

吕琛,张全伟,王琪,等.金黄色葡萄球菌感染小鼠乳房炎模型的建立及IL-2和IL-4的变化[J].中国实验动物学报,2019,27(5):604-611.

Lyu C,Zhang QW,Wang Q, et al. Establishment of a mouse model of mastitis with *Staphylococcus aureus* infection and its changes of IL-2 and IL-4 expression[J]. Acta Lab Anim Sci Sin,2019,27(5):604-611.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.009

金黄色葡萄球菌感染小鼠乳房炎模型的建立 及IL-2和IL-4的变化

吕琛¹,张全伟²,王琪¹,张勇^{1,2},马友记³,赵兴绪^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院,兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院,兰州 730070;
3. 甘肃农业大学动物科技学院 兰州 730070)

【摘要】目的 探讨炎症因子白细胞介素2(IL-2)和白细胞介素4(IL-4)在小鼠乳房炎发病过程中的变化情况。**方法** 选取12只泌乳期雌鼠(BALB/C),随机分为对照组(A组),高浓度组(B组),中浓度组(C组)和低浓度组(D组)。其中A组注射生理盐水;B、C、D组分别注射 1.2×10^5 、 1.2×10^4 、 6.0×10^3 CFU/mL不同浓度的金黄色葡萄球菌。采用H&E染色法观察其病理变化,通过qRT-PCR、免疫组化法和Western blot法检测小鼠乳腺组织中IL-2和IL-4 mRNA和蛋白水平的表达。**结果** H&E染色结果表明,随着金黄色葡萄球菌的浓度增加乳腺组织的病理学改变逐渐加重。通过免疫组化法、qRT-PCR和Western blot法发现,与A组相比,B、C、D组IL-2的表达水平均明显增高($P < 0.05$),但随着感染菌浓度的增高其表达水平逐渐降低。同时,与A组相比,B、C、D组IL-4的表达水平均明显增高($P < 0.05$),但随着感染菌浓度的增高其表达水平逐渐增高。**结论** 炎症因子IL-2、IL-4参与了金黄色葡萄球菌致小鼠乳房炎的发生,对金黄色葡萄球菌性乳房炎的病理机制奠定了基础,为研究乳腺免疫机制提供科学的理论基础。

【关键词】 乳房炎;白介素因子2;白介素因子4;金黄色葡萄球菌;小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)05-0604-08

Establishment of a mouse model of mastitis with *Staphylococcus aureus* infection and its changes of IL-2 and IL-4 expression

LYU Chen¹, ZHANG Quanwei², WANG Qi¹, ZHANG Yong^{1,2}, MA Youji³, ZHAO Xingxu^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China.

2. College of Life Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070.

3. College of Animal Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070)

Corresponding author: ZHAO Xingxu. E-mail: zhaoux@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the changes of inflammatory factors interleukin-2 (IL-2) and interleukin 4 (IL-4) in the pathogenesis of mouse mastitis. **Methods** Twelve lactating female BALB/C mice were randomly divided into the control group (group A), high concentration group (group B), medium concentration group (group C) and low concentration group (group D). Group A was injected with normal saline. Groups B, C and D were injected with different

【基金项目】甘肃省重点研发计划-农业类(18YF1NA074);甘肃省教育厅高校协同创新团队项目(2018C-15);2018度甘肃省委组织部重点人才项目(041045)。

Funded by the Gansu Province Key Research and Development Program-Agriculture (18YF1NA074), the Gansu Provincial Department of Education Collaborative Innovation Team Project (2018C-15), and 2018 Degree Gansu Provincial Party Committee Organization Department Key Talent Project (041045).

【作者简介】吕琛(1992—),男,硕士,临床兽医学。Email:695941433@qq.com

【通信作者】赵兴绪(1962—),男,教授,博士生导师,临床兽医学与发育生物学。Email:zhaoux@gsau.edu.cn

concentrations of *Staphylococcus aureus*, 1.2×10^5 CFU/mL, 1.2×10^4 CFU/mL and 6.0×10^3 CFU/mL, respectively. The pathological changes were observed using H&E staining. The expression of IL-2 and IL-4 mRNA and protein in the mouse mammary glands were detected by qRT-PCR, immunohistochemistry and western blot. **Results** The pathological examination showed that the pathological changes of breast tissue were gradually aggravated with the increase of the concentration of *S. aureus*. Immunohistochemistry, qRT-PCR and western blot assays showed that the expression levels of IL-2 in the groups B, C and D were significantly higher than that in the group A ($P < 0.05$). However, as the concentration of infectious bacteria increased, the expression level of IL-2 gradually decreased. Compared with the group A, the groups B, C and D showed significantly increased expression levels of IL-4 ($P < 0.05$), but the expression level increased gradually with the increase of concentration of infectious bacteria. **Conclusions** The inflammatory factors IL-2 and IL-4 are involved in the development of mastitis caused by *S. aureus*, which lays a foundation for the pathologic mechanism of *S. aureus* mastitis and provide a theoretical scientific basis for studying the immune mechanism of breast.

