

围产期蒙古牛外周中性粒细胞凋亡相关基因的表达分析

刘 阳¹,张新颖^{2*},耿万友²,毛景东²,杜立银^{2**}

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院,内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古民族大学
动物科学技术学院,内蒙古 通辽 028042)

摘要:选择3头2~3胎次妊娠蒙古牛,分别于分娩前后以及分娩当天采集静脉血,分离中性粒细胞(PMNs)、血清,采用RT-PCR、Western blotting、放射免疫法、全自动动物血液分析仪检测了围产期蒙古牛外周PMNs凋亡相关基因Bcl-2、Bax、P53、Cyt-c在转录和蛋白质水平上的变化,外周血主要白细胞数量,血清中雌二醇(E2)、孕酮(P4)及糖皮质激素(GC)的浓度变化,以揭示蒙古牛围产期免疫抑制下外周PMNs的免疫状态,从而为PMNs免疫抑制机制研究提供理论参考。结果显示,外周血PMNs和单核细胞(MC)总数及淋巴细胞数量总体上均以分娩当天为拐点呈先降后升的趋势。外周血血清E2质量浓度于分娩前22 d逐渐升高,分娩前2 d升至最高,而后下降;P4质量浓度于分娩前22 d开始逐渐下降,分娩当天迅速下降,之后趋于平缓;GC质量浓度变化趋势与P4相反。凋亡抑制基因Bcl-2 mRNA和蛋白表达量均以分娩当天为拐点呈先升后降的趋势,促凋亡基因Bax、P53和Cyt-c mRNA和蛋白表达趋势均与Bcl-2相反。总之,围产期蒙古牛外周PMNs凋亡相关基因表达呈明显动态变化趋势,临近分娩时凋亡抑制作用显著增强,分娩时抑制效应达到峰值,分娩后降低。

关键词:凋亡基因;基因表达特征;中性粒细胞;围产期;蒙古牛

中图分类号:S823 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2018)06-0127-07

Apoptotic Gene Expression of Peripheral Blood Neutrophils in Perinatal Mongolia Cattle

LIU Yang¹, ZHANG Xinying^{2*}, GENG Wanyou², MAO Jingdong², DU Liyin^{2**}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China;

2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China)

Abstract: The blood samples were collected before, during and after childbirth from three pregnancy Mongolian cows giving birth two or three times, and the peripheral polymorphonuclear neutrophils (PMNs), sera were separated for detecting the level of transcription and protein expression of apoptosis related genes, including Bcl-2, Bax, P53, and Cyt-c in peripheral PMNs using RT-PCR, and Western blotting. The changes of peripheral neutrophils number, and concentration changes of blood serum estradiol (E2), progesterone (P4) and glucocorticoids (GC) were detected for revealing peripheral PMNs immune state of the Mongolian cow in the perinatal immune suppression, so as to provide theoretical reference for the study of PMNs immunosuppression mechanism. The results indicated that the total number of PMNs, mononuclear cells (MCs), and lymphocytes in peripheral blood showed down first and then up the childbirth to be the inflection point. The E2 mass concentration gradually increased 22 days

收稿日期:2017-10-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31260626);内蒙古自治区自然科学基金项目(2015MS0338);内蒙古自治区留学回国人员科技活动项目(启动类);内蒙古高等学校科学研究项目(NJZY12122)

作者简介:刘 阳(1991-),女,内蒙古赤峰人,在读博士研究生,研究方向:兽医寄生虫学。

E-mail:18747360582@139.com.* 同等贡献作者

** 通讯作者:杜立银(1972-),男,内蒙古通辽人,教授,博士,主要从事围产动物免疫生理研究。

E-mail:dly2000@aliyun.com

before delivery, and reached a peak 2 days before delivery. The mass concentration of P4 decreased gradually 22 days before delivery, rapidly decreased on the day of delivery and then leveled off. GC mass concentration trend was opposite to that of P4. The expression of *Bcl-2* showed a trend of rising first and then falling at the inflection point on the day of childbirth. The expression trend of apoptosis promoting genes *Bax*, *P53* and *Cyt-c* was opposite to that of *Bcl-2*. In short, the apoptosis related gene expression showed a trend of obvious dynamic changes and near to childbirth the apoptosis inhibition significantly enhanced, reaching a peak during childbirth, reducing after childbirth.

