

孟凡华, 常龙维, 王亮, 等. 高糖培养的双峰驼肾细胞抗氧化基因检测 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 48-56.

MENG F H, CHANG L W, WANG L, et al. Antioxidant gene detection in Bactrian camel renal cells cultured under high glucose conditions [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 48-56.

高糖培养的双峰驼肾细胞抗氧化基因检测

孟凡华¹, 常龙维¹, 王亮¹, 王申元¹, 薛日夫², 张东¹

(1. 内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010010;

2. 内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究院, 内蒙古 呼和浩特 011517)

摘要: 为了揭示双峰驼肾脏在高糖环境中的抗氧化能力, 以其离体培养的肾皮质和髓质细胞为材料, 以双峰驼生理血糖值 7.1 mmol/L 浓度的葡萄糖培养基为对照, 10、15、25 和 40 mmol/L 葡萄糖浓度进行高糖逆境模拟培养, 检测各处理组的活性氧 (ROS) 水平和抗氧化基因的水平。结果显示: 高糖应激下, 肾皮质细胞内 ROS 含量在 10、15、25 mmol/L 糖浓度下有极显著增加 ($P < 0.01$), 肾髓质细胞内 ROS 含量在 15、25、40 mmol/L 糖浓度下有极显著增加 ($P < 0.01$); 肾皮质细胞中过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 2、SOD3、谷胱甘肽过氧化物酶 (Gpx) 1、Gpx3、溶质载体家族 6 成员 1 (SLC6A1)、溶质载体家族 14 成员 1 (SLC14A1) 在 10 mmol/L 糖浓度下 mRNA 表达量极显著上升 ($P < 0.01$); Gpx1、Gpx3、Gpx4、糖皮质激素受体 (GR)、过氧化物酶体生物发生因子 5 (PEX5L)、多聚结合蛋白 2 (PCBP2)、ATP 柠檬酸裂合酶 (ACLY) 在 40 mmol/L 糖浓度下 mRNA 表达量极显著上升 ($P < 0.01$)。肾髓质细胞中 CAT、Gpx1、Gpx3 在 10 mmol/L 糖浓度下 mRNA 表达量极显著上升 ($P < 0.01$); CAT、SOD1、Gpx1、Gpx3 在 40 mmol/L 糖浓度下 mRNA 表达量极显著上升 ($P < 0.01$); SLC6A1 在 25 mmol/L 糖浓度下 mRNA 表达量极显著上升 ($P < 0.01$)。提示: 双峰驼肾皮质细胞对糖浓度变化敏感, 糖浓度偏离生理范围即引发 ROS 增加, 激活抗氧化基因表达, 产生显著氧化应激反应; 相比之下, 肾髓质细胞对糖浓度变化较不敏感, 仅在极端糖浓度偏离时表现出类似反应。高糖环境下两者均展现抗氧化能力, 但肾皮质细胞表现出更强的抗氧化适应性。

关键词: 双峰驼; 肾细胞; 氧化应激; 抗氧化基因

中图分类号: S824

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)11-0048-09

Antioxidant gene detection in Bactrian camel renal cells cultured under high glucose conditions

MENG Fanhua¹, CHANG Longwei¹, WANG Liang¹, WANG Shenyuan¹, XUE Rifu², ZHANG Dong¹

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China;

2. Inner Mongolia Saikexing Institute of Breeding and Reproductive Biotechnology in Domestic Animals, Hohhot 011517, China)

Abstract: In order to reveal the antioxidant capacity of Bactrian camel kidneys in a high-sugar environment, renal cortical and medullary cells cultured *ex vivo* were used as materials. Glucose concentration of 7.1 mmol/L, representing the physiological blood sugar level of Bactrian camels, was used as control, and glucose concentrations of 10, 15, 25, and 40 mmol/L were used to simulate high-sugar stress. Then, the levels of reactive oxygen species (ROS) and the expression of antioxidant genes were measured for each treatment group. The results showed that, under high sugar stress, the ROS levels inside the renal cortical cells increased significantly in the 10, 15, and 25 mmol/L glucose concentration groups ($P < 0.01$), while the ROS levels inside the renal medullary cells increased significantly in the 15, 25, and 40 mmol/L glucose concentration groups ($P < 0.01$). In the renal cortical cells, the mRNA expression levels of the genes CAT, SOD2, SOD3, Gpx1, Gpx3, SLC6A1, and SLC14A1 increased significantly in the 10 mmol/L glucose concentration group ($P < 0.01$), and the mRNA expression levels of Gpx1, Gpx3, Gpx4, GR, PEX5L, PCBP2, and ACLY increased significantly in the 40 mmol/L glucose concentration group ($P < 0.01$). In the renal medullary cells, the mRNA expression levels of CAT, Gpx1, and Gpx3 increased significantly in the 10