【Keywords】 mastitis; IL-2; IL-4; *Staphylococcus aureus*; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

乳房炎是指动物乳腺组织受到病原微生物、理化因素等刺激所引起的一类炎症疾病^[1]。细菌引起的乳房炎最为显著,其中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是引起乳房炎的主要病原菌之一^[2]。细菌感染乳腺组织时被吸附到上皮细胞,导致乳腺局部组织处于异常的生理状态^[3]。乳房炎致使动物产奶量和奶品质下降,治疗成本增加和淘汰率提高,对奶业造成严重的经济损失。治疗乳房炎的关键是抑制炎症及其继发性反应。早期,乳房炎的治疗方法主要通过药物(抗菌药和中草药等)抑制炎症的发生。但长期使用药物导致机体耐药性增加,药物治疗效果降低。此外,绿色食品和抗生素残留问题也越来越为人们关注。随着现代分子生物学的发展,乳房炎的“基因疗法”已成为解决该问题的有效途径之一。

研究表明,白介素家族(interleukin, IL)炎症因子与乳房炎发生有密切的联系^[4]。IL 是一类作用于免疫细胞间的淋巴因子,在炎症反应中起着关键的效用^[5]。IL-2 与淋巴细胞和单核细胞表面的 IL-2 受体结合,增强淋巴细胞的杀伤性^[6]。IL-4 是一种促进 B 细胞增殖的因子,对淋巴细胞具有免疫调节作用,能抑制单核巨噬细胞产生肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 IL-1 β ^[7]。研究报道小尾寒羊乳房炎模型的乳腺组织中 Toll 样受体-4(Toll-like receptor 4, TLR4)表达明显上调^[8]。荷斯坦奶牛乳房部灌注脂多糖引起乳房炎,奶牛乳腺上皮细胞中炎症因子 IL-6、IL-12 和 TNF- α mRNA 表达量均上调^[9]。虽然已有关于乳房炎模型报道^[10-11],但实验动物和引发乳房炎的细菌浓度及检测指标存在较大差异,未见构建乳房炎模型的统一标准。小鼠个体小,易繁殖,实惠,且小鼠第四对和第五

对乳腺组织相当于哺乳动物的乳腺组织^[10],以小鼠为模型具有较多优势。本研究采集甘肃金昌某养殖场奶牛乳房炎的乳样,经肉汤、革兰染色和生化鉴定等,分离纯化获得金黄色葡萄球菌。利用金黄色葡萄球菌悬液感染小鼠乳房,建立小鼠乳房炎模型。采用 H&E 染色法观察其病理变化,研究 IL-2 和 IL-4 在小鼠乳房炎发病过程中蛋白和 mRNA 转录水平的变化,探讨 IL-2 和 IL-4 在乳房炎发病过程中的作用,为哺乳动物乳房炎发病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 周龄清洁级 BALB/C 雄性小鼠 12 只,体重 9.552 ~ 8.805 g,雌性小鼠 12 只,体重 8.712 ~ 7.995 g。来源于中国兰州生物制品研究所【SCXK(甘)2017-0001】,饲养于中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室【SYXK(甘)2015-0003】,饲养温度 19 ~ 25℃,标准饲料喂养,自由饮水。金黄色葡萄球菌来源于患乳房炎奶牛的乳样,由本实验室分离鉴定获得,并低温保存。

1.1.2 仪器和试剂

实时荧光定量 PCR 仪器(FTC-3000P,加拿大),凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),电泳仪和电转槽(Bio-Rad,美国),免疫组化检测试剂盒(索莱宝,中国),Rabbit Anti-IL-2(博奥森,中国),Mouse Anti-IL-4(Santa,美国)。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小鼠乳房炎模型的建立和指标检测

取金黄色葡萄球菌菌株 10 μ L 接种于适量的营

养培养基中^[12], 37℃ 培养箱过夜。采用等比稀释法 (10×) 稀释后, 接种于营养琼脂培养基, 涂抹平板计数法计算菌液浓度。根据文献报道^[13], 选取菌液浓度为 1.2×10^5 、 1.2×10^4 、 6.0×10^3 CFU/mL。

小鼠性成熟后, 腹腔注射孕马血清促性腺激素 (PMSG), 同期发情处理后合笼繁殖。将 12 只泌乳期的母鼠随机分为 4 组: A 组为对照组 (乳部皮内注射生理盐水 50 μ L), 模型组: B 组 (乳部皮内注射 1.2×10^5 CFU/mL 菌液 50 μ L); C 组 (乳部皮内注射 1.2×10^4 CFU/mL 菌液 50 μ L); D 组 (乳部皮内注射 6.0×10^3 CFU/mL 菌液 50 μ L)。接种 24 h 后, 无菌条件下采集小鼠血液进行白细胞数检测; 采集小鼠乳腺组织, 部分置于 4% 甲醛溶液固定, 部分 -80℃ 冷存备用。