Key words: Apoptotic gene; Characteristics of gene expression; PMNs; Perinatal period; Mongolia cattle

蒙古牛是我国畜禽遗传资源保护的地方黄牛,是我国北方地区黄牛改良的主要母系之一,属于国家战略性生物资源。但由于围产期免疫抑制疾病如奶牛产后子宫炎、乳房炎等导致农牧区蒙古牛存栏量锐减,个别地区甚至出现种群消失的现象^[1]。而作为机体免疫的第一道防线的中性粒细胞(Poly-morphonuclear neutrophils, PMNs),其数量、功能的改变均会对动物机体的免疫功能起到至关重要的作用。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,被广泛认为是调控围产期PMNs数量的一种重要途径。参与调控细胞凋亡的基因主要有促细胞凋亡基因(主要包括*Bax*、*P53*、*Cyt-c*、*caspases*)和抗细胞凋亡基因,如*Bcl-2*。细胞凋亡通过上调或下调*Bax*、*Cyt-c*、*P53*和*Bcl-2*等基因的表达,从而调节PMNs数量,以达到维持机体免疫状态的目的。其中,*Bcl-2*与*Bax*表达量的比值对细胞凋亡具有决定作用^[2]。*Bcl-2*基因可通过稳定线粒体结构而阻止线粒体释放*Cyt-c*,*Bax*基因则会破坏线粒体膜的稳定性。*P53*基因可通过激活其他促凋亡基因转录的方式来启动细胞凋亡,其表达量与细胞凋亡率呈正相关^[3]。研究证实,细胞内凋亡信号能够直接促进或抑制细胞因子*Fas*(Fatty acid synthase)触发PMNs凋亡^[4],而*Cyt-c*基因在触发PMNs凋亡和驱动PMNs老化的信号转导中有显著作用^[5]。此外,围产期免疫抑制的发生与体内雌二醇(主要为17 β -雌二醇,E2)、糖皮质激素(Glucocorticoid,GC)和孕酮(Progesterone,P4)浓度及其受体活性的改变密切相关,显著影响PMNs等免疫细胞的分布及功能变化。蒙古牛为古老地方黄牛品种,目前,关于其围产期外周PMNs凋亡相关基因的研究尚无报道。为此,研究围产期蒙古牛外周PMNs凋亡基因的表达情况,以揭示蒙古牛围产期免疫抑制下外周PMNs的免疫状态,从而为评价PMNs免疫抑制特征及机制提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

主要试剂有 Percoll 细胞分离液(Pharmacia 公

司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),AMV 反转录试剂盒,*Taq* DNA 聚合酶(KR 公司),Bradford 蛋白质定量试剂盒(北京天根生物科技公司),Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术公司),*Bcl-2* 抗体、*Bax* 抗体、*Cyt-c* 抗体(武汉博士德生物工程公司),*P53* 抗体(碧云天生物科技研究所),DL2000 DNA Marker、蛋白质预染 Marker(北京天根生物科技公司),RIPA 裂解液、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(碧云天生物科技研究所)。

主要仪器有 Gene AMP PCR System 2700(Applied Bio system 公司),TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),TGL-16M 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),JY-92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),W-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),DYY-12C 型电泳仪、DYY-7C 型电泳仪(北京六一公司),UV-3C 紫外透射分析仪、凝胶成像分析系统(珠海黑马医学仪器公司),MDF-U2086S 超低温冰箱(SANYO 公司),核酸-蛋白测定仪(Biophotometer)(德国 Eppendorf 公司),YS100 显微镜(Nikon 公司),M200 酶标仪(TECAN 公司)。

选择 3 头 2~3 胎次妊娠蒙古牛,分别于分娩前 22、18、14、10、8、6、4、2 d,分娩当天和产后 2、4、6、8、10、14 d 颈静脉采血 50 mL,用于 PMNs 分离。分娩前采血时间标记“-”,分娩当天记作“0”。

1.2 试验方法

1.2.1 PMNs 的分离、计数 采用 Bhatnagar 等^[6]、Stillie 等^[7]报道的 Percoll 分离液法。Percoll 分离液质量浓度为 1.084 g/mL,按上述分离方法,得到红细胞与 PMNs 混合沉淀层,再用 RIPA 裂解液裂解细胞 2~3 次,即可分离出 PMNs 白色沉淀,加入适量 RPMI 1640 细胞培养液,尽量洗尽残留的红色液体。采用台盼蓝拒染法鉴定细胞活力,经检验细胞活力若达 97% 以上,则可以进行计数板计数。将 PMNs 沉淀按每管 $6 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞分装冻存于 -80 °C。