收稿日期: 2023-11-29; 修回日期: 2024-09-03

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目 (2021MS03051); 内蒙古教育厅自然科学基金重点项目 (NJZZ21014); 内蒙古自治区直属高校基本科研业务费项目 (BR220131)

第一作者: 孟凡华, 女, 博士, 副教授

* 通信作者: 张东, 博士, 教授, 主要从事动物发育生物学与生物技术研究, E-mail: zhangdongsydw@163.com.

mmol/L glucose concentration group ($P < 0.01$); CAT, SOD1, Gpx1, and Gpx3 increased significantly in the 40 mmol/L glucose concentration group; and SLC6A1 increased significantly in the 25 mmol/L glucose concentration group ($P < 0.01$). These results indicated that the renal cortical cells of Bactrian camels were sensitive to the changes in glucose concentration, triggering an increase in ROS and upregulating antioxidant gene expression, leading to significant oxidative stress reactions when glucose concentrations varied at physiological levels. In contrast, the renal medullary cells were less sensitive to glucose concentration changes, exhibiting similar responses only under extreme variations. The present study confirmed that both cell types exhibited antioxidant capabilities under high glucose conditions, with cortical cells demonstrating stronger antioxidant adaptation.

Keywords: Bactrian camel; renal cells; oxidative stress; antioxidant genes

双峰驼是我国固有的畜种，主要分布在西北干旱地区。由于长期生存在恶劣的环境之中，使得其在进化过程中形成了耐高温、耐干旱、耐盐和耐高血糖的独特特征^[1-2]，是研究动物抗逆的模式生物。骆驼的基础血糖值是 (7.1 ± 0.3) mmol/L，高于马 (4.2 ± 0.4) mmol/L 和绵羊 (3.4 ± 0.2) mmol/L 的基础值^[3-4]。对骆驼、绵羊、马进行静脉葡萄糖注射试验表明，骆驼血浆中葡萄糖浓度显著升高，并且其葡萄糖清除率远低于绵羊和马。双峰驼为了适应高血糖水平，肾脏作为关键的代谢器官，发挥着重要的作用，而探讨抗逆性的机制，深入研究活性氧 (ROS) 的作用至关重要。当机体受到如低氧、高温、高糖和缺血再灌注等区别于机体正常值的外界刺激侵扰时，ROS 产生量会急剧增加。ROS 几乎在所有细胞代谢过程中都会产生，主要包括高活性自由基和非自由基物质这两类，其中高活性自由基包括超氧阴离子 ($O_2 \cdot^-$)、羟基 ($\cdot OH$) 和过氧基 ($\cdot OOH$)^[5-8]；非自由基物质主要是由过氧化氢 (H_2O_2) 和单态氧 (1O_2) 构成^[9-10]。ROS 作为正常代谢的天然副产物，在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用。低浓度的 ROS 可以成为第二信使，参与生命活动中的信息传递；而高浓度的 ROS 则会产生毒性，严重威胁到细胞的生存环境。当生物体 ROS 水平显著超过抗氧化能力，将会导致体内氧化与抗氧化不平衡的状态^[11]，称为氧化应激 (oxidative stress)，如脂质和蛋白质过氧化，会加速衰老、发生细胞损伤和诱发冠心病等。正常情况下，机体 ROS 会快速及时地被体内的抗氧化防御系统清除。清除多余的 ROS，主要依靠自身的酶性防御系统；部分非酶的小分子抗氧化剂也会参与其中，例如维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽等。抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (Gpx) 三类。因此，体内的 ROS 总是处于一个动态平稳的状态，而一旦这种平稳被打破，氧化应激就会随之而来。本研究对双峰驼肾皮质细胞和肾髓质细胞进行高糖的逆境模拟培养，检测细胞氧化应激水平和抗氧化基因表达量变化，将为阐述双峰驼肾脏的抗逆机理进