1.2.2 H&E 和免疫组织化学染色

将固定组织常规方法制作石蜡切片。经二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 苏木精染色, 盐酸分化液分化, 伊红染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。随机选 5 个视野, 镜下组织病理学观察。

乳腺切片经 65℃ 烤片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 柠檬酸盐缓冲液抗原修复, H_2O_2 室温孵育, 封闭液 (试剂 A) 封闭, IL-2 (1/85) 和 IL-4 (1/250) 过夜孵育, 二抗 (试剂 B)、试剂 C 室温孵育, DAB 显色,

苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 梯度酒精、二甲苯脱水透明, 树胶封片。镜下观察照相。每个组织取 3 张切片, 每张切片随机选 5 个视野。Image-Pro Plus 6.0 扫描其灰度值进行统计学分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

取 1 mg 小鼠乳腺组织, 根据 TransZol UP RNA 操作说明, 提取 Total RNA。取 3 μ L Total RNA 样品, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后, 测定 Total RNA 浓度。根据测定结果, 将其浓度调至 500 ng/ μ L。按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明两步法合成 cDNA, 产物于 -20℃ 保存备用。根据 NCBI 中小鼠 IL-2 (NM_008366.3), IL-4 (NM_021283.2) 和 GAPDH (NM_001289726.1) 的序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 由西安擎科泽西生物技术有限公司合成 (表 1)。

以 cDNA 为模板, qRT-PCR 检测 IL-2、IL-4 和 GAPDH mRNA 的表达丰度。反应体系为 20 μ L: 2× TranStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L, 上游下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。扩增程序采用三步法: 94℃ 30 s, 94℃ 5 s, 56℃ 15 s, 72℃ 10 s; 共 45 个循环。每个样品重复 3 次, 反应结束后观察扩增曲线和溶解曲线, 采集 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据处理^[14]。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of the primer sequences

引物 Primers	引物序列 (5'~3') Primer sequences	片段长度 (bp) Product length	退火温度 T _m (°C)
IL-2	F: AGCCCCACTTCAAGCTCTAC R: TCAATTCTGTGGCCTGCTTG	190	56
IL-4	F: CGGATGCAACGACAATCACT R: ACCTTGAAGCCCTACAGAC	153	56
GAPDH	F: GGTACCAGGCTGCTTT R: ACTGTGCCCTTGACCTTGC	129	56

1.2.4 蛋白质免疫印迹

取 100 mg 乳腺组织彻底研磨后, 加入 1 mL RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 经 12 000 r/min, 4℃ 离心 30 min, 轻轻吸取上清液。Bradford G250 法测定总蛋白浓度, 定量后与蛋白缓冲液混合, 煮沸变性, -20℃ 保存。取 30 μ g 蛋白样品, 经 5% SDS-PAGE 浓缩胶和 12% 分离胶电泳后, 蛋白转移至聚偏氟乙烯膜 (PVDF), 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 Rabbit Anti-IL-2 (1/250) 和 Mouse Anti-IL-4 (1/500) 抗体, 4℃ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗 (1/4000) 37℃ 孵育 2 h。ECL 化学发光试剂进行显影, 拍照。Image-Pro Plus 6.0 软件扫描其灰

度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 分析数据, 使用“平均值±标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组均数比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 组间两两比较选用 LSD-t 检验法。P < 0.05 表示差异具有显著性, P < 0.01 表示差异极具有显著性。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌感染小鼠的指标检测

感染金黄色葡萄球菌 24 h 后, 模型组血液白细胞数和中性粒细胞数均显著高于对照组 (P <

0.05), B 组白细胞和中性粒细胞数明显高于 C 组和 D 组 ($P < 0.01$) (表 2)。白细胞和中性粒细胞数目增多, 表明是由细菌引发的炎症反应。

表 2 金黄色葡萄球菌感染小鼠时 24 h 白细胞数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of leukocyte counts in the mice infected with *S. aureus* ($\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	白细胞数 ($\times 10^9$) Leukocyte counts	中性粒细胞数 ($\times 10^9$) Neutrophil count
A	4.96 \pm 0.16	2.03 \pm 0.15
B	11.51 \pm 0.13**	4.20 \pm 0.14*
C	9.65 \pm 0.3*	4.83 \pm 0.21*
D	7.69 \pm 0.35*	3.83 \pm 0.17*

注: A; 对照组; B; 模型组, 菌液浓度为 1.2×10^5 CFU/mL; C; 模型组, 菌液浓度为 1.2×10^4 CFU/mL; D; 模型组, 菌液浓度为 6.0×10^3 CFU/mL。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

Note. A. Control group. B, C and D. Model groups infected with *S. aureus* of 1.2×10^5 CFU/mL, 1.2×10^4 CFU/mL and 6.0×10^3 CFU/mL, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same below)

