

亚精胺对 LPS 诱导子宫炎症损伤的保护作用研究

刘达一

延边大学

DOI:10.32629/as.v9i5.3947

[摘要] 牛子宫内膜炎为产后高发生殖系统疾病,主要由革兰氏阴性菌及其脂多糖(LPS)诱发,可显著降低奶牛繁殖效率与产奶性能,造成严重经济损失。临床以抗生素为主的治疗方案易引发细菌耐药性、药物残留及生殖道微生态失衡,亟需安全高效的天然替代药物。亚精胺是广泛存在于生物体内的天然多胺类小分子,具备抗氧化、诱导自噬、抑制炎症等多重生物学功能。本研究以RAW264.7小鼠巨噬细胞与牛子宫上皮细胞为体外模型,结合单细胞培养与Transwell共培养体系模拟子宫局部微环境,探究亚精胺对LPS诱导子宫炎症损伤的保护效应及分子机制。结果显示,亚精胺可显著抑制LPS诱导的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子释放,降低NF- κ B通路关键蛋白I κ B α 降解与p65磷酸化及核转位水平,减少活性氧(ROS)过量生成并缓解细胞凋亡;同时上调自噬相关蛋白LC3-II与Beclin-1表达,改善子宫上皮屏障紧密连接蛋白ZO-1表达与跨上皮电阻,减轻巨噬细胞对上皮细胞的炎症旁损伤。本研究首次阐明亚精胺在子宫巨噬细胞-上皮细胞互作中的抗炎机制,为亚精胺开发为防治奶牛子宫内膜炎的天然候选药物提供实验依据与理论支撑。

[关键词] 亚精胺; LPS; 子宫炎症损伤; 保护作用

中图分类号: R364.5 **文献标识码:** A

Study on the Protective Effect of Spermidine Against LPS-Induced Uterine Inflammatory Damage

Dayi Liu

Yanbian University, Yanji City

[Abstract] Cattle endometritis is a highly prevalent reproductive system disease postpartum, primarily induced by Gram-negative bacteria and their lipopolysaccharide (LPS), which significantly reduces reproductive efficiency and milk production in dairy cows, causing substantial economic losses. Clinical treatment regimens dominated by antibiotics are prone to inducing bacterial resistance, drug residues, and disruption of the reproductive tract microbiota balance, necessitating safe and efficient natural alternative therapies. Spermidine, a naturally occurring small-molecule polyamine widely present in organisms, exhibits multiple biological functions including antioxidant activity, autophagy induction, and anti-inflammatory effects. This study employed RAW264.7 mouse macrophages and bovine uterine epithelial cells as an in vitro model, combined with single-cell culture and Transwell co-culture systems to simulate the local uterine microenvironment, to investigate the protective effects and molecular mechanisms of spermidine against LPS-induced uterine inflammatory damage. Results demonstrated that spermidine significantly inhibited the release of pro-inflammatory factors such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β induced by LPS, reduced the degradation of key NF- κ B pathway proteins (e.g., I κ B α) and the phosphorylation/p65 nuclear translocation levels, decreased excessive reactive oxygen species (ROS) generation, and alleviated apoptosis. Additionally, it upregulated the expression of autophagy-related proteins LC3-II and Beclin-1, improved the expression of uterine epithelial barrier tight junction proteins (e.g., ZO-1) and transepithelial resistance, and mitigated inflammatory injury to epithelial cells by macrophages. This study elucidates for the first time the anti-inflammatory mechanism of spermidine in the uterine macrophage-epithelial cell interaction, providing experimental evidence and theoretical support for developing spermidine as a natural candidate drug for the prevention and treatment of endometritis in dairy cows.