而攻克 ROS 引起的相关疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阿拉善双峰驼肾皮质细胞与肾髓质细胞，为本实验室冻存^[12]；不含钙镁磷酸盐缓冲液 (D-PBS)，购自爱必信生物科技有限公司；青霉素和链霉素 (PS)，购自以色列 BI 公司；0.25% 胰蛋白酶、DMEM 培养液、胎牛血清 (FBS)，购自美国 Gibco 公司；氯仿和异丙醇，购自天津生化试剂公司；DNA Marker、荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒、TRIzol，购自 TaKaRa 公司；ROS 荧光探针试剂盒，购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 不同糖浓度处理下细胞的 ROS 检测

复苏 P3 代肾皮质细胞和肾髓质细胞，传代接种于 6 孔板中，待细胞长至接近 60%，弃去培养液，用 PBS 清洗，分别加入含 7.1 (对照)、10、15、25、40 mmol/L 葡萄糖的完全培养液，每组 3 个重复，放入恒温培养箱培养 48 h。将稀释 1 000 倍的活性氧 ROS 荧光探针 (DCFH-DA) 吸取 1.5 mL 于 6 孔板中，标记，置于摇床孵化，4 h 后使用激光共聚焦显微镜检测各处理组的平均荧光强度，得到 ROS 的含量值。

1.2.2 抗氧化基因 qRT-PCR 检测

从 NCBI 网站查找双峰驼肌动蛋白 (β -actin)、CAT、SOD1、SOD2、SOD3、Gpx1、Gpx3、Gpx4、糖皮质激素受体 (GR) 等各基因序列，使用软件 Primer Premier 5.0 设计 qRT-PCR 引物 (表 1)。同时，根据前期转录组数据^[13]中筛选的肾脏抗氧化相关基因溶质载体家族 6 成员 1 (SLC6A1)、葡萄糖转运蛋白 1 (Glut1)、过氧化物酶体生物发生因子 5 (PEX5L)、ATP 柠檬酸裂合酶 (ACLY)、多聚结合蛋白 2 (PCBP2)、溶质载体家族 14 成员 1 (SLC14A1)、血红蛋白亚基 (LOC105061856) 设计引物 (表 2)。

表 1 已知抗氧化基因 qRT-PCR 引物序列

基因编号	基因名	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp	退火温度/℃
XM_010965866.2	β -actin	F:CACTGGCATCGTGATGGACT; R:GCAGCTCGTAGCTCTTCTCC	198	57.89
XM_010964693.2	CAT	F:TTTACACGGAGGATGGT; R:TAGATGCCGTTTGAGGGTT	333	59.68
XM_010956595.2	SOD1	F:TTGGAGACCTGGGCAATGTG; R:ATTGTCCGGCCAATGATGGA	196	59.86
KR023951.1	SOD2	F:TGAAACCAAGCCAACCCCAA; R:TAACCTGAATGTCGCCGAGG	143	59.39
XM_010963046.2	SOD3	F:GACATGCACGCCAAAGTGAC; R:GGGTCAAGTCCCCGAACTG	98	60.78
XM_010969258.2	Gpx1	F:GAAATGTGACGTGAACGGCT; R:ATGAACTGGGGTCCGGTCAT	197	60.69
XM_010969999.2	Gpx3	F:ATCGACGGGGAGGAGTACAT; R:ATGACCAGACCAAATGGCCC	265	60.96
XM_010966627.1	Gpx4	F:TCGCAATGAGGCAAGACAGA; R:AAGGCGAGGATCCGTAACC	95	59.55
AX119260.1	GR	F:CTCCTCACATCCTGATCGCC; R:CACCAACAATGACACTGCCG	138	59.97

表 2 转录组筛出的抗氧化相关基因 qRT-PCR 引物序列

基因编号	基因名	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp	退火温度/℃
XM_010953047.2	SLC6A1	F:TTAGGCTGCCCGGCTTTAC; R:GACAGAGCCTCACCTTAACCTTCT	71	60.04
XM_010959755.2	Glut1	F:TACAACACCGGCGTATCAA; R:GCGAAAATGGATACCGCCAC	137	59.96
XM_045511297.1	PEX5L	F:CTCACGGAATGTCACTGGTTTAAT; R:AAACACAGCCAACAGAAAATTC	199	60.11
XM_010969012.2	ACLY	F:TTGTGCTGGGAAGGAGTATGG; R:CCTGCTTCAGCCTCTTCTGATC	204	59.90
XM_010964391.2	PCBP2	F:AAACGATTTGATTGGCTGCAT; R:TGACGGATCTCATTGATTTTGG	112	59.82
MB474519.1	SCL14A1	F:GGATGCCGCTCAGTAAAGTC; R:GCCCTTCTTCTGTTTGTCTCA	271	60.03
XM_010969999.2	LOC105061856	F:GGGACCTGTCCACTGCTGAT; R:CTTACTGCCATGGGCCTTCA	117	59.73

