 4. College of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300191, China; 5. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Goat rumen epithelial cells (GRECs) were cultured in medium containing 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS for 3 h, 6 h and 9 h to detect cell viability, antioxidant indices, genes expression of inflammatory factors and tight junction protein. The results showed as follows: 1) The viability of GRECs in the group treated with LPS for 3 h was significantly lower than

收稿日期: 2023-06-29

修回日期: 2024-03-09

基金项目: 江西现代农业科研协同创新专项(JXXTCXQN202203); 江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-13-肉羊岗位)

作者简介: 占今舜(1985—), 男, 江西玉山人, 博士, 助理研究员, 主要从事反刍动物营养研究, zhanjinshun1985@163.com; *通信作者, 霍俊宏, 硕士, 研究员, 主要从事反刍动物遗传育种与繁殖研究, hjh_0222@126.com

that in groups treated with LPS for 6 h and 9 h, but there was no significant difference in GRECs activity between groups treated with LPS for 6 h and 9 h. 2) The glutathione peroxidase (GSH-PX) activity of GRECs treated with LPS for 3 h was extremely significantly lower than that in cells treated with LPS for 6 h and 9 h ($P < 0.01$), whereas the malondialdehyde(MDA) content, on the contrary, was extremely significantly higher in cells treated with LPS for 3 h. The superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities of GRECs significantly increased and the reactive oxygen (ROS) concentration extremely decreased with the prolongation of LPS treatment time. 3) The relative expression levels of *TNF- α* and *IL-1 β* in GRECs treated with LPS for 3 h were significantly higher than that in cells treated with LPS for 6 h and 9 h. The relative expression of *IL-1 β* was significantly decreased with the extension of LPS treatment time. The relative expression levels of *IL-6* had no significant difference among all group. 4) The distribution of ZO-1 was low in GRECs treated with LPS for 3 h, but increased with the extension of LPS treatment time. The relative expression levels of *Claudin-1* in GRECs treated with LPS for 3 h were significantly higher than that in cells treated with LPS for 6 h and 9 h. The results showed that the GRECs could alleviate oxidative damage by improving their own antioxidant and anti-inflammatory capacities with the extension of LPS treatment time, then improve barrier function of the cells.

Keywords: lipopolysaccharide; goat rumen epithelial cells; oxidation resistance; anti-inflammatory effect; tight junction protein

反刍动物的瘤胃是营养物质消化、代谢和吸收的主要器官,其健康状况直接影响反刍动物的健康。瘤胃上皮的多细胞结构、细胞间的连接复合物构成瘤胃上皮屏障,具有调节瘤胃上皮吸收营养物质和防止毒素物质如脂多糖(LPS)等易位进入血液的功能^[1]。在生产实际中,会通过增加饲料中的精料来提高反刍动物的生产性能,但当反刍动物采食过多的精饲料后,精料中的碳水化合物会快速发酵产生大量的乳酸和短链脂肪酸,导致瘤胃 pH 下降,产生瘤胃酸中毒,造成瘤胃内大量革兰阴性菌死亡,释放细菌细胞壁组成成分 LPS^[2]。研究发现,长期饲喂高精料日粮产生大量的 LPS,可诱发奶牛瘤胃上皮炎症反应和瘤胃上皮细胞的凋亡,引起瘤胃上皮组织结构损伤,下调挥发性脂肪酸(VFA)吸收相关蛋白表达,瘤胃中 VFA 吸收受阻,导致瘤胃内 VFA 积累^[3-4]。此外, LPS 会破坏瘤胃上皮屏障功能,使胃肠道渗透增强,导致外周血 LPS 浓度升高,引发全身炎症反应,造成机体损伤^[5];因此,体内 LPS 浓度升高,会影响反刍动物生产性能和繁殖性能。张腾等^[6]研究发现,山羊在采食高精料日粮后瘤胃液 pH 值迅速下降,于采食后 3 h 达到最低值,再逐渐上升。韩昊奇等^[7]研究也发现,山羊采食 3~6 h 后 pH 值下降至最低点,随后逐渐上升。说明随着时间的延长,瘤胃自身有较强的缓冲能力,使瘤胃 pH 值回升。长期饲喂高精料日粮诱导的亚急性瘤胃酸中毒会出现发生—适应恢复—再发生的过程,且会造成胃肠道屏障发生损伤^[8]。而在短期内,亚急性瘤胃酸中毒不会影响瘤胃屏障功