2.2 金黄色葡萄球菌感染小鼠的病理变化

不同浓度的菌液感染小鼠 24 h 后, 模型组和对照组均无死亡, 肉眼观测小鼠乳房外部无异常变化 (图 1)。模型组小鼠精神沉郁, 采食和饮水均减少。临床诊断发现: A 组小鼠乳头触感柔软, 乳腺组织正常, 乳汁为乳白色。B 组小鼠乳头触感坚硬如沙粒状, 乳腺组织及周围组织有大量充血, 乳汁中有大量脓液。C 组和 D 组小鼠乳头触感较硬, 乳腺组织

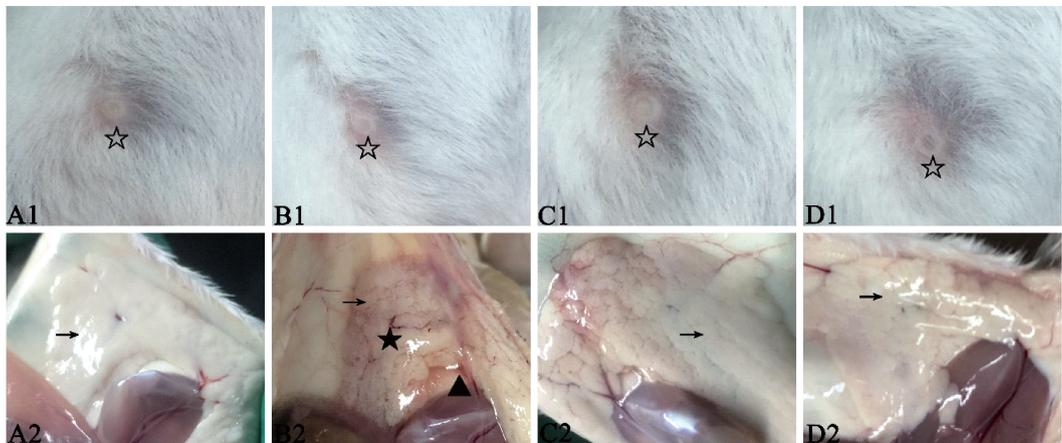
有充血点, 乳汁中含少量脓液。结果表明感染浓度不同, 组间存在明显差异。

2.3 金黄色葡萄球菌感染小鼠乳腺组织的变化

正常乳腺上皮细胞分为两层, 肌上皮细胞和腺上皮细胞。A 组肌上皮细胞和腺上皮细胞结构完整, 轮廓清晰。B 组乳腺上皮细胞 (肌上皮细胞和腺上皮细胞) 发生溶解, 伴随着大量脂肪细胞浸润。C 组乳腺上皮细胞萎缩, 腔内有少量分泌物。D 组乳腺上皮细胞之间排列松散, 伴有脂肪细胞浸润现象 (图 2)。结果表明, 成功建立了金黄色葡萄球菌感染的小鼠乳房炎模型, 随着感染浓度的增加, 炎症程度逐渐加剧。

2.4 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白分析

菌种感染小鼠 24 h 后, 免疫组织化学染色显示, 对照组和模型组小鼠乳腺组织中均有 IL-2 和 IL-4 阳性表达, 呈棕色颗粒, 主要定位于乳腺上皮细胞的细胞质中 (图 3)。IL-2 和 IL-4 分布部位相同, 但不同感染程度中存在差异。与 A 组相比, B 组、C 组和 D 组乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白阳性反应明显增强。通过积分光密度分析发现 (图 4), D 组 IL-2 表达量最高, 表达趋势随着浓度降低而增高 ($P < 0.05$); 而 B 组 IL-4 的表达量最高, 表达趋势随着浓度增加而增高 ($P < 0.05$)。

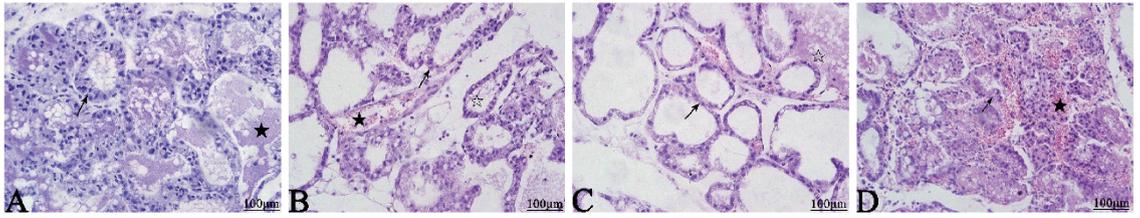


注: A1-D1; 对照组和模型组乳房示意图; A2-D2; 对照组和模型组乳房解剖示意图。A 系列为未感染组; B 系列为高剂量组; C 系列为中剂量组; D 系列为低剂量组 (下同)。→: 乳腺组织; ☆: 对照组和模型组乳房; ★: 充血部位; ▲: 脓液。

图 1 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织解剖结构观察

Note. A1-D1. Gross appearance of the breasts of mice in the control and model groups. A2-D2. Anatomical changes of the mouse mammary glands in the control and model groups. A1, A2. Uninfected group. B1, B2. High dose group. C1, C2. Moderate dose group. D1, D2. Low dose group. (The same below). →: breast tissue; ☆: breast in the control and model groups; ★: hyperemia; ▲: pus.