传代细胞培养 48 h 后达到 80%~90%，收集每组细胞，采用酚-氯仿抽提法提取总 RNA，反转成 cDNA，进行 PCR 检测。反转录体系：RNA 2 μ L，RNase-free ddH₂O 6 μ L，5 \times Prime Script RT Master Mix 2 μ L，共 10 μ L。反转录反应程序：37 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s，4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应体系：TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L，上、下游引物各 0.8 μ L，cDNA 模板 2 μ L，ddH₂O 6.4 μ L，共 20 μ L。PCR 反应程序：95 $^{\circ}$ C 30 s；95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 60 s，

72 $^{\circ}$ C 10 s，40 个循环。反应结束后，得到各组处理的 Ct 值，通过计算可得出各处理组之间抗氧化基因的差异表达量。

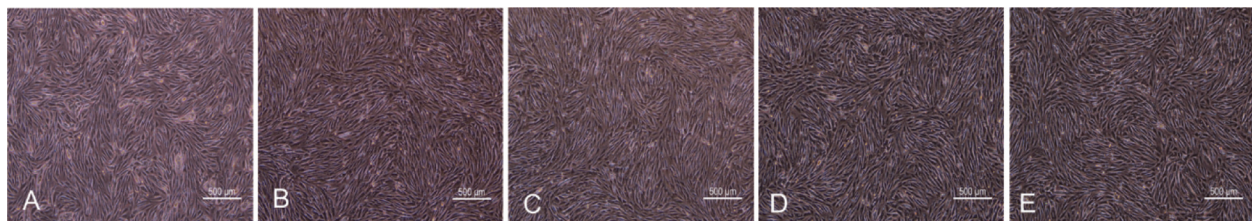
1.3 数据统计与分析

使用 SPSS 20 统计分析软件进行处理，采用 *t* 检验法将各组数据与对照组比较， $P < 0.05$ 表明具有统计学意义。所有试验数据均以“平均数 \pm 标准差”形式表示。