1.2.2 血清中类固醇激素浓度的检测 试验采用放射免疫法(Radioimmunoassay, RIA)分析外周血血清中GC、E2和P4浓度变化。具体操作步骤如下:首先,稀释GC、E2和P4标准品,溶解15 min摇匀后方可使用。溶解兔抗GC、E2和P4抗体,其他组成成分充分混匀后可直接使用。然后取圆底聚苯乙烯试管若干,将待测样品管编号,用微量加样器加样,充分摇匀后,室温放置15 min,1 500×g离心15 min,弃上清,测各沉淀管的放射性计数(cpm),计算结果并进行统计分析。

1.2.3 外周血各型白细胞动态变化检测 将外周抗凝血轻轻上下颠倒混匀,取1 mL利用全自动动物血液细胞分析仪检测不同时间外周血PMNs、单核细胞(Mononuclear cell, MC)数和淋巴细胞数的变化。

1.2.4 RT-PCR检测PMNs凋亡相关基因mRNA表达量 将PMNs冻存样品在室温进行融化,而后

在小型振荡器上振荡30 s,直到完全解离出PMNs核蛋白复合物。然后依照Sigma RNA提取试剂盒说明书进行总RNA的提取。吸取3 μL RNA溶液,利用核酸浓度微量测定仪,检测RNA浓度及其OD值,OD₂₆₀/OD₂₈₀≥1.9、OD₂₆₀/OD₂₃₀≥2.0的RNA,纯度符合要求,可用于反转录。

根据GenBank中牛源凋亡相关基因(*Bax*、*P53*、*Cyt-c*、*Bcl-2*)序列,运用Primer 5.0软件设计引物,引物序列见表1。合成cDNA第一条链后进行PCR反应,反应体系:10×PCR Buffer 2.0 μL, cDNA 1 μL, dNTP 0.5 μL, 上、下游引物各0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL, 加ddH₂O至20 μL。PCR反应条件:94 °C预变性5 min;94 °C 30 s,合适温度退火30 s,72 °C 30 s,30个循环;72 °C延伸10 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,用Quantity One对凋亡相关基因mRNA和内参基因Tubulin条带进行灰度扫描,计算相对表达量。

表1 牛源凋亡基因的PCR引物信息

引物名称	登录号	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	PCR产物长度/bp
<i>Bcl-2</i> -F	FJ155813.1	F:TCTCCTCACCGACTCTTAG R:CTCTTCTTCAGCCCTCCAC	55	289
<i>Bax</i> -F	NM_173894.1	F:CCCGAGAGGTCTTTTCCG R:GGGCCTTGAGCACCAAGTT	57	111
<i>P53</i> -F	X81704.1	F:CTGGATGAATGTCCGAATG R:AAACACGCACCTCAAAGC	56	146
<i>Cyt-c</i> -F	NM_001038090.1	F:CAAGAAGTACATCCCTGGAA R:ATGTGACTCCTCCTGTTTA	50	311
<i>Tubulin</i> -F	AY141970.1	F:CAGGCCGGACAGTGTGGCAC R:GGCTTCATTATAGTACACAGA	55	135

1.2.5 Western blotting检测PMNs凋亡相关蛋白表达量 在4 °C条件下,解冻PMNs,14 000 × g离心2 min弃上清,加入RIPA裂解液,充分振荡,14 000 × g离心10 min,取上清用Bradford法测定蛋白质浓度;然后用2×SDS样品缓冲液按1:1混合煮沸变性,10% SDS-PAGE凝胶电泳;转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,TBST缓冲液漂洗3次,每次5~10 min,将PVDF膜置5%脱脂奶中室温封闭3 h后取出,TBST漂洗3次,每次10 min,与P53、Bax、Cyt-c、Bcl-2和Tubulin(对照)蛋白一抗孵育(1:500)(4 °C过夜),PVDF膜经TBS T漂洗3次,每次10 min;与HRP标记的IgG(1:1 000)室温孵育2 h,经TBS T漂洗、DAB显色,观察拍照,用Glyko Bandcan 5.0软件分析。

1.3 数据处理

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析处

理,利用单因素方差分析(One-way ANOVA)、LSD法比较差异显著性。

2 结果与分析

2.1 围产期蒙古牛外周PMNs的分离鉴定

外周血轻轻置于分离液液面上,离心后取出白色层即下数第3层,经瑞氏染色镜检鉴定为PMNs,核呈深染的弯曲杆状(马蹄铁形)或分叶状,叶间有纤细的缩窄部相连。

2.2 围产期蒙古牛血液PMNs数量和血清类固醇激素浓度的变化

2.2.1 PMNs和MC总数 由图1可知,蒙古牛分娩前22~10 d PMNs和MC总数逐渐升高,分娩前10 d达到峰值,分娩前10~0 d逐渐下降,分娩后又逐渐升高。这说明伴随分娩临近,PMNs和MC免疫抑制作用逐渐减弱,分娩当天细胞数量降至最低,免