Figure 1 Observation of the anatomical structure of the mammary glands of mice infected with *S. aureus*

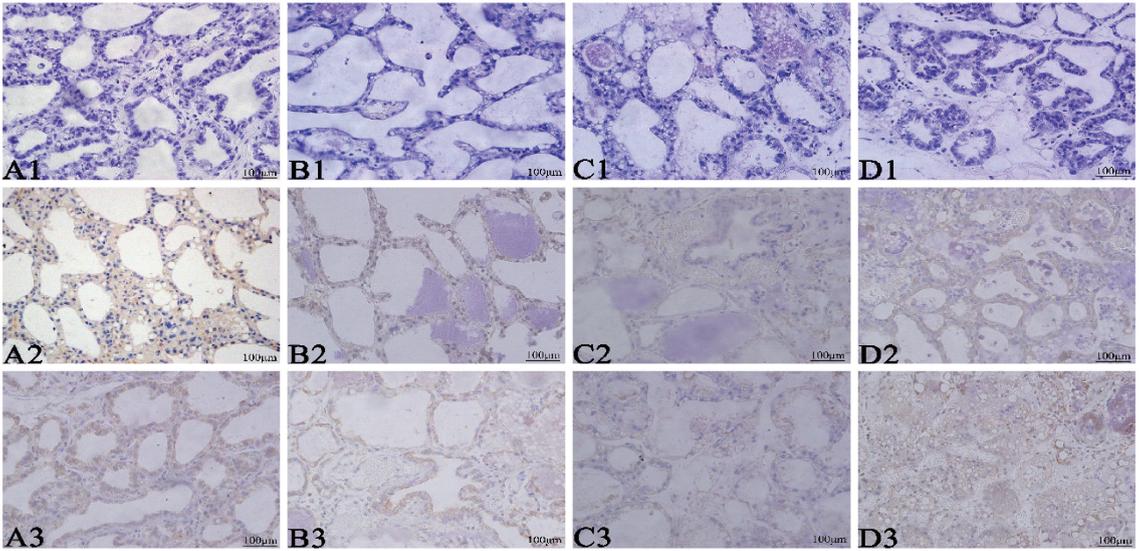


注:→:乳腺上皮细胞;★:乳腺分泌物;☆:脂肪细胞。

图 2 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织病理 H&E 染色观察(40×)

Note. →: Glandular epithelial cells. ★: Mammary secretion. ☆: adipocytes.

Figure 2 Pathological changes in the mouse breast tissues infected with *S. aureus* (H&E staining, 40×)



注:A1-D1:对照和模型组小鼠乳腺组织的阴性对照;A2-D2:对照和模型组小鼠乳腺组织中 IL-2 蛋白的表达变化;A3-D3:对照和模型组小鼠乳腺组织中 IL-4 蛋白的表达变化。A 系列为未感染组,B 系列为高剂量组,C 系列为中剂量组,D 系列为低剂量组。

图 3 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白表达

Note. A1-D1. Negative control of mammary gland tissues in the control and model groups. A2-D2. Expression of IL-2 protein in mammary gland tissues of the control and model groups. A3-D3. Expression of IL-4 protein in mammary gland tissues of the control and model groups. Series A. Uninfected group. Series B. High dose group. Series C. Moderate dose group. Series D. Low dose group.

Figure 3 Expression of IL-2 and IL-4 proteins in the breast tissues of mice infected with *S. aureus*

2.5 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 mRNA 变化

qRT-PCR 检测感染小鼠乳腺组织 IL-2 和 IL-4 mRNA 表达丰度。对照组和模型组中均可见 IL-2 和 IL-4 mRNA 的表达(图 5)。D 组 IL-2 mRNA 的相对表达量最高($P < 0.05$);B 组 IL-4 mRNA 的相对表达量最高($P < 0.05$),说明 IL-2 和 IL-4 mRNA 在乳房炎发生过程中存在差异性表达。