2 结果与分析

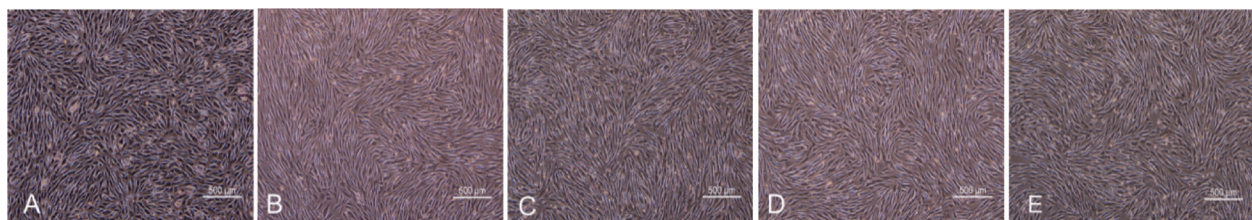
2.1 不同葡萄糖浓度处理后肾皮质细胞和肾髓质细胞形态观察

不同葡萄糖浓度处理后的肾皮质细胞生长情况见图1。细胞形态并无差异，生长速度没有明显变化，



A、B、C、D、E. 依次为 7.1、10、15、25、40 mmol/L 葡萄糖浓度。

图1 不同葡萄糖浓度处理后的肾皮质细胞



A、B、C、D、E. 依次为 7.1、10、15、25、40 mmol/L 葡萄糖浓度。

图2 不同葡萄糖浓度处理后的肾髓质细胞

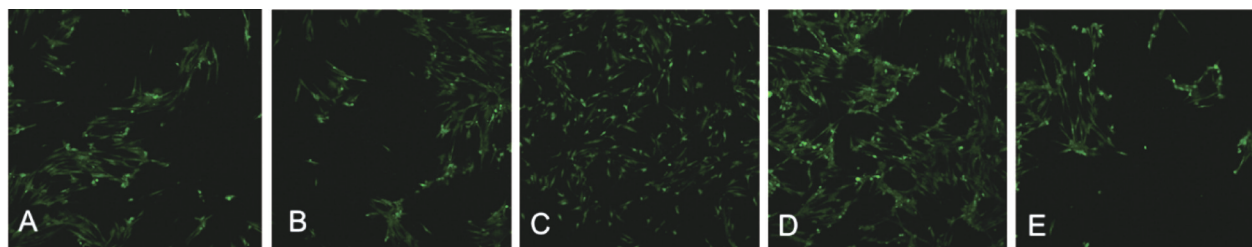
2.2 不同葡萄糖浓度处理后肾皮质细胞和肾髓质细胞 ROS 强度观察

用不同葡萄糖浓度的培养基培养双峰驼肾皮质细胞和肾髓质细胞，经过 4 h 孵育后，使用激光共聚焦

但随着糖浓度的增加，死细胞数量略有增多。

不同葡萄糖浓度处理后的肾髓质细胞生长情况见图2。细胞形态与处理前保持一致，生长速度没有明显变化。随着糖浓度增加，也存在死细胞略增多趋势。

显微镜观察了各处理组细胞的 ROS 荧光强度（图3和图4）。各组均在显微镜下观察到绿色荧光，荧光强度随着糖浓度的增加有增强趋势。



A、B、C、D、E. 依次为 7.1、10、15、25、40 mmol/L 葡萄糖浓度。

图3 不同糖浓度下肾皮质细胞 ROS 的荧光观察 (100×)

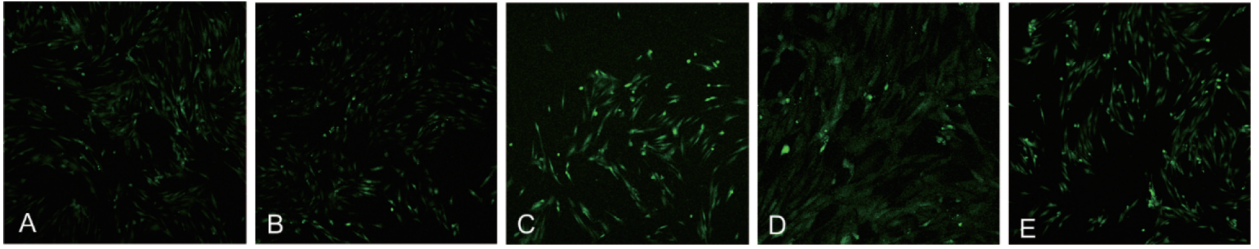
2.3 不同葡萄糖浓度处理后肾皮质细胞和肾髓质细胞 ROS 含量统计

计算了各组 ROS 的平均荧光值，得到各处理组中细胞内的 ROS 含量。经统计，肾皮质细胞内 ROS 随着糖浓度增加整体表达量呈现先上升后下降趋势

(图5A)，其中 10、15、25 mmol/L 较 7.1 mmol/L (对照组) 极显著增加 ($P < 0.05$)；肾髓质细胞内 ROS 随着糖浓度增加总体表达量呈上升趋势 (图5B)，其中，10 mmol/L 较 7.1 mmol/L 显著降低，15、25、40 mmol/L 较 7.1 mmol/L 极显著增加 ($P <$

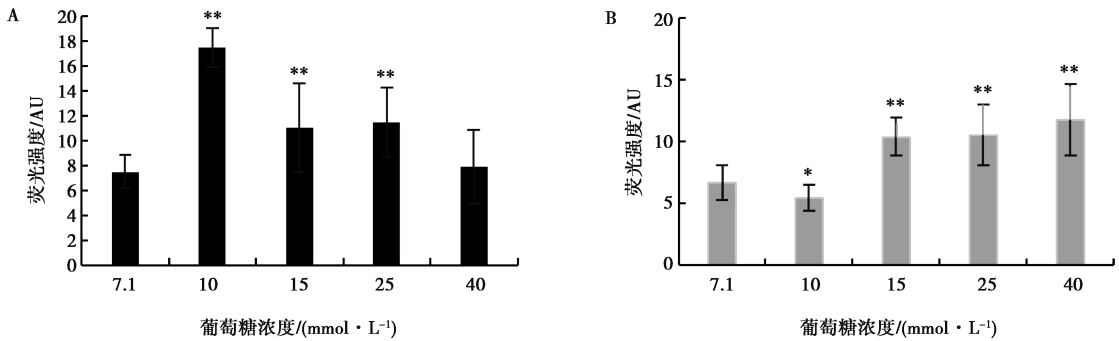
0.05)。肾皮质细胞在糖浓度偏离对照组时，细胞内 ROS 含量显著增加，而肾髓质细胞只有在糖浓度极

