



热应激对小鼠器官指数、小肠损伤及胃 HSP70 mRNA 表达的影响

王超, 赵传超, 施忠秋, 廖睿, 周颖, 齐智利

(华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070)

【摘要】 目的 探讨热应激对小鼠器官指数、小肠形态、胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量及糖代谢相关激素的影响。方法 采用单因子实验设计, 将年龄和体重相近的 18 只 KM 小鼠随机分为对照组和热应激组, 分别测定心、肝、脾、肺、肾重量, 小鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量、血浆中胰岛素和胰高血糖素浓度以及十二指肠和空肠的绒毛高度、隐窝深度, 并对肝脏、十二指肠和空肠进行病理组织学检查。结果与结论 热应激对小鼠器官指数无影响, 可显著提高小鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量, 降低血浆中胰岛素的含量, 并造成小鼠肝脏、十二指肠和空肠严重损伤。

【关键词】 热应激; 小鼠; 器官指数; 小肠; 激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0063-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.014

Effect of heat stress on the organ indices, small intestine damages and expression of HSP70 mRNA in the gastric mucosa of mice

WANG Chao, ZHAO Chuan-chao, SHI Zhong-qiu, LIAO Rui, ZHOU Ying, QI Zhi-li

(College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of heat stress on organ indices, intestinal morphology, gastric mucosal HSP70 mRNA expression and glucose metabolic hormones in mice. **Methods** A single-factor experiment was designed for the present research. Eighteen KM mice of the similar age and weight were randomly divided into control group and heat stress group. The weight of the heart, liver, spleen, lung and kidney, as well as the expression of HSP70 mRNA in the mouse gastric mucosa were measured. The plasma concentration of insulin and glucagon, the villus height and crypt depth of the duodenum and jejunum were detected. The histological changes of the liver, duodenum and jejunum were also examined. **Results** There was no effect of heat stress on the organ indices. It significantly increased the expression of HSP70 mRNA in the gastric mucosa, reduced the plasma insulin level and caused serious injury to the liver, duodenum and jejunum in the mice. **Conclusions** Heat stress does not significantly affect the organ indices in mice, but can significantly increase the expression of HSP70 mRNA in the gastric mucosa, cause apparent damages in the liver, duodenum and jejunum, reduce the villus height, crypt depth and villus height/crypt depth ratio of the duodenum and jejunum, and also decrease the blood insulin concentration in the mice.

【Key words】 Heat stress; Mice; Organ index; Small intestine; HSP70; Hormone

随着全球变暖,温室效应加剧,热应激对高度集约化养殖模式下的畜禽以及养殖者的经济效益的影响显现,引发热应激方面的研究日益增多。

监测应激畜禽各器官的变化有利于判断机体机能是否正常,而热应激蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 家族蛋白是细胞处于应激时迅速合成的

【基金项目】 湖北省公益性科技研究项目(项目批准号:2012DBA23);动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室开放课题(项目批准号:53532022603);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(项目批准号:2013QC003);湖北省自然科学基金创新团队“猪的营养调控与饲料安全”(项目批准号:2013CFA010)。

【作者简介】 王超(1990-),男,硕士研究生,从事反刍动物营养与饲料科学研究。E-mail: wanghzauedu@163.com

【通讯作者】 齐智利,副教授,硕士生导师, E-mail: zhiliqi@mail.hzau.edu.cn

一类高度保守的蛋白^[1,2],一定范围内, HSP70 在细胞内含量越高,细胞的热耐力越强^[3]。小肠是畜禽营养物质消化吸收的主要场所,小肠黏膜结构的稳定是保证营养物质正常吸收和机体正常生长的前提。本实验通过研究小鼠热应激和非热应激条件下其器官指数,胃黏膜 HSP70 mRNA 表达,肝脏、十二指肠和空肠形态以及血浆中胰岛素、胰高血糖素含量,研究动物主要器官对热应激的敏感度,为实际生产中动物怎样避免热应激损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

42 日龄左右的 SPF 级 KM 小鼠 18 只,平均体重(24.23 ± 3.63)g,亲代购自湖北省实验动物研究中心【SCXK(鄂)2008-0005】,自繁后代。实验采用单因子实验设计,将小鼠随机分为两种方法处理,每个处理设 3 个重复,每个重复 3 只。1 组为对照组,在温度 15~25℃、相对湿度 30% 左右条件下正常生长;2 组为实验组,实验期间 2 组小鼠每天中午 12:00~13:00 置于(39 ± 1)℃ 的热处理箱中,其余时间的饲养管理和对照组一致。实验场地位于华中农业大学动物科技学院动物房【SYXK(鄂)2010-0029】,小鼠自由采食、饮水。适应期 3 d,预试期 3 d,正试期 10 d。