能,这可能与亚急性瘤胃酸中毒促进体内平衡反应,通过抑制瘤胃上皮炎症反应来促进组织修复有关,但其机制尚不清楚^[9-10]。笔者运用体外细胞培养技术,测定 LPS 处理 3、6、9 h 的山羊瘤胃上皮细胞(GRECs)活性、抗氧化性能、炎症因子基因和细胞紧密连接蛋白表达,以期了解 LPS 诱导下山羊瘤胃上皮细胞屏障功能损伤的自我修复能力,为进一步深入研究相关机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

山羊瘤胃上皮细胞(GRECs)来自于波尔山羊,由扬州大学动物培养物保藏与应用研究所提供。来源于大肠杆菌 O55: B5 的脂多糖(LPS)(纯度 $\geq 99\%$)购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 山羊瘤胃上皮细胞活性的检测

参照 HU 等^[11]的方法培养 GRECs,细胞活性采用 CCK-8 法检测。将 GRECs 分为 3 组,每组 6 个重复,接种到 96 孔板中,每孔 1×10^4 个 GRECs,加入 DMEM/F12 基础培养基,置于二氧化碳培养箱 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。当细胞完全贴壁后,将基础培养基去除,并用 PBS 清洗 2 次,再加入含 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 基础培养基 100 μL ,分别在细胞培养 3、6、9 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱中孵育 3 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值,参照 CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术有限公

司)说明书计算细胞活性。

1.2.2 山羊瘤胃上皮细胞抗氧化性能的检测

将 5×10^5 个/mL GRECs 接种到 6 孔板, 置于二氧化碳培养箱 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养, 待细胞完全贴壁后去除基础培养基, PBS 清洗 2 次后将其分为 3 组, 每组 6 个重复, 每孔加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 LPS 基础培养基, 分别在培养 3、6、9 h 后收集细胞, 按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书检测乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性, 以及活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)含量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR			
基因	登录号	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>IL-1β</i>	XM_013967700.2	GAAGAGCTGCACCCAACA; CAGGTCATCATCACGGAAG	172
<i>IL-6</i>	NM_001285640	AGATATACCTGGACTTCCT; TGTTCTGATACTGCTCTG	80
<i>TNF-α</i>	NM_001286442	TGGTTCAGACACTCAGGT; CGCTGATGTTGGCTACAA	75
<i>Claudin-1</i>	XM_005675123	CACCCTTGGCATGAAGTGTA; AGCCAATGAAGAGAGCCTGA	216
<i>GAPDH</i>	XM_005680968.2	CAAAGTGGACATCGTTGCCA; TGGAAAGATGGTGTGGCCTT	156

1.2.4 紧密连接蛋白 ZO-1 的检测

将 5×10^5 个/mL GRECs 接种到 6 孔板, 置于二氧化碳培养箱 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养, 待细胞完全贴壁后去除基础培养基, PBS 清洗 2 次后分为 3 组, 每组 6 个重复, 每孔加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 的基础培养基, 培养 3、6、9 h 后去除培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次。用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 清洗 3 次。用 3% 马血清室温封闭 30 min, 弃血清, 加兔源 ZO-1 一抗, 放置 4°C 冰箱孵育过夜。PBS 清洗 3 次, 加抗兔绿色荧光二抗, 室温避光孵育 1 h。PBS 清洗 3 次, DAPI 室温染色 5 min。PBS 洗 3 次, 立即用荧光显微镜观察。

1.3 数据处理与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。在 IBM SPSS Statistics 21.0 软件上进行 ANOVA 单因素分析, 选用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