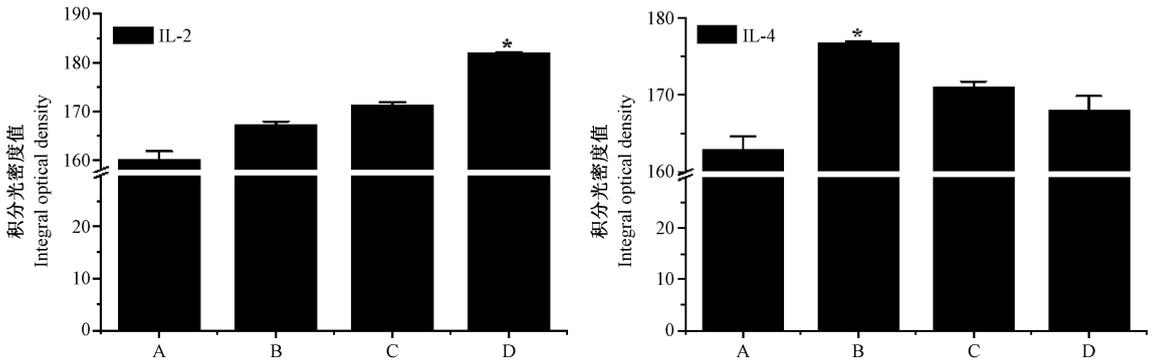
2.6 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白的表达

Western blot 检测感染小鼠乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白的表达。结果显示,IL-2 和 IL-4 蛋白在对照组和模型组中均有表达,但不同感染浓度存在显

著差异(图 6)。D 组 IL-2 蛋白表达量显著高于其他组($P < 0.05$),B 组和 C 组差异不明显;B 组 IL-4 蛋白的表达量最高($P < 0.05$),显著高于 C 组和 D 组。IL-2 和 IL-4 蛋白和 mRNA 表达趋势基本一致。

3 讨论

目前,乳房炎是奶业所面临的主要疾病之一,其中奶牛和奶山羊乳房炎最为显著。乳房炎危害大、治疗花费高,对奶业造成极大的经济损失,严重制约着奶业的发展。以家畜为模型研究乳房炎的发病机理,受多重因素如成本、管理及时效等限制。以小鼠为模型研究乳房炎,具有多种优势,可以更方便地研究乳房炎的发病机制。以此为借鉴,可为



注:A:对照组;B:模型组,菌液浓度为 1.2×10^5 CFU/mL;C:模型组,菌液浓度为 1.2×10^4 CFU/mL;D:模型组,菌液浓度为 6.0×10^3 CFU/mL。* $P < 0.05$ 。(下同)

图4 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白阳性反应的积分光密度值

Note. A. Control group. B, C and D. Model groups infected with *S.aureus* of 1.2×10^5 CFU/mL, 1.2×10^4 CFU/mL, and 6.0×10^3 CFU/mL, respectively. * $P < 0.05$. (The same below)

Figure 4 Integral optical density values of IL-2 and IL-4 proteins in the mouse breast tissues

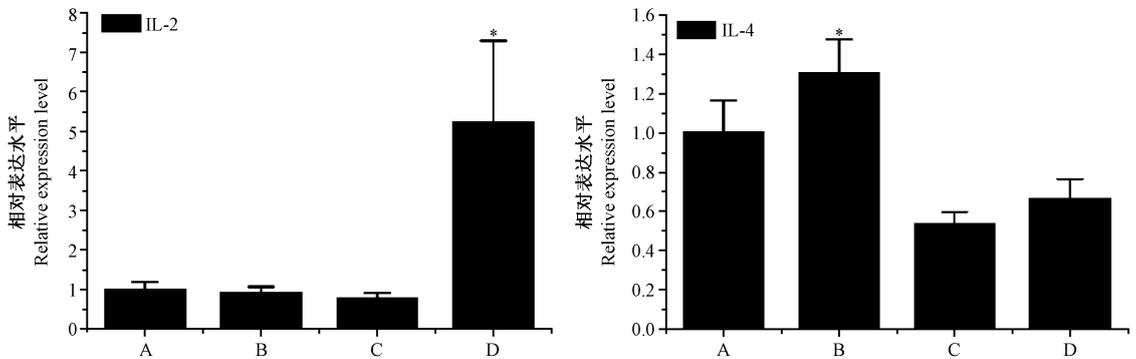


图5 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 mRNA 相对表达

Figure 5 Relative expression level of IL-2 and IL-4 mRNA in the mouse breast tissues infected with *S. aureus*

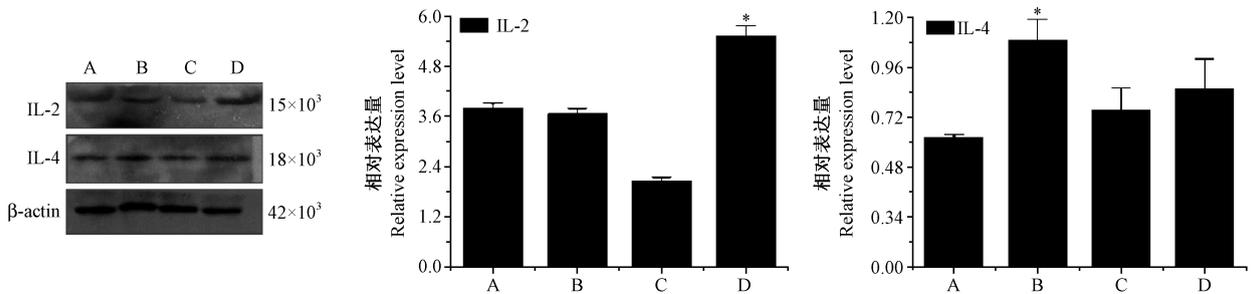


图6 金黄色葡萄球菌感染小鼠的乳腺组织中 IL-2 和 IL-4 蛋白免疫印迹相对表达量

Figure 6 The relative expression of IL-2 and IL-4 proteins in the mouse breast tissues (Western blot)