度偏离对照组时，细胞内 ROS 才会极显著增加，表明肾皮质细胞对糖浓度的变化更敏感。



A、B、C、D、E. 依次为 7.1、10、15、25、40 mmol/L 葡萄糖浓度。

图 4 不同糖浓度下肾髓质细胞 ROS 的荧光图片 (100×)



与对照组 (7.1 mmol · L⁻¹) 比较, * 表示差异显著 (P<0.05), ** 表示差异极显著 (P<0.01)。下同。

图 5 不同葡萄糖浓度处理下肾皮质细胞 (A) 与肾髓质 (B) 细胞 ROS 荧光强度比较

2.4 不同葡萄糖浓度处理后肾皮质细胞与肾髓质细胞抗氧化基因表达量检测

各组均以双峰驼正常血糖浓度 (7.1 mmol/L) 为对照组, 进行了抗氧化基因 qRT-PCR 检测。由图 6 可见, 随着培养液中葡萄糖浓度的增加, 肾皮质细胞 CAT mRNA 相对表达量整体呈先上升后下降趋势, 在 10、15、25 mmol/L 糖浓度下与对照组相比极显著升高 (P<0.01); SOD2 与 SOD3 的 mRNA 相对表达量整体呈先上升后下降趋势, 在 10、15 mmol/L 糖浓

度下与对照组相比极显著升高 (P<0.01); Gpx1 与 Gpx3 的 mRNA 相对表达量整体呈上升趋势, 10、25、40 mmol/L 糖浓度下与对照组相比极显著升高 (P<0.01); Gpx4 mRNA 相对表达量整体呈上升趋势, 在 25、40 mmol/L 糖浓度下与对照组相比极显著升高 (P<0.01); GR mRNA 相对表达量整体呈上升趋势, 在 10 mmol/L 糖浓度下与对照组相比显著升高 (P<0.05), 在 40 mmol/L 糖浓度下与对照组相比极显著升高 (P<0.01)。

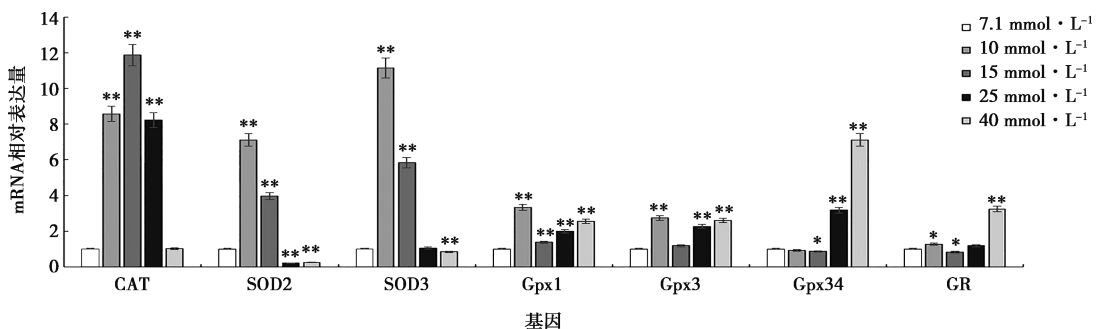


图 6 不同葡萄糖浓度下肾皮质细胞 CAT、SOD2、SOD3、Gpx1、Gpx3、Gpx4 与 GR 基因表达量比较

由图7可见,肾髓质细胞随着糖浓度的增加,CAT和SOD1的mRNA相对表达量整体呈上升趋势,其中CAT mRNA在10、15、40 mmol/L, SOD1 mRNA在15、25、40 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$); SOD2 mRNA相对表达量整体为下降趋势,且均与对照组相比差异极显著 ($P <$

0.01); Gpx1与Gpx3的mRNA相对表达量整体呈上升趋势,其中Gpx1 mRNA相对表达量在10、15、40 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$), Gpx3 mRNA相对表达量在10、40 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$)。