免疫抑制作用最弱, 分娩后又逐渐增强。

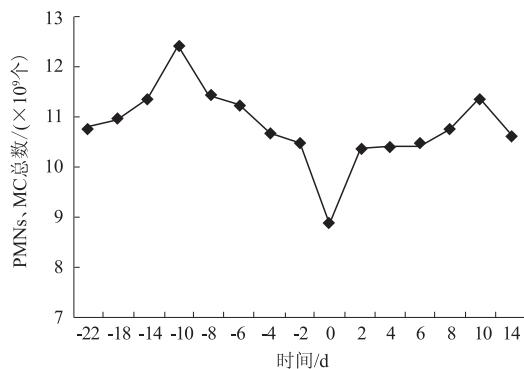


图 1 围产期蒙古牛外周血中 PMNs 和 MC 总数

2.2.2 淋巴细胞总数 由图 2 可知, 蒙古牛分娩前 8~0 d 淋巴细胞总数逐渐下降, 0 d 降至最低, 分娩后 2 d 明显升高, 分娩前 22~8 d、分娩后 2~14 d 变化不明显。这说明随着分娩临近, 淋巴细胞免疫抑制作用显著减弱, 0 d 达到最低, 产后淋巴细胞数量逐渐增多, 机体免疫作用增强。

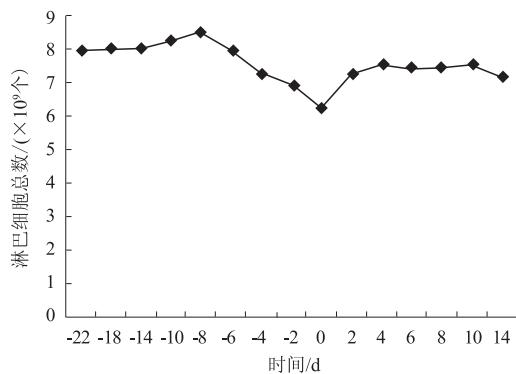


图 2 围产期蒙古牛外周血中淋巴细胞总数

2.2.3 E2 质量浓度 由图 3 可知, 蒙古牛分娩前 22~2 d E2 质量浓度明显升高, 并在分娩前 2 d 达到峰值, 分娩前 2~0 d 明显下降, 分娩后 2~14 d 变化趋势相对平缓。这表明随着分娩逐渐临近, E2 活性明显升高, 而分娩时活性明显下降, 分娩后 2 d 活性降至基础水平, 之后无明显变化。

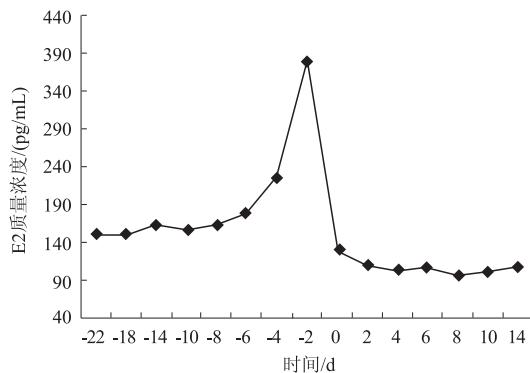


图 3 围产期蒙古牛外周血清中 E2 质量浓度

2.2.4 P4 质量浓度 由图 4 可知, 蒙古牛分娩前 22 d 至分娩后 2 d P4 质量浓度逐渐下降, 分娩后 2~14 d 无明显变化。这表明, 随着分娩临近, P4 活性逐渐下降, 分娩当天活性降低最明显, 分娩后 2 d 达到正常生理活性, 之后无明显变化。