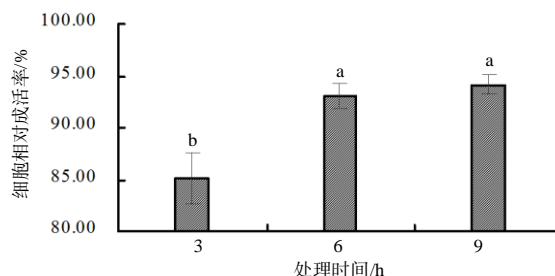
2.1 LPS 处理时间对 GRECs 活性的影响

LPS 不同处理时间的 GRECs 活性如图 1 所示。结果表明, 随着 LPS 处理时间的延长, GRECs 活

1.2.3 细胞炎症因子和紧密连接蛋白基因表达的检测

将 5×10^5 个/mL GRECs 接种到 6 孔板, 置于二氧化碳培养箱 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养, 待细胞完全贴壁后去除基础培养基, PBS 清洗 2 次后将其分为 3 组, 每组 6 个重复, 每孔加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 的基础培养基, 培养 3、6、9 h 后去除培养基, 直接加入 1 mL 的 Trizol, 按照 RNA 提取试剂盒说明书(天根生化科技有限公司)提取 RNA。cDNA 合成和 RT-PCR 等的方法和条件参照占今舜等^[12]的方法。试验所需引物由 Invitrogen 公司合成, 序列列于表 1。

性逐渐增强。LPS 处理 3 h 的 GRECs 活性显著低于处理 6 h 和 9 h 的。说明 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 处理抑制 GRECs 增殖的能力随着时间的延长而减弱。



不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图 1 LPS 不同处理时间的 GRECs 的活性

Fig. 1 Viability of GRECs at different times after LPS treatment

2.2 LPS 处理时间对 GRECs 抗氧化性能的影响

LPS 处理不同时间的 GRECs 抗氧化性能列于表 2。结果表明, LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 LDH 活性高于 6 h 和 9 h 组的, 但差异不显著。LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 GSH-PX 活性极显著低于 6 h 和 9 h 组的, 而 MDA 含量则极显著高于 6 h 和 9 h 组的; GRECs 的 SOD 和 CAT 活性随 LPS 处理时间的延长而显著升高, 而 ROS 含量随 LPS 处理时间的延长而极显著降低。说明随着 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 处理

时间的延长, GRECs 抗氧化性能逐步增强。

表 2 LPS 不同处理时间的 GRECs 的抗氧化性能

处理时间/h	LDH 活性/ (U L ⁻¹)	SOD 活性/ (U mL ⁻¹)	GSH-PX 活性/ (U mL ⁻¹)	CAT 活性/ (U mL ⁻¹)	ROS 含量/ (RFU mL ⁻¹)	MDA 含量/ (nmol mL ⁻¹)
3	6.15±0.35	(5.09±0.27)Bc	(21.00±0.18)B	(2.45±0.16)Bc	(67.83±0.81)A	(6.71±0.11)A
6	5.39±0.68	(7.46±0.15)Ab	(25.41±1.19)A	(3.39±0.11)Ab	(48.46±0.11)B	(5.22±0.17)B
9	4.76±0.33	(8.32±0.23)Aa	(26.10±0.30)A	(4.06±0.17)Aa	(45.97±0.25)C	(4.94±0.03)B

同列不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 LPS 处理时间对 GRECs 炎症因子基因表达的影响

LPS 不同处理时间的 GRECs 炎症因子基因 *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 的相对表达量列于表 3。结果表明, LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 *TNF- α* 相对表达量极显著高于 6 h 和 9 h 组的; 各处理组 GRECs

表 3 LPS 不同处理时间的 GRECs 炎症因子基因的相对表达量

Table 3 Gene expression of inflammatory cytokines in GRECs at different times after LPS treatment