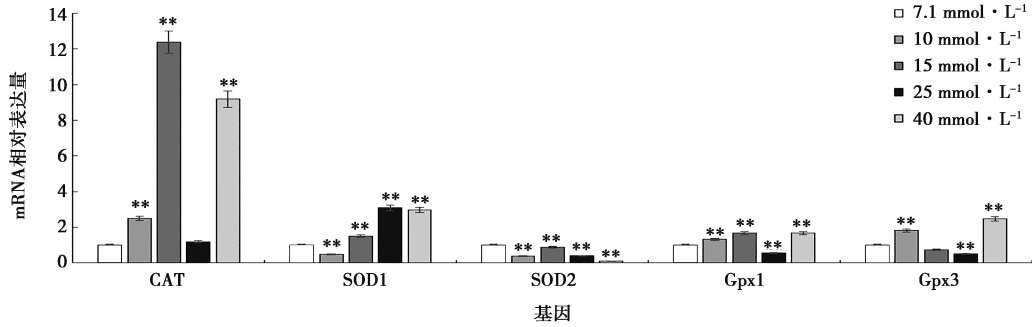


图7 不同葡萄糖浓度下肾髓质细胞CAT、SOD1、SOD2、Gpx1、Gpx3基因表达量比较

2.5 不同葡萄糖浓度处理后转录组筛选的肾皮质细胞和肾髓质细胞抗氧化相关基因表达量检测

由图8可见,肾皮质细胞中随着糖浓度增加,Glut1 mRNA相对表达量整体呈上升趋势,在25 mmol/L糖浓度下与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$),在10、40 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$); SLC6A1 mRNA相对表达量呈先上升后下降趋势,在10、15 mmol/L糖浓度下极显著高于对照

组 ($P < 0.01$),在25、40 mmol/L糖浓度下极显著低于对照组 ($P < 0.01$); PEX5L、PCBP2、ACLY的mRNA相对表达量整体呈上升趋势,在25、40 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$); LOC105061856、SLC14A1的mRNA相对表达量为先上升后下降趋势,在10 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$)。

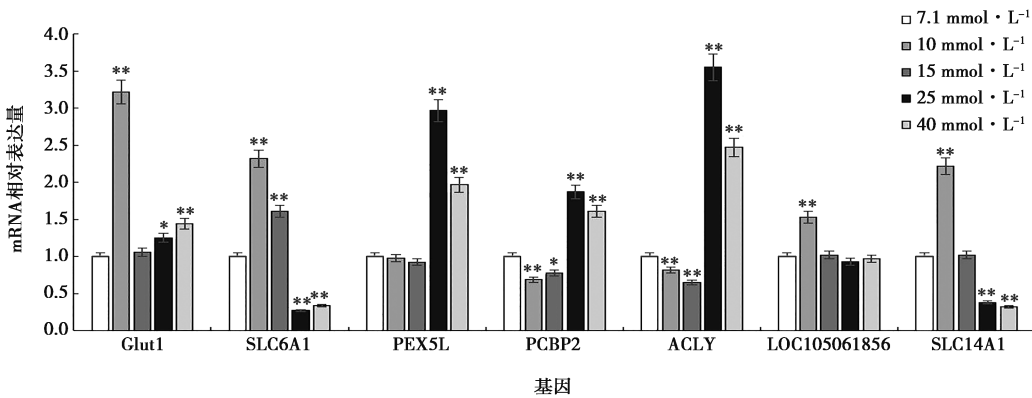


图8 不同葡萄糖浓度下肾皮质细胞Glut1、SLC6A1、PEX5L、PCBP2、ACLY、LOC105061856、SLC14A1基因表达量比较

由图9可见,肾髓质细胞中随着糖浓度的增加,SLC6A1 mRNA相对表达量整体呈先下降后上升趋势,在25 mmol/L糖浓度下与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$),其他糖浓度下表达极显著下降 ($P <$

0.01); Glut1、PEX5L、PCBP2、ACLY、LOC105061856、SLC14A1的mRNA相对表达量与对照组相比整体均呈下降趋势,在各糖浓度(除Glut1在10 mmol · L⁻¹)下都差异极显著 ($P < 0.01$)。