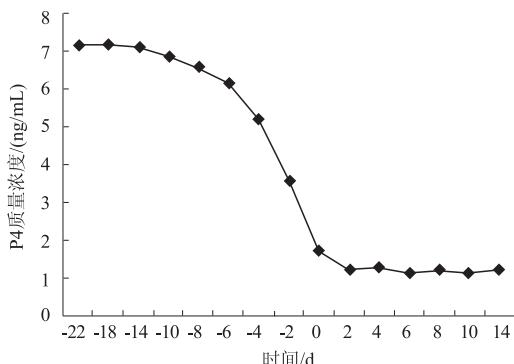


图 4 围产期蒙古牛外周血清中 P4 质量浓度

2.2.5 GC 质量浓度 由图 5 可知, 蒙古牛分娩前 8~0 d GC 质量浓度逐渐升高, 0 d 达到峰值, 分娩后 0~2 d 迅速下降, 分娩后 2 d 之后无明显变化。这表明随着分娩临近, GC 活性逐渐升高, 分娩当天活性最强, 分娩后 2 d 降低至正常生理水平, 之后变化不明显。

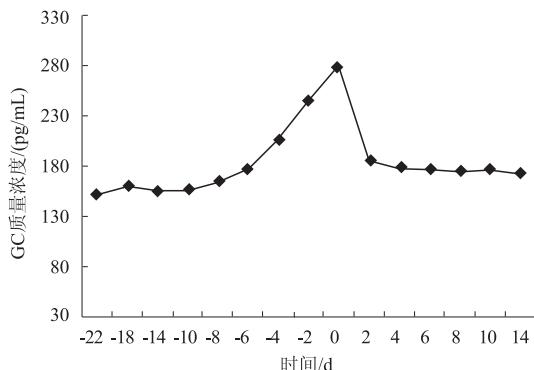


图 5 围产期蒙古牛外周血清中 GC 质量浓度

2.3 PMNs 调亡相关基因 mRNA 表达水平

2.3.1 Bax 基因 由图 6 可知, 蒙古牛分娩前 22~

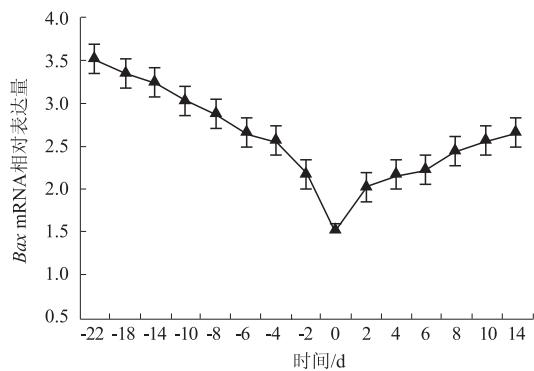


图 6 Bax 基因相对表达量

0 d *Bax* 基因 mRNA 表达量逐渐下降, 分娩当天降至最低, 分娩后 0~14 d 逐渐升高。这表明随着分娩临近, *Bax* 基因表达抑制作用显著增强, 分娩当天最明显, 产后表达量逐渐升高。

2.3.2 *Bcl-2* 基因 由图 7 可知, 蒙古牛分娩前 22~0 d *Bcl-2* mRNA 表达量逐渐上升, 分娩当天升至最高, 分娩后 0~14 d 逐渐降低。这表明, 随着分娩的临近, *Bcl-2* 基因表达抑制作用逐渐减弱, 分娩当天作用最明显, 分娩后抑制作用逐渐增强, 表达量逐渐下降。

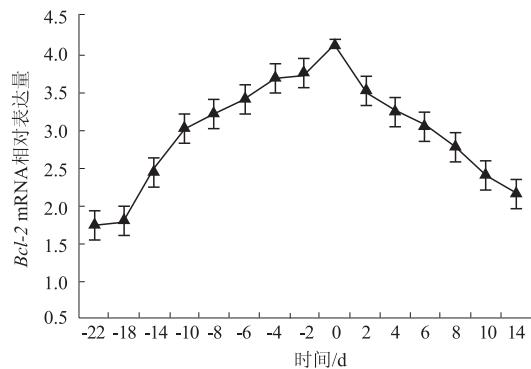


图 7 *Bcl-2* 基因相对表达量

2.3.3 *P53* 基因 *P53* mRNA 表达量总体的变化趋势如图 8, 蒙古牛分娩前 22~0 d *P53* mRNA 表达量逐渐下降, 分娩当天降至最低, 分娩后 0~14 d 逐渐升高。其中, 分娩后 0~8 d *P53* mRNA 表达量逐渐升高, 8~14 d 升高趋势相对平缓, 无明显差异; 与分娩后 8、10、14 d 相比, 分娩前 22、18、14、10 d *P53* 表达量较高, 即产前表达量明显高于产后。这说明随着分娩临近, *P53* 基因表达抑制作用逐渐增强, 分娩时最明显, 产后抑制作用逐渐消除, 表达量逐渐升高。