处理时间/h	相对表达量		
	<i>TNF-α</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-1β</i>
3	(1.00±0.04)Aa	1.05±0.15	(1.05±0.13)Aa
6	(0.58±0.16)Bb	2.55±1.11	(0.47±0.02)Bb
9	(0.64±0.02)ABb	1.13±0.15	(0.20±0.04)Bc

同列不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

的 *IL-6* 相对表达量无显著差异; LPS 处理 3 h 组 GRECs 的 *IL-1 β* 相对表达量极显著高于其他 2 组的, 处理 6 h 组山羊瘤胃上皮细胞的 *IL-1 β* 相对表达量高于 9 h。说明 GRECs 的抗炎能力可能随着 1 μ g/mL LPS 处理时间的延长而增强。

2.4 LPS 处理时间对 GRECs 紧密连接蛋白 ZO-1 分布和 *Claudin-1* 表达的影响

LPS 不同处理时间的 GRECs 紧密连接蛋白 ZO-1 的分布如图 2 所示。1 μ g/mL LPS 处理 3 h 时, GRECs 细胞边缘形成连续的网格状结构较少, 点状染色较多(图 2-1、图 2-2); 处理 6 h 和 9 h 时, GRECs 边缘点状染色减少, 形成连续的网格状结构增多, 其中处理 9 h 网格状结构要多于 6 h 的(图 2-3、图 2-4、图 2-5、图 2-6)。

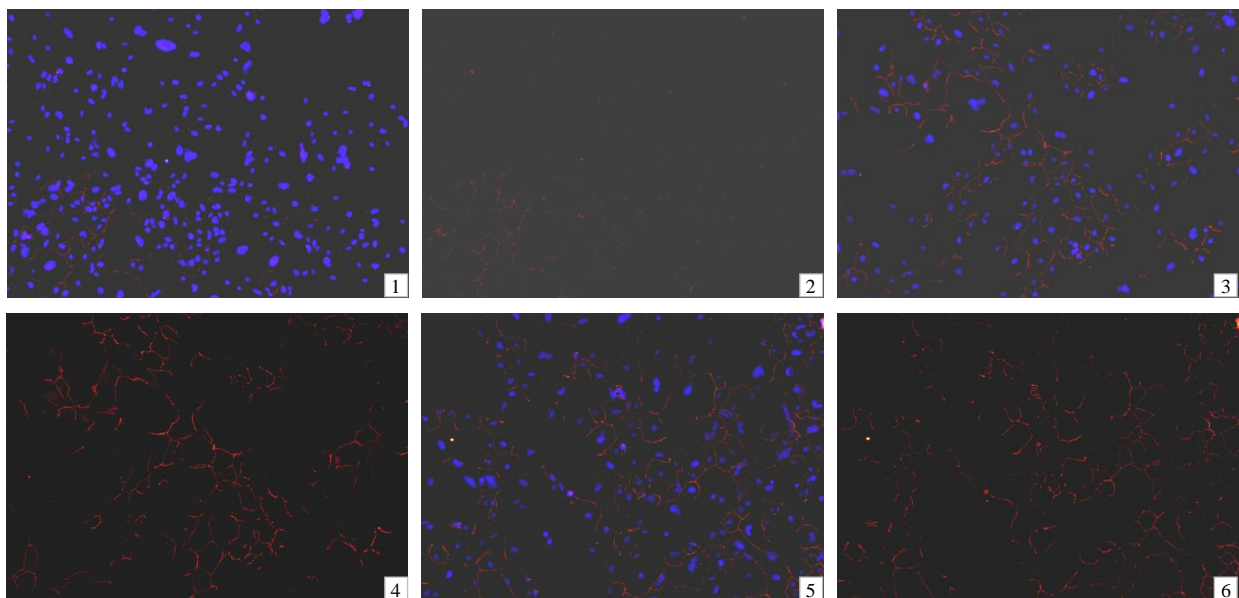
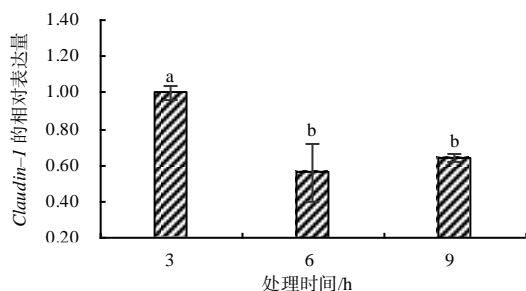