1.2 样品的采集和制备

正试期第 9 天 20:00 给所有小鼠禁食不禁水。次日热处理完后全部小鼠眼球采血,放入 2 mL 抗凝管中,安乐死,剖检出心、肝、脾、肺、肾,每个处理中选择体重相近的小鼠各 3 只,采集鼠胃,切开并用 0.9% 的生理盐水冲洗,在胃下部同一区域切一小块置于 2 mL 冻存管中,做好标记,迅速放入液氮罐中待用。取出每只小鼠肝脏同一位置一段、十二指肠和空肠中段一部分,用 0.9% 的生理盐水冲洗干净,放入标记好的

表 1 引物信息

Tab.1 Information of the primers

引物名称 primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	片段长度/bp Length of fragments	退火温度/℃ Annealing temperature
M-hsp70-S	CGTGTGCGGATCATCAACGAG	271	58
M-hsp70-A	GCGCTTGTCTGGCTGATGTCC		
M-GAPDH-S	TGAAGGTTGGAGCCAAAAG	227	58
M-GAPDH-A	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT		

表 2 热应激对小鼠器官指数的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Effect of heat stress on organ indices in the mice

组别 Groups	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	肺脏 Lung
对照组 Control	0.60 ± 0.11	4.34 ± 0.43	0.41 ± 0.10	1.14 ± 0.16	0.69 ± 0.11
热应激组 Heat stress	0.60 ± 0.10	4.36 ± 0.27	0.35 ± 0.07	1.11 ± 0.12	0.73 ± 0.06

含有 4% 多聚甲醛的 5 mL 离心管中固定,备用。

1.3 测定的指标和方法

1.3.1 器官指数、肝脏形态、胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量的测定

器官指数(%) = 器官鲜重(g)/宰前空腹活重(g) × 100%。用 HE 染色法对肝脏形态进行观察。目的基因 HSP70 和内参基因 GAPDH 的引物由 Primer 5.0 软件设计(如表 1),由 Invitrogen Biotechnology Co., LTD 公司(中国)合成,采用 Trizol 法提取总 RNA,反转录出对应的 cDNA,通过荧光定量 PCR 得到溶解曲线和扩增曲线,获得 Ct 值,换算出 mRNA 的拷贝数,对 HSP70 mRNA 表达情况进行判断。

1.3.2 小肠黏膜的组织结构的测定

十二指肠和空肠切片制作,HE 染色,观察图形。并在显微镜下选出 5 个最长绒毛的长度、最深隐窝的深度。切片用 Olympus 摄影显微镜拍照保存,采用影像分析软件 Image-Pro Plus 5.02 (Media Cybernetics 公司,美国)进行数据收集。

1.3.3 血液指标的测定

购买 Bender MedSystems 公司(奥地利)的 ELISA 试剂盒测定小鼠血液中胰岛素和胰高血糖素的含量。

1.3.4 数据统计和方法

所有数据都应用 SAS 8.0 软件进行统计分析,采用单因素 Duncans 多重比较进行显著性分析。实验结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。

2 结果

2.1 热应激对小鼠主要器官的影响

2.1.1 热应激对小鼠器官指数的影响

见表 2,热应激组和对照组比较,小鼠器官指数变化不明显,差异无显著性($P > 0.05$)。

表 3 两种处理对小鼠十二指肠和空肠形态的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of different treatments on the mouse duodenal and jejunal morphology

组别 Groups	绒毛高度/ μm Villus height	隐窝深度/ μm Crypt depth	绒毛高度/ 隐窝深度 /V/C Villus height/ Crypt depth ratio
十二指肠 Duodenum			
对照组 Control group	365.12 \pm 62.47	106.48 \pm 10.64	3.43 \pm 0.48
热应激组 Heat stress group	281.36 \pm 61.28 **	91.65 \pm 6.94 **	3.04 \pm 0.46
空肠 Jejunum			
对照组 Control group	366.85 \pm 47.90	87.97 \pm 6.40	4.18 \pm 0.50
热应激组 (The heat stress group)	295.63 \pm 49.63 **	82.67 \pm 9.58	3.58 \pm 0.43 *

注:与对照组相比,同一列中肩标为*表示差异有显著性($P < 0.05$),肩标为**表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note. Compared with the normal control group, * means significant difference ($P < 0.05$), ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.1.2 热应激对小鼠肝脏形态的影响

从图 1(彩插 10)中可以看出,对照组小鼠的肝脏组织结构完整,热处理组的肝脏形态异常,受损严重,细胞出现分散甚至坏死,有出血、溶血现象。

2.1.3 热应激对小鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量的影响

胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量:对照组为(1.04 \pm 0.17),热应激组为(1.64 \pm 0.21),热应激组显著($P < 0.05$)高于对照组。