家畜乳房炎的研究提供主要的依据。

本研究从患病奶牛乳汁中分离获得致病性的金黄色葡萄球菌,利用其建立小鼠乳房炎模型。杨明锋等^[13]构建的小鼠乳房炎模型中,三种注射量均能诱发小鼠乳腺组织生理和病理变化,且菌液浓度越高,引起小鼠乳房炎症越严重。与本实验小鼠模型结果相似,但 HE 染色与本实验各组的病理变化

均不同,原因可能取决于诱发乳房炎细菌浓度的差异。吕英等^[15]构建的奶山羊隐性乳房炎模型中,体细胞和细菌浓度呈显著正相关,结果发现细菌浓度可以正向诱导体细胞数的增加。与本研究小鼠乳房炎血常规结果类似,结果表明 B 组白细胞数均高于 A 组、C 组和 D 组 ($P < 0.01$)。实验结果说明本研究成功构建了金黄色葡萄球菌诱发的小鼠乳房

炎模型,根据白细胞数和 H&E 染色这两个指标结合临床表现,确定每只小鼠注射 1.2×10^5 CFU/mL 金黄色葡萄球菌菌液 50 μ L 可以引起典型症状的乳房炎。

调节机体的免疫状态可以更有效地防治乳房炎,免疫状态分为促炎和抗炎两方面^[16]。辅助性 T 细胞 1(T helper cells, Th1)分泌 IL-2 等促炎因子介导细胞免疫;Th2 分泌 IL-4 等抗炎因子介导体液免疫。两者处于动态平衡,能维持机体正常的免疫功能,当失衡时则引起炎症反应^[17]。罗小丽等^[18]通过免疫组化发现,阳性表达主要在乳腺癌细胞和正常的乳腺组织上皮细胞中。本实验通过免疫组织化学发现,阳性表达也主要在正常和病理的乳腺上皮细胞中表达。同样,通过积分光密度值发现,以低浓度感染小鼠时,IL-2 的表达水平达到最高,IL-4 表达水平较低,可能起初炎症反应由抗炎因子激活,因此抗炎因子抑制炎症的发生;当高浓度感染时,表达水平发生逆转,此时由抗炎因子为主导。当促炎因子表达增加时,存在负反馈机制。为了拮抗体内促炎因子对组织器官的损害,抗炎因子水平也同时升高,维持促炎因子和抗炎因子之间的平衡,如果不能维持这种平衡,就会发生炎症扩散,这种平衡的机制还需进一步研究。

qRT-PCR 和 Western blot 检测发现,随着感染浓度的增加,IL-2 在乳腺组织的表达先升高后降低;而 IL-4 表达水平先下调后上调。实验结果与岳文杰等^[19]检测结肠炎组织中 IL-2 和 IL-4 表达量与疾病活动度的结果趋势相似。Miller 等^[20]研究发现,慢性前列腺患者的促炎因子 IL-8 和抗炎因子 IL-10 的表达水平之间呈负相关,即 IL-8 表达水平的增高伴随着 IL-10 表达水平的降低,与本实验中 IL-2 表达水平和 IL-4 表达水平的结果趋势相一致。虽然识别受体能快速检测到金黄色葡萄球菌感染乳腺上皮细胞,但金黄色葡萄球菌不能激活核因子,不能有效地促进免疫应答,最终导致隐性乳房炎^[21],这可能与乳腺炎症反应的强弱有关,也可能是本实验中感染 24 h 后 IL-2 和 IL-4 在不同浓度时表达水平不同的原因。在乳房炎发生过程中,促炎因子 IL-2 和抗炎因子 IL-4 相互约束,发挥着一定的作用,但其相关机制有待进一步探究,为今后哺乳动物乳房炎的发病机制提供科学的理论依据,为进一步研究提供可靠的技术支持。

4 结论

成功的建立了乳房炎模型,且不同浓度金黄色葡萄球菌感染小鼠乳腺组织时 IL-2 和 IL-4 的表达均不同,证实炎症因子 IL-2 和 IL-4 参与乳房炎的发生与发展。

参 考 文 献(References)