图 2 LPS 处理的 GRECs 紧密连接蛋白 ZO-1 的分布

Fig. 2 Distribution of tight junction protein ZO-1 in GRECs LPS treatment

从图 3 可知, LPS 处理 3 h 的 GRECs 紧密连接蛋白 *Claudin-1* 相对表达量要显著高于处理 6 h 和 9 h

的($P < 0.05$)。说明 GRECs 细胞屏障功能可能随着 1 μ g/mL LPS 处理时间的延长而增强。



不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图3 LPS不同处理时间的GRECs的Claudin-1相对表达量

Fig. 3 Relative expression of Claudin-1 in GRECs at different times after LPS treatment

3 结论与讨论

LPS(又称内毒素)是大肠杆菌等革兰阴性菌外膜的重要组成成分,能够引起炎症反应,诱导细胞凋亡。SHI等^[13]研究表明,在0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,随着LPS浓度的升高和处理时间延长,奶牛乳腺上皮细胞的活性显著下降。20 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理小鼠乳腺上皮细胞24 h会显著降低细胞存活率^[14]。30 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理12 h能够显著降低牛子宫内膜上皮细胞的活性^[15],10 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理肠上皮细胞12 h后显著降低细胞活力^[16]。本试验结果表明,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理降低了GRECs的细胞活性,与这些结果相似,说明LPS抑制了山羊瘤胃上皮细胞的增殖。

在本试验中,发现随着1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理时间的延长,GRECs活性逐渐增强。帕提古丽·毛拉红^[17]发现,50 mg/L的LPS会抑制GRECs细胞活性,使细胞明显空泡化,形态变得不规则,细胞出现死亡并且有大量的细胞在培养液中漂浮。通过扫描电镜观察发现,LPS能够诱导GRECs自噬数量明显增多,且LPS质量浓度超过50 mg/L时,细胞的抑制率降低;因此,GRECs活性逐渐增强原因可能与细胞自噬有关。

在细胞内,ROS能够被细胞内的抗氧化酶类清除。当氧化和抗氧化平衡系统被打破时,细胞内会大量积累ROS,破坏细胞的脂质,进而影响细胞功能。LDH是糖酵解过程中的一种氧化还原类酶,只有当细胞受到损伤时才会释放出来。在本试验中,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理3 h组GRECs的活性以及GSH-PX、SOD和CAT活性显著低于处理6 h和9 h组,而ROS和MDA含量则极显著高于6 h和9 h组。研究发现,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理奶牛乳腺上皮细胞24 h会引起细胞LDH活性和MDA浓度升高,SOD活性降低^[18];100 ng/mL LPS诱导人脐静脉内皮细胞12 h会引起细胞ROS水平和细胞凋亡数量增加^[19];1 $\mu\text{g/mL}$ LPS

处理山羊瘤胃上皮细胞6 h会引起细胞总抗氧化力、CAT和SOD活性下降,MDA浓度升高^[20]。从本试验结果来看,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS短时间处理能够降低GRECs抗氧化能力,而随着处理时间延长,增强了GRECs的抗氧化能力。研究发现,在SOD抑制剂以及CAT和GPx联合抑制剂的干预下,人肝L02细胞内 H_2O_2 、 O_2^- 和OH水平显著升高,而自噬标志蛋白LC3、Beclin-1和P62的表达量也显著升高。表明 H_2O_2 、 O_2^- 和OH等ROS能够诱发细胞自噬^[21]。LPS能诱导血淋巴细胞中ROS水平的升高,促进自噬的发生,进而参与调控颗粒细胞的增殖。此外,自噬通过减少氧化应激和炎症以及增加一氧化氮的生物利用度来保护动脉内皮功能^[22];因此,在本试验中,随着1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理时间的延长,GRECs细胞可能通过自噬来提高自身抗氧化能力,缓解细胞氧化损伤,进而促进细胞增殖。