2.2 热应激对小鼠小肠黏膜的影响

2.2.1 热应激对小鼠十二指肠和空肠的绒毛高度、隐窝深度以及绒毛高度/隐窝深度比值的影响

热应激小鼠十二指肠绒毛高度和隐窝深度与对照组的相比都极显著降低($P < 0.01$),绒毛高度和隐窝深度的比值与对照组的相比差异无显著性($P > 0.05$);空肠的绒毛高度与对照组的相比极显著降低($P < 0.01$),绒毛高度和隐窝深度的比值与对照组的相比显著降低($P < 0.05$),隐窝深度与对照组的相比差异无显著性($P > 0.05$)。见表 3。

2.2.2 热应激对小鼠十二指肠和空肠形态的影响

由图 2 可知,无论是十二指肠还是空肠,热应激后黏膜结构都受到一定程度的损伤,自身结构不完整,部分肠绒毛脱落、缩短,绒毛之间排列散乱,界限模糊,部分肠绒毛的顶端有开裂,暴露出固有层组织(图 2 中 B、D)。对照组小鼠的十二指肠和空肠肠黏膜结构完整,没有绒毛脱落现象,肠绒毛之间排列整齐,清晰可见(图 2 中 A、C)(图 2 见彩插 10)。

2.3 热应激对小鼠糖代谢相关激素的影响

热应激对小鼠血液中胰岛素影响显著,热应激组小鼠血液中胰岛素含量显著下降($P < 0.05$),而二者胰高血糖素浓度差异无显著性($P > 0.05$)。

表 4 热应激对小鼠血液中胰岛素和胰高血糖素含量的影响($\bar{x} \pm s$, mIU/L)

Tab. 4 Effect of heat stress on the blood insulin and glucagon in the mice

组别 Groups	胰岛素 Insulin	胰高血糖素 Glucagon
对照组 Control group	62.53 \pm 8.53	64.91 \pm 15.12
热应激组 Heat stress group	49.17 \pm 7.58 *	52.81 \pm 16.43

3 讨论

3.1 热应激对小鼠主要器官的影响

3.1.1 热应激对小鼠器官指数的影响

一定程度上,内脏器官的重量和指数可反映动物机体的机能状况,对于生产实践和理论研究有着十分重要的意义^[4]。本实验得出的结果是热应激对小鼠器官指数的影响不显著($P > 0.05$),但可看出脾脏指数有降低的趋势,候殿东等^[5]研究发现热应激(42℃)组小鼠的脾脏指数均比对照组显著降低,而本研究出现差异不显著的原因可能和热处理时间及周期的长短相关,有待进一步研究。

3.1.2 热应激对小鼠肝脏形态的影响

肝脏既是动物机体新陈代谢的重要器官,也是消化系统中重要的消化腺,肝细胞核的状态能够说明肝组织是否受到较严重的影响。本实验结果发现,热处理后小鼠肝脏形态异常,肝细胞受损严重,宁章勇等^[6]也研究发现热应激可导致鸡的肝细胞血管、肝血窦产生不良现象,并出现水泡变性。表明热应激能对动物肝脏造成损伤,从而影响营养物质正常消化吸收。

3.1.3 热应激对小鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 表达量的影响

HSP70 是加强胃黏膜防御功能的主要 HSP^[7]。Nakamura 等^[8]研究发现胃黏膜细胞应激条件下产生的 HSP 可以抵抗 7.5% 乙醇引发的细胞坏死及表层脱落。而且大鼠胃内产生的 HSP 量和其黏膜保护是呈现正相关的^[9]。然而 HSP70 对细胞的保护作用只能在一定的范围内起作用,如果给予超过一定强度的应激或者应激持续的时间太长,机体仍会受到严重损伤。王枫等^[3]发现,45℃ 下暴露超过 6

h 以上的细胞,不管是 HSP70 表达量高还是低,细胞活力都会降低。这是因为应激时间过长,阻碍细胞正常合成蛋白质,并致使蛋白质变性,当 HSP70 的保护能力无法消除变性蛋白引发的危害时就会影响细胞的功能,使细胞无法正常生存,进而发生死亡。本实验结果显示,小鼠在 $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的环境下应激 1 h,其胃黏膜 HSP70 mRNA 的表达量显著高于对照组,说明热应激下胃黏膜通过 HSP70 的增加来提高耐受能力,以便渡过高温期。