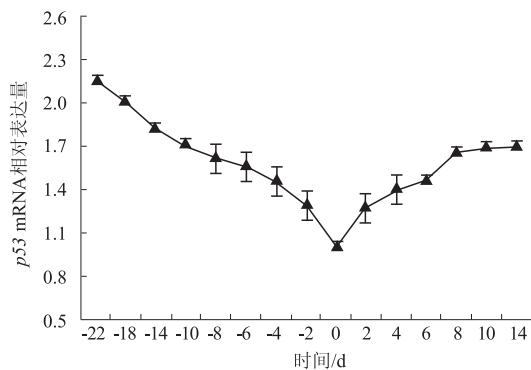


图 8 *P53* 基因相对表达量

2.3.4 *Cyt-c* 基因 由图 9 可知, 蒙古牛分娩前 22~0 d *Cyt-c* mRNA 表达量逐渐下降, 并呈现一定的时间依赖性, 分娩当天降至最低, 分娩后 0~14 d 逐渐升高。这表明随着分娩临近, *Cyt-c* 基因表达

抑制作用明显增强, 分娩当天最明显, 分娩后表达抑制作用逐渐解除, 表达量逐渐升高。

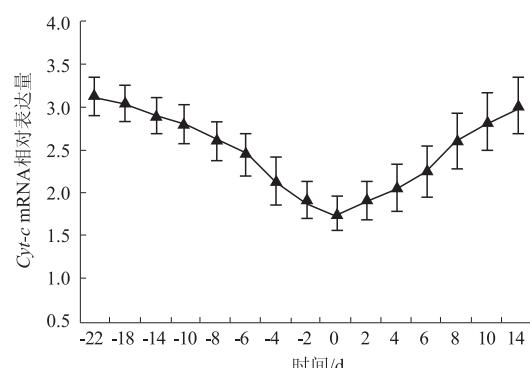
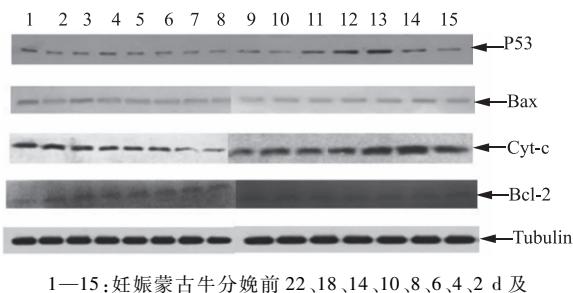


图 9 *Cyt-c* 基因相对表达量

2.4 PMNs 淋巴相关蛋白的表达水平

PMNs 淋巴相关蛋白 P53、*Bax*、*Cyt-c*、*Bcl-2* 的相对表达量及变化趋势如图 10。对目的条带进行灰度分析, 结果如图 11—14。由图 10 和 11 可知, *Bax* 蛋白表达趋势与 *Bax* mRNA 基本一致。分娩前 *Bax* 蛋白表达量呈现下降趋势, 分娩后明显升高。这表明随着分娩的临近, 机体启动分娩过程, 明显抑制了 *Bax* 蛋白的表达, 分娩当天抑制作用最明显, 分娩后随着抑制作用的解除表达量逐渐升高。



1—15:妊娠蒙古牛分娩前 22、18、14、10、8、6、4、2 d 及 分娩当天及产后 2、4、6、8、10、14 d

图 10 PMNs 淋巴相关蛋白的 Western blot 检测结果

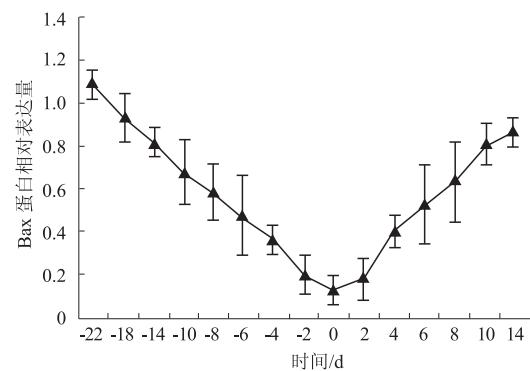


图 11 *Bax* 蛋白相对表达量

由图 10 和 12 可知, *Bcl-2* 蛋白表达变化趋势与 *Bcl-2* mRNA 基本一致。分娩前 *Bcl-2* 蛋白表达量明显上升, 分娩后呈现下降趋势。这说明随着分娩临