LPS会诱发各种细胞因子及其受体和一些促炎因子如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等的表达,引起组织、细胞产生炎症反应。本试验发现,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理3 h组GRECs的TNF- α 和IL-1 β 相对表达量极显著高于6 h和9 h组的,随着培养时间的延长,IL-1 β 相对表达量有所下降,本结果与KENT-DENNIS等^[23]研究结果相似。研究发现,LPS能够引起严重的肺损伤和高肺血管通透性,但可通过增强自噬来缓解;在LPS处理下,人牙龈成纤维细胞自噬明显;NF- κB 正向调节LPS刺激的细胞自噬激活,从而抑制炎症反应,表明组织和细胞能够通过自噬来缓解LPS引起的炎症反应^[24-26]。本试验中,随着1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理时间的延长,GRECs可能通过激活细胞自噬来抑制促炎因子TNF- α 和IL-1 β 的表达,进而降低炎症反应。

紧密连接蛋白是一种由跨膜蛋白、外周膜蛋白和调节分子组成的多蛋白复合体,其中Claudin家族具有封闭细胞与细胞的间隙,而ZO-1起着细胞附着、细胞形态维持和跨细胞屏障的作用。亚急性瘤胃酸中毒会造成LPS释放增加,引起瘤胃上皮Claudin-1和ZO-1等基因和蛋白的表达降低^[27];也有报道称亚急性瘤胃酸中毒会引起瘤胃ZO-1基因和蛋白表达的降低以及Claudin-1基因和蛋白表达的升高^[8]。本试验发现,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS处理3 h,GRECs的ZO-1相对表达量最低,而Claudin-1基因相对表达量最高;随着LPS处理时间的延长,GRECs的ZO-1相对表达量逐渐提升,而Claudin-1相对表达量降低。表明1 $\mu\text{g/mL}$ LPS能够通过改变

紧密连接蛋白的表达来影响瘤胃上皮细胞屏障功能。邱玉环等^[28]研究发现, LPS 通过降低 *ZO-1*、*Occludin* 的表达, 导致肺泡上皮屏障功能受损; 抑制自噬会进一步减少 *ZO-1*、*Occludin* 的表达, 使肺泡上皮屏障功能受损更严重; 而促进自噬, 则明显增加 *ZO-1*、*Occludin* 的表达, 明显改善肺泡上皮屏障功能, 从而对肺脏起保护作用。本试验中, GRECs 的 *ZO-1* 蛋白分布随着 LPS 处理时间的延长而增加, 这可能与细胞自噬有关。

参考文献:

- [1] BALDWIN R L 6 th, CONNOR E E. Rumen function and development[J]. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2017, 33(3): 427-439.
- [2] ECKEL E F, AMETAJ B N. Invited review: Role of bacterial endotoxins in the etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(8): 5967-5990.
- [3] 代宏宇. 脂多糖对反刍动物瘤胃上皮与乳腺上皮细胞的炎性损伤与调控研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [4] 王忠豪. 脂多糖诱导机体炎症时抑制瘤胃挥发性脂肪酸吸收的分子机制[D]. 太谷: 山西农业大学, 2021.
- [5] STEELE M A, GROOM J, KAHLER M, et al. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis[J]. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 300(6): R1515-R1523.
- [6] 张腾, 庄苏, 董文超, 等. 不同精粗比日粮对奶山羊瘤胃液 pH 值、VFA 及血液 VFA 含量的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2013, 45(4): 5-10.
- [7] 韩昊奇, 刘大程, 高民, 等. 不同 NFC/NDF 比对奶山羊瘤胃微生物及瘤胃 pH 变化的影响[J]. *动物营养学报*, 2011, 23(4): 597-603.
- [8] 刘军花. 亚急性瘤胃酸中毒对山羊瘤胃上皮屏障功能的影响及其机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [9] KENT-DENNIS C, PASTERNAK A, PLAIZIER J C, et al. Potential for a localized immune response by the ruminal epithelium in nonpregnant heifers following a short-term subacute ruminal acidosis challenge[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(8): 7556-7569.
- [10] PENNER G B, OBA M, GÄBEL G, et al. A single mild episode of subacute ruminal acidosis dose not affect ruminal barrier function in the short term[J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(10): 4838-4845.
- [11] HU Z X, LIN M, MA X Y, et al. Effect of tea tree oil on the expression of genes involved in the innate immune system in goat rumen epithelial cells[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(8): 2460.
- [12] 占今舜, 刘明美, 詹康, 等. 苜蓿黄酮对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂和乳糖合成的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(1): 91-95.
- [13] SHI H Y, GUO Y M, LIU Y, et al. The in vitro effect of lipopolysaccharide on proliferation, inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells[J]. *Animal Nutrition*, 2016, 2(2): 99-104.
- [14] MIAO J F, FA Y M, GU B B, et al. Taurine attenuates lipopolysaccharide-induced dysfunction in mouse mammary epithelial cells[J]. *Cytokine*, 2012, 59(1): 35-40.
- [15] LYU A, CHEN J J, WANG H C, et al. Punicalagin protects bovine endometrial epithelial cells against lipopolysaccharide-induced inflammatory injury[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2017, 18(6): 481-491.
- [16] 崔海燕, 纪龙翔, 朱宇晴, 等. 黄芪多糖对脂多糖诱导肠上皮细胞 IPEC-J2 氧化应激和炎症反应的缓解作用[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(4): 101-106.
- [17] 帕提古丽·毛拉红. 甘草皂苷对 LPS 诱导的山羊瘤胃上皮细胞损伤的炎性影响研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2018.
- [18] 占今舜, 谷德平, 胡利珍, 等. 苜蓿素对脂多糖刺激下体外培养奶牛乳腺上皮细胞活性和炎症相关基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(2): 641-648.
- [19] 姚琪, 吴青青, 蔡珠兰, 等. 姜酮对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(6): 993-996.
- [20] 占今舜, 霍俊宏, 詹康, 等. 槲皮素对脂多糖刺激下山羊瘤胃上皮细胞抗氧化和抗炎的影响[J]. *草业科学*, 2021, 38(7): 1393-1401.
- [21] 王程, 纪朋艳, 李庆华, 等. 抗氧化酶抑制剂对人肝 L02 细胞自噬的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(24): 6073-6077.
- [22] 张丹. LPS 诱导细胞自噬调控长牡蛎血淋巴细胞增殖的机制初探[D]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
- [23] KENT-DENNIS C, ASCHENBACH J R, GRIEBEL P J, et al. Effects of lipopolysaccharide exposure in primary bovine ruminal epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(10): 9587-9603.
- [24] QIN L, LI M, TAN H L, et al. Mechanistic target of rapamycin-mediated autophagy is involved in the alleviation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 78: 105790.
- [25] LIU J, WANG X X, ZHENG M, et al. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* promotes autophagy of human gingival fibroblasts through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2018, 211: 133-139.
- [26] WANG H F, ZHANG L, LI Q P, et al. Surface-layer protein produced by *Lactobacillus crispatus* JCM 2009 ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation through autophagy cross-talk with the NF- κ B signaling pathway[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 633-640.
- [27] ZHANG K, MENG M J, GAO L P, et al. Rumen-derived lipopolysaccharide induced ruminal epithelium barrier damage in goats fed a high-concentrate diet[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 131: 81-86.
- [28] 邱玉环, 贺天文, 李国平. 自噬对急性肺损伤小鼠肺泡上皮屏障功能的影响及机制探讨[J]. *山东医药*, 2018, 58(22): 28-31.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维