3.2 热应激对小鼠小肠黏膜的影响

动物机体对营养物质消化和吸收的主要部位是肠黏膜。热应激会导致营养物质消化及吸收率降低,影响畜禽的生长^[10]。鲍恩东等^[11]研究发现,动物在高温应激下,机体内的肠道黏膜屏障会受到损伤,影响机体对营养物质的正常消化吸收。因此,可将肠黏膜的损伤程度作为评价热应激的重要指标。肠绒毛高度可反映肠道对于营养物质的吸收能力,隐窝深度可反映绒毛细胞的生成率,而绒毛高度/隐窝深度的比值则是对小肠功能的一种综合评价,比值下降说明黏膜上皮发育不良或者受到损伤,对养分的消化吸收能力降低,影响机体健康^[12]。吴锦华等^[13]研究结果表明,母鼠产前热应激使仔鼠的小肠黏膜组织结构发生了显著变化,抑制了仔鼠小肠的消化、吸收能力及免疫力。胡艳欣等^[12]在对热应激猪肠道结构和功能的研究中发现,热应激后猪肠黏膜结构严重损伤;每段肠的绒毛长度、绒毛宽度、隐窝深度及绒毛长度/隐窝深度的比值都出现降低,其中降低比较显著的是回肠的绒毛长度。本次实验结果表明热应激致使小鼠十二指肠和空肠严重损伤,影响了小鼠的正常生长,尤其十二指肠的最为明显。说明热应激可以通过损害肠黏膜来影响动物对营养物质的消化吸收,进而影响机体健康。

3.3 热应激对小鼠糖代谢相关激素的影响

胰岛素对动物机体内部的平衡起着重要的作用,是体内唯一降低血糖的激素,还可促使糖原、脂肪和蛋白质的合成;胰高血糖素则是促进分解代谢的激素,既可促使肝糖原分解和糖异生,使血糖升高,也可促使脂肪的分解。本实验结果表明热应激组小鼠血浆胰岛素和胰高血糖素含量均低于对照组,说明热应激对小鼠的糖代谢具有一定的抑制作用。不过,胰岛素的降低,也会降低对转录因子 FoxO1 的磷酸化程度,而 FoxO1 又会促进肝脏的糖异生^[14,15],而胰岛素未回升的原因可能和肝脏受到损伤有关。因此,热应激对糖代谢影响机理究竟如何,有待深入研究。

热应激对小鼠器官指数影响不显著,可显著提高小鼠胃黏膜 HSP70 mRNA 的表达量。并导致小鼠肝脏、十二指肠和空肠结构明显损伤及十二指肠和空肠的绒毛高度、十二指肠的隐窝深度极显著下降,空肠的绒毛高度/隐窝深度的比值显著下降。还可显著降低小鼠血液胰岛素的含量。

(本文图 1,2 见彩插 10。)

参 考 文 献

- [1] 张霞,屈平平,丛霞,等. 热应激对小鼠胚胎细胞 HSP70 表达和超微结构的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1463-1469.
- [2] Buchmeier NA, Heffron F. Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages [J]. Science, 1990, 248(4956):730-732.
- [3] 王枫,高俊生. HSP70 高表达对 K562 细胞热耐力的影响 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16(7):587-588.
- [4] 许贵善,刁其玉,纪守坤,等. 不同饲喂水平对肉用绵羊生长性能、屠宰性能及器官指数的影响 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(5):953-960.
- [5] 侯殿东,赵宝霞,刘辉. 应激致免疫功能降低动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(5):330-332.
- [6] 宁章勇,刘思当,赵德明,等. 热应激肉仔鸡胸腺、法氏囊超微组织学观察和细胞凋亡检测 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3):310-313.
- [7] 蓝程,孙晓宁,董丽伟,等. 热休克蛋白 70 对肝硬化门静脉高压性胃病大鼠胃黏膜损伤的保护作用 [J]. 胃肠病学, 2010, 15(8):467-470.
- [8] Nakamura K, Rokutan K, Marui N, et al. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells [J]. Gastroenterology, 1991, 101(1):161-166.
- [9] Itoh YH, Noguchi R. Pre-treatment with mild whole-body heating prevents gastric ulcer induced by restraint and water-immersion stress in rats [J]. Int J Hyperthermia, 2000, 16(2):183-191.
- [10] Garriga C, Hunter RR, Amat C, et al. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum [J]. Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol, 2006, 290(1):R195-R201.
- [11] 鲍恩东,龚远英,付旭彬,等. 肉鸡热应激病理损伤与热应激蛋白(HSP70)相关性研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(2):301-305.
- [12] 胡艳欣,肖冲,余锐萍,等. 热应激对猪肠道结构及功能的影响 [J]. 科学技术与工程, 2009(3):581-586.
- [13] 吴锦华,胡茂颖,陈忠,等. 产前热应激对仔鼠小肠黏膜组织结构发育的影响 [C]. 2011 年环境污染与大众健康学术会议, 2011, 75-80.
- [14] 陈小玲,黄志清,毛湘冰,等. FoxO1 的功能研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(9):90-93.
- [15] Rena G, Woods YL, Prescott AR, et al. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion [J]. EMBO J, 2002, 21(9):2263-2271.

[收稿日期] 2014-03-22