- [1] Gao J, Zhang HQ, He JZ, et al. Characterization of *Prototheca zopfii* Associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China [J]. Mycopathologia, 2012, 173(4): 275-281.
- [2] Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, et al. Cow and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis [J]. J Dairy Sci, 2001, 84(12): 2649-2663.
- [3] Juronen D, Kuusk A, Kivirand K, et al. Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk [J]. Talanta, 2018, 178: 949-954.
- [4] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [J]. Ann Rev Immunol, 2009, 27(27): 519-550.
- [5] Howard M. Interleukins for B lymphocytes [J]. Sur Immunol Res, 1983, 2(3): 210-212.
- [6] Handa T, Matsui S, Yoshifuji H, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor as a biomarker in immunoglobulin G4-related disease [J]. Mod Rheumatol, 2018, 28(5): 838-844.
- [7] Xia F, Deng C, Jiang Y, et al. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma [J]. Autophagy, 2018, 14(3): 450-464.
- [8] 陈富强, 张小丽, 李发弟, 等. TLR4 基因在小尾寒羊乳房炎乳腺组织中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(3): 349-356.
Chen FF, Zhang XL, Li FD, et al. The expression of TLR4 gene in mastitis breast tissue of small tail Han sheep (*Avis aries*) [J]. Chin J Agric Biotechol, 2016, 24(3): 349-356.
- [9] 涂勇. β -防御素-5 mRNA 在荷斯坦奶牛乳腺上皮细胞中的表达 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.
Tu Y. Expression of β -defensin-5 mRNA in mammary gland epithelial cells of Holstein cows [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [10] 高瑞娟, 王纯洁, 敖日格乐, 等. 蒙药成份复方对乳腺炎模型小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(1): 106-112.
Gao RJ, Wang CJ, Aorigele, et al. Immunoregulation effect of Mongolian medicine composition compounds on mastitis model mice [J]. J Chin Agr Univ, 2018, 23(1): 106-112.
- [11] 宋佳玮. 绵羊抗菌肽 GNLY 基因多态性分析及合成多肽对小鼠乳房炎模型治疗作用的研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
Song JZ. Study on the polymorphism of sheep antibacterial peptide GNLY gene and the therapeutic effect of synthetic peptide

- on mouse mastitis model [D]. Shihezi: Shihezi University, 2018.
- [12] 范薇, 隋丽华, 刘永梅, 等. 清洁级实验动物细菌学检测用主要培养基的筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(3): 4-6.
- Fan W, Yan LH, Liu YM, et al. Selection of culture media in bacteria detection of cleaning laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2001, 11(3): 4-6.
- [13] 杨明锋, 陈创夫, 王正荣, 等. 金黄色葡萄球菌感染小鼠乳房炎模型的建立 [J]. 中国兽医学报, 2011, 31(1): 107-109+114.
- Yang MF, Chen CF, Wang ZR, et al. Establishment of mastitis model in mouse by artificial infection of *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Vet Sci, 2011, 31(1): 107-109+114.
- [14] Zhang QW, Wang Q, Gong JS, et al. Yak IGF2 promotes fibroblast proliferation via suppression of IGF1R and PI3KCC expression [J]. Genes, 2018, 9(3). pii: E169.
- [15] 吕英, 李庆章. 奶山羊隐性乳房炎模型的建立及早期诊断指标的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(4): 305-308+325.
- Lyu Y, Li QZ. Establishment of chronic mastitis model in milk goat [J]. Chin J Prevent Vet Med, 2008, 30(4): 305-308+325.
- [16] 李梦媛, 燕正强, 韦荣飞, 等. IL-37b 通过抑制树突状细胞相关的免疫应答缓解感染性休克 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 44-49.
- Li MY, Yan ZQ, Wei RF, et al. IL-37b alleviates septic shock through inhibition of immune responses related to dendritic cells [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(11): 44-49.
- [17] 杨元, 袁正洲, 吕志宇, 等. 血管活性肠肽调控 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 平衡对实验性自身免疫性脑脊髓炎防治作用的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 66-71+54.
- Yang Y, Yuan ZZ, Lyu ZY, et al. The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrospinal meningitis (EAE) [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(11): 66-71+54.
- [18] 罗小丽, 刘自光, 何慧君, 等. RNF168 在乳腺癌组织中的表达分析 [J]. 中国医学工程, 2019, 27(2): 6-9.
- Luo XL, Liu ZG, He HJ, et al. Expression analysis of RNF168 in breast cancer tissues [J]. Chin Med Eng, 2019, 27(2): 6-9.
- [19] 岳文杰, 刘懿, 徐薇, 等. 溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜中 IL-2、IL-4、IL-17 和 IL-10 的表达特点及其与疾病活动度的关系 [J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(5): 454-459+488.
- Yue WJ, Liu W, Xu W, et al. The expressions of IL-2, IL-4, IL-17 and IL-10 in ulcerative colitis (UC) mucosa and its relation with disease activity [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2012, 39(5): 454-459+488.
- [20] Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, et al. Interleukin-10 levels in seminal plasma: implications for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome [J]. J Urol, 2002, 167(2): 753-756.
- [21] Yang W, Zerbe H, Petzl W, et al. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder [J]. Mol Immunol, 2008, 45(5): 1385-1397.

[收稿日期] 2019-03-25