近, *Bcl - 2* 蛋白表达抑制作用逐渐解除, 分娩当天最明显, 分娩后抑制作用逐渐增强, 表达量下降。

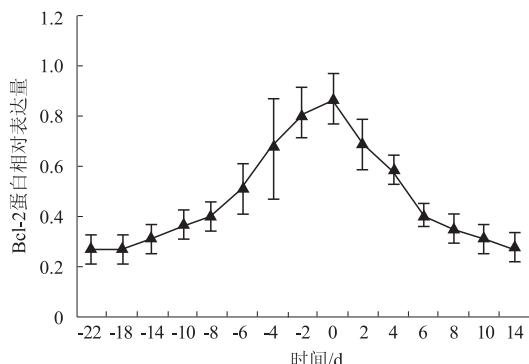


图 12 *Bcl - 2* 蛋白相对表达量

由图 10 和 13 可知, *Cyt - c* 蛋白表达变化趋势与 *Cyt - c* mRNA 基本一致。分娩前 6 ~ 0 d *Cyt - c* 蛋白表达量较分娩前 22 ~ 6 d 明显下降, 分娩后 0 ~ 6 d 较 6 ~ 14 d 明显上升。这表明随着分娩临近, *Cyt - c* 蛋白表达抑制作用逐渐增强, 分娩当天最明显, 产后随着抑制作用的逐渐解除, 表达量逐渐升高。

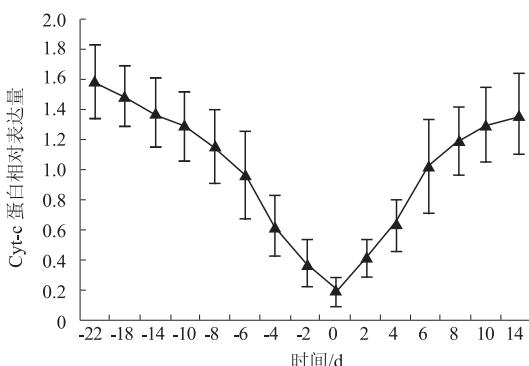


图 13 *Cyt - c* 蛋白相对表达量

由图 10 和 14 可知, *P53* 蛋白表达变化趋势与 *P53* mRNA 基本一致。分娩前 *P53* 蛋白表达量呈下调趋势, 分娩后表达抑制作用解除, 表达量逐渐升高。

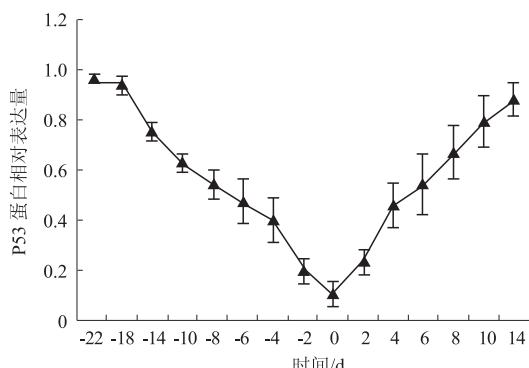


图 14 *P53* 蛋白相对表达量

3 结论与讨论

围产期是牛繁殖障碍性疾病的高发期, 其免疫抑制主要表现为外周血免疫细胞分布、数量及功能的改变, 尤其是 PMNs 的显著增加及其功能性基因表达的上调或下调, 从而诱发多种疾病^[8]。外周血中 PMNs 的生命周期一般为 6 ~ 8 h, 随即发生细胞凋亡或迁移至组织、器官参与炎性反应, 但是当到达炎症部位参与炎症反应时, PMNs 的生命周期将延长 2 ~ 4 倍^[9]。因此, 认为外周血 PMNs 的分布和功能变化与细胞凋亡密切相关, 即促进细胞凋亡利于维持免疫系统稳定, 反之抑制细胞凋亡可致免疫抑制^[11]。*Bax*、*P53*、*Cyt - c* 等促细胞凋亡基因以及 *Bcl - 2* 等抗细胞凋亡基因是参与细胞凋亡调控的两大类主要基因。本试验结果表明, 围产期蒙古牛外周 PMNs 的 *Bcl - 2* mRNA 和蛋白表达量均以分娩当天为拐点先升后降, 分娩前 22 d 和分娩后 14 d 明显低于 0 d; *Bax*、*P53* 和 *Cyt - c* mRNA 和蛋白表达趋势与 *Bcl - 2* 相反。表明整个围产期外周 PMNs 免疫活性经历了以分娩为节点的抑制加剧与减缓过程。