[Key words] spermidine; LPS; uterine inflammatory injury; protective effect

引言

牛子宫内膜炎是产犊后奶牛高发的生殖道炎症性疾病,大肠杆菌等革兰氏阴性菌感染为主要病因,其细胞壁成分LPS是触发子宫炎症反应的核心致病因子。LPS可通过靶细胞表面TLR4受体激活NF- κ B、MAPK等信号通路,引发大量促炎因子释放与氧化应激反应,导致子宫内膜结构破坏、屏障功能受损、胚胎着床受阻,临床可见发情紊乱、受胎率下降、空怀期延长,重症可造成高产奶牛提前淘汰,给奶牛养殖业带来巨大经济损失^[1-2]。

目前临床主要采用抗生素进行治疗,但是长期使用容易造成细菌耐药、畜产品药物残留和生殖道菌群失衡,给公共卫生安全和畜牧业的可持续发展带来威胁。所以,挖掘安全、无残留、来源广泛的新天然活性物质,并研制成具有抗炎作用的抗生素替代品,是目前奶牛生殖疾病防治的一大趋势。

亚精胺是机体中普遍存在的小分子天然多胺,参与调控细胞增殖、自噬激活、氧化平衡等各种生命过程。有研究显示,亚精胺对于多系统炎症模型来说,可以抑制NF- κ B通路的过度激活,减少促炎因子的释放,加强损伤清除的能力^[3]。但是亚精胺对于子宫炎症的调节作用以及分子机制还不清楚,在子宫局部巨噬细胞和上皮细胞之间相互作用的功能也没有报道。

本文以LPS诱导的体外子宫炎症模型为研究对象,从单细胞和细胞共培养的角度出发,对亚精胺的抗炎、抗氧化、抗凋亡、屏障保护作用进行系统的评价,并阐明亚精胺通过抑制NF- κ B通路、激活自噬、调节细胞间对话来缓解子宫炎症损伤的分子机制,为亚精胺在奶牛子宫内膜炎防控中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1实验细胞。小鼠RAW264.7巨噬细胞株购自中国科学院细胞库;牛子宫上皮细胞由本实验室分离、纯化并永生化保存,经细胞角蛋白18免疫荧光鉴定,细胞纯度>95%,符合实验要求。

1.2主要试剂与仪器。实验所用试剂、试剂盒均为细胞生物学级,主要仪器包括细胞培养箱、蛋白电泳转膜系统、荧光定量PCR仪、流式细胞仪、激光共聚焦显微镜等。细胞置于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,蛋白免疫印迹、荧光定量PCR、流式细胞术等检测均严格按照试剂说明书与标准化操作规程完成。

1.3细胞培养。RAW264.7细胞采用含10%胎牛血清与1%双抗的DMEM培养基培养,每2天换液1次,选取3~8代细胞用于实验。牛子宫上皮细胞采用专用上皮细胞培养基培养,选取3~10代细胞开展实验,保证细胞状态稳定。

1.4实验分组与处理。实验设置3组,每组3次生物学重复:正常对照组常规培养;LPS模型组以1 μ g/mL LPS刺激RAW264.7细胞,以0.1~0.5 μ g/mL LPS刺激牛子宫上皮细胞;亚精胺预处理组采用0.1、1、10mM亚精胺预处理1h,再加入LPS建立炎症模型。

1.5亚精胺安全浓度筛选。采用CCK-8法与LDH法检测不同浓度亚精胺对细胞活性的影响,确定无明显细胞毒性的浓度范围。

1.6炎症因子检测。采用ELISA法检测细胞上清TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8、TGF- β 蛋白含量,qPCR法检测相关基因相对表达量,以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算结果。

1.7 NF- κ B信号通路检测。采用Westernblot检测IkB α 、p-p65、p65蛋白表达,BCA法蛋白定量后经电泳、转膜、封闭、抗体孵育及化学发光显影,ImageJ软件定量灰度值;采用免疫荧光法结合激光共聚焦显微镜观察p65核转位情况。

1.8氧化应激与细胞凋亡检测。采用DCFH-DA荧光探针检测胞内ROS水平;AnnexinV-FITC/PI双染后经流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.9自噬相关蛋白检测。提取细胞总蛋白,Westernblot检测LC3-I/LC3-II、Beclin-1表达,以GAPDH为内参,计算LC3-II/LC3-I比值及蛋白相对表达量。

1.10细胞共培养与屏障功能检测。采用Transwell小室建立巨噬细胞-上皮细胞共培养模型,上室接种RAW264.7细胞,下室接种牛子宫上皮细胞;收集LPS活化巨噬细胞的上清液处理上皮细胞,模拟炎症旁损伤。采用TEER仪检测上皮细胞单层电阻值,Westernblot检测ZO-1蛋白表达,评价上皮屏障完整性。