此外, 大量试验证实了围产期免疫抑制、细胞功能与外周血主要类固醇激素 P4、E2 和 GC 质量浓度的变化密切相关^[10-12]。本研究结果表明, 外周血血清 E2 质量浓度于分娩前 22 d 逐渐升高, 分娩前 2 d 升至最高; P4 质量浓度于分娩前 22 d 开始逐渐下降, 分娩当天迅速下降; GC 质量浓度于分娩前 22 d 逐渐升高, 分娩当天升至最高。GC 刺激 T 细胞和 B 细胞的增殖、抑制相关因子的产生^[11], 使产后牛外周 PMNs 的氧化状态发生改变; E2 通过 *Bcl - 2* 家族成员诱发外周淋巴细胞凋亡、促进巨噬细胞炎性介导因子和细胞因子的产生; 而 P4 能够直接抑制 T 淋巴细胞促炎性因子的产生^[6,12-14]。同时, E2、P4 和 GC 依赖其特异性受体双向调节 PMNs 活性, 即低浓度时增强细胞活性而高浓度则抑制细胞活性。外周血 PMNs 和 MC 总数从分娩前 22 d 开始逐渐增多, 分娩前 10 d 达最大值, 而淋巴细胞数量在此期间并未出现明显变化, 这可能提示了 PMNs 的增多明显抑制了淋巴细胞的增殖分化, 致使机体出现免疫抑制, 导致免疫应答反应相关分子表达发生明显变化。同时, 围产期类固醇激素及激素间相互作用, 共同调控凋亡相关基因的表达, 例如 P4 可抑制 *Bax* 表达, 上调 *Bcl - 2* 表达; GC 降低 *Bax* mRNA 丰度^[10]。本试验中促/抗细胞凋亡基因 *Bax/Bcl - 2* 下调/上调趋势与类固醇激素质量浓度变化趋势基

本一致。

本试验探究了类固醇激素水平和凋亡因子表达的动态变化特征,以及PMNs凋亡相关基因表达调控之间的关系,对临床应用及科学的研究具有一定的指导意义。需要指出的,为了进一步阐明围产蒙古牛外周类固醇激素-受体表达与PMNs动态变化及相关分子表达的关系,本课题组正在开展PMNs类固醇激素核/膜受体及CD11b等信号分子表达研究,找到直接证据以支持本研究结果,也为阐明围产牛机体免疫状态及相关分子表达信号通路提供依据。

参考文献:

- [1] Filep J G, E Kebir D. Neutrophil apoptosis: A target for enhancing the resolution of inflammation [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2009, 108(5):1039-1046.
- [2] Wang J, Huo Y, Yin L, et al. Doxycycline protects thymic epithelial cells from mitomycin C-mediated apoptosis *in vitro* via Trx2-NF- κ B-Bcl-2/Bax axis [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(2):449-460.
- [3] Madsen-Bouterse S A, Rosa J, Burton J L. Glucocorticoid modulation of Bcl-2 family members A1 and bak during delayed spontaneous apoptosis of bovine blood neutrophils [J]. Endocrinology, 2006, 147(8):3826-3834.
- [4] Croker B A, O'Donnell J A, Nowell C J, et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(32):13135-13140.
- [5] Molloy E J, O'Neill A J, Grantham J J, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone [J]. Blood, 2003, 102(7):2653-2659.
- [6] Bhatnagar N, Hong H S, Krishnaswamy J K, et al. Cyto-
kine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity [J]. Blood, 2010, 116(8):1308-1316.
- [7] Stillie R M, Farooq S M, Gordon, et al. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2009, 86(3):529-543.
- [8] Sordillo L M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility [J]. Livestock Production Science, 2005, 98(1):89-99.
- [9] Lacetera N, Bernabucci U, Scalia D, et al. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from brown swiss and holstein cows [J]. J Dairy Sci, 2006, 89(12):4606-4612.
- [10] Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation [J]. Dairy Sci, 2002, 85(12):3268-3276.
- [11] Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, et al. Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period [J]. Theriogenology, 2006, 65(6):1082-1098.
- [12] Li K W, Turner S M, Emson C L, et al. Deuterium and neutrophil kinetics [J]. Blood, 2011, 117(22):6052-6053.
- [13] Sander A K, Piechotta M, Schlamberger G, et al. Ex vivo phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period [J]. J Dairy Sci, 2011, 94(4):1762-1771.
- [14] Gavathiotis E, Reyna D E, Davis M L, et al. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX [J]. Mol Cell, 2010, 40(3):481-492.