1.11统计学分析。数据采用SPSS22.0软件分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,P<0.05为差异显著,P<0.01为差异极显著。

2 结果

2.1亚精胺安全浓度范围。0.1~10mM亚精胺处理24h对RAW264.7细胞与牛子宫上皮细胞活性无显著影响,细胞存活率均高于90%(P>0.05);20mM亚精胺可显著降低细胞活力并增加LDH释放(P<0.05)。本研究选取0.1、1、10mM作为实验浓度。

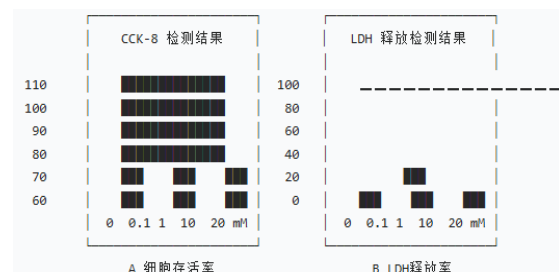


图1 不同浓度亚精胺对RAW264.7、bUECs细胞活力的影响

注: A为CCK-8检测细胞存活率; B为LDH检测细胞膜损伤程度。与0mmol/L对照组比较,*P<0.05,**P<0.01。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,n=3。

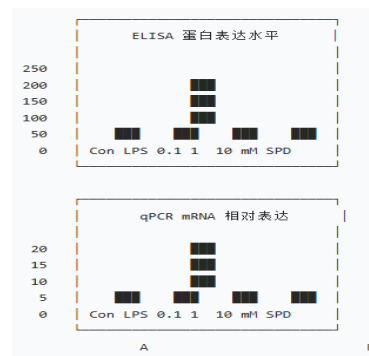


图2 亚精胺对LPS诱导RAW264.7细胞炎症因子表达的影响

注: A为ELISA检测上清TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白水平; B为qPCR检测mRNA相对表达量。与Con组比较, ## $P<0.01$; 与LPS组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.2 亚精胺抑制LPS诱导的炎症因子释放。与正常对照组相比, LPS模型组RAW264.7细胞TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的mRNA与蛋白水平极显著升高($P<0.01$); 亚精胺呈浓度依赖性抑制促炎因子表达, 10mM组抑制效果最显著($P<0.01$)。在牛子宫上皮细胞中, 亚精胺可逆转LPS诱导的IL-8上调, 维持TGF- β 表达稳定。

2.3 亚精胺阻断NF- κ B通路激活。Western blot结果显示, LPS可显著诱导I κ B α 降解与p65磷酸化($P<0.01$); 亚精胺可稳定I κ B α 表达并抑制p65磷酸化。免疫荧光结果显示, LPS可促使p65大量入核, 亚精胺可显著抑制p65核转位, 从上游阻断NF- κ B通路活化。

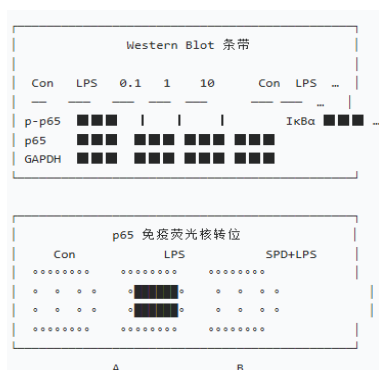


图3 亚精胺对LPS诱导NF- κ B通路激活的影响

注: A为Western blot检测I κ B α 、p-p65蛋白表达; B为免疫荧光观察p65核转位(绿色: p65; 蓝色: DAPI)。

2.4 亚精胺缓解氧化应激与细胞凋亡。LPS刺激后细胞内ROS水平极显著升高($P<0.01$), 亚精胺可显著降低ROS生成量。流式细胞术结果显示, LPS可导致细胞凋亡率上升, 亚精胺处理后凋亡比例显著降低($P<0.01$), 表现出良好的抗氧化与抗凋亡作用。

2.5 亚精胺激活细胞自噬通路。与LPS模型组相比, 亚精胺处理组LC3-II/LC3-I比值、Beclin-1表达均显著升高($P<0.05$), 表明亚精胺可有效激活细胞自噬, 清除受损细胞器与蛋白, 减轻炎症与细胞损伤。

2.6 亚精胺保护上皮屏障功能。在共培养与条件培养基模型中, LPS活化的巨噬细胞可显著降低牛子宫上皮细胞TEER值并下调ZO-1表达($P<0.01$); 亚精胺可显著提升TEER水平并上调ZO-1表达($P<0.01$), 阻断巨噬细胞介导的上皮旁损伤, 维持子宫内屏障完整性。

3 讨论

LPS通过TLR4/NF- κ B通路触发瀑布式炎症反应, 是子宫内炎症发生发展的核心环节。本研究证实, 亚精胺可通过多通路协同作用抑制LPS诱导的子宫炎症损伤, 为抗生素替代提供实验依据。

子宫局部炎症由免疫细胞与结构细胞共同介导, 巨噬细胞活化后通过旁分泌信号损伤上皮屏障。本研究首次采用巨噬细胞-上皮细胞共培养体系, 更贴近体内生理微环境, 结果表明亚精胺既可直接抑制巨噬细胞炎症活化, 又可间接保护上皮屏障完整性, 实现对细胞间对话的精准调控^[4-5]。

NF- κ B是炎症信号传导的核心枢纽, 亚精胺可通过稳定I κ B α 、抑制p65磷酸化与核转位, 从上游阻断炎症信号传递。同时, 亚精胺可激活细胞自噬, 清除过量ROS与损伤蛋白, 减少细胞凋亡, 形成抗炎、抗氧化、促自噬的协同保护网络。

浓度筛选结果表明, 0.1~10mM为亚精胺安全有效浓度范围, 高浓度亚精胺可干扰细胞内离子平衡, 临床应用需严格控制剂量。本研究采用跨物种细胞模型, 可为后续体外实验与兽药研发提供参考^[6]。本研究尚未开展动物实验验证药效, 自噬与NF- κ B通路的交叉调控机制、给药途径及长期安全性仍需进一步深入探究。

4 结论

亚精胺在安全浓度范围内可浓度依赖性抑制LPS诱导的巨噬细胞炎症反应, 减少促炎因子释放, 阻断NF- κ B通路激活; 可减轻LPS诱导的牛子宫上皮细胞氧化应激、凋亡与屏障损伤, 提升ZO-1表达与TEER值; 在巨噬细胞-上皮细胞共培养体系中, 可调控细胞间互作, 减轻炎症旁损伤, 维持子宫内屏障功能。亚精胺的保护作用与抑制NF- κ B通路、激活自噬、抗氧化、抗凋亡密切相关。本研究为亚精胺开发为防治奶牛子宫内炎症的天然抗炎制剂提供实验基础, 也为人类子宫内炎症的治疗提供新思路。

【参考文献】

- [1]杨寒,俞益桂,田淑祥,等.基于自噬-NLRP3炎性小体信号探讨鹰嘴豆芽素A对脂多糖诱导的帕金森病模型小鼠的保护作用[J].中国药理学通报,1-15[2026-04-15].
- [2]张练,何梦媛,郭玲.6种中药单体对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤保护作用及机制研究[J].中国处方药,2026,24(06):33-39.
- [3]赵鑫,刘英杰,厉昕好,等.脂多糖通过下调TANGO1/SCFD1轴破坏内质网-高尔基体稳定性加剧血管内皮细胞炎症损伤[J].中国病理生理杂志,2026,42(03):459-467.
- [4]卢利霞,杨丹丹.慢性子宫内炎症患者血清MCP-1水平及其与子宫内炎症、炎症反应的相关性[J].中国医科大学学报,2026,55(03):251-258.
- [5]范春娜.亚精胺通过抑制神经元铁死亡发挥抗帕金森病神经保护作用[J].山西医科大学学报,2026,57(02):160-167.
- [6]张亮.罗伊氏乳酸菌外囊泡对LPS诱导的奶牛子宫内炎症的影响[J].现代畜牧科技,2024,(07):29-33.

作者简介:

刘达一(2001--),男,吉林省大安市人,硕士研究生。从事的研究方向或工作领域: 动物遗传育种与繁殖。