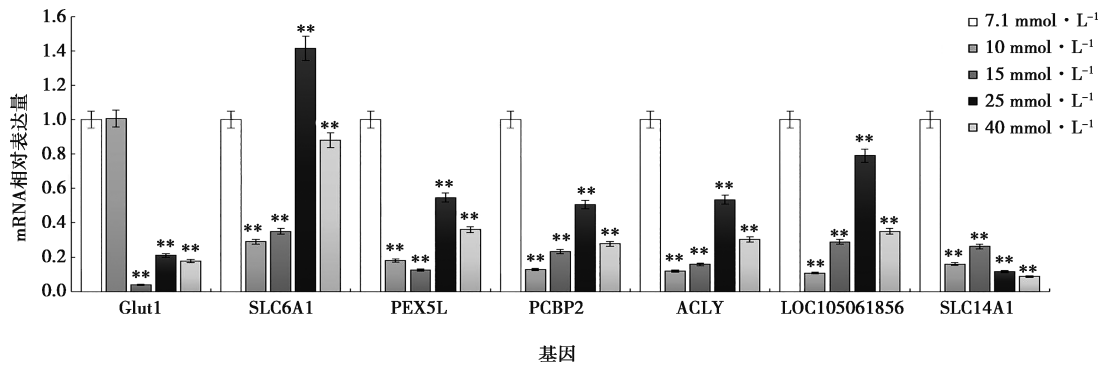


图9 不同葡萄糖浓度下肾髓质细胞 Glut1、SLC6A1、PEX5L、PCBP2、ACLY、LOC105061856、SLC14A1 基因表达量比较

3 讨论

根据已有的禁水、盐胁迫处理获得的转录组数据^[13]显示,双峰驼肾脏在抗氧化调节中有抗氧化基因上调表达的趋势,发挥抗氧化作用。因此,本试验以双峰驼肾皮质与肾髓质细胞为试验材料,通过在培养液中添加葡萄糖模拟双峰驼肾细胞高糖环境,之后对各试验组细胞内 ROS 含量进行检测,发现肾皮质细胞在 10、15、25 mmol/L 糖浓度下 ROS 与对照组相比显著增加;肾髓质细胞 15、25、40 mmol/L 糖浓度下 ROS 与对照组相比显著增加,这一结果与葛勤敏等^[14]在高浓度葡萄糖检测内皮细胞 ROS 含量的试验结果一致,均为 ROS 含量增加。

为了研究双峰驼肾细胞如何清除细胞内多余的 ROS,对肾细胞进行了抗氧化及抗氧化相关基因检测,以此确定双峰驼肾细胞的抗氧化调控机制。抗氧化相关基因已有的试验表明,经盐胁迫后双峰驼肾髓质组织中 SLC14A1、SLC6A1、PEX5L、PCBP2 基因上调表达,禁水胁迫后 ACLY、LOC105061856 基因下调表达。在本次试验中,肾髓质细胞与肾皮质细胞中 SLC14A1 基因整体呈下调表达,推测有以下可能:首先 SLC14A1 编码的蛋白是尿素转运蛋白 B,是一种水通道家族蛋白,在维持细胞渗透压方面发挥着作用,SLC14A1 在肾脏形成高浓缩尿中发挥着作用^[15-16],而在体外培养的细胞中,高糖组中培养液的渗透压不断加大,为了平衡细胞内外环境渗透压平衡,细胞中出现了 SLC14A1 基因下调表达;其次因为在活体中各器官相互协同,形成了复杂稳定的调控网络,而体外培养的细胞相对单一,使得该基因的表达与组织中的表达存在差异。SLC6A1 基因编码的蛋白是 GABA 转运蛋白 1,该蛋白有着减少三羧酸循环(TCA)引起的细胞失水、降低细胞呼吸以及清除自由基的功能^[17-19]。本试验中该基因在肾皮质中 10 和 15 mmol/L 糖浓度中上调表达,在肾髓质中 25 mmol/L

糖浓度中上调表达,一方面是为了清除过高糖浓度引起的自由基积累,另一方面也可能是发挥调节渗透压的作用。PEX5L 基因编码的蛋白是过氧化物酶体合成因子 5,过氧化物酶体可将有毒的 H_2O_2 转化为 H_2O ^[20]。该基因在肾皮质细胞中存在上调表达的趋势,在肾髓质细胞则下调表达。同样是此趋势表达的抗氧化基因 PCBP2,是一种防止花生四烯酸被氧化的基因^[13]。推测这 2 种基因的表达趋势可能是由于肾皮质细胞中 Glut1 上调表达,吸收了更多的葡萄糖,引起了较为激烈的应激反应,而肾髓质细胞对葡萄糖不敏感,应激反应较小,没有引起该抗氧化基因的高表达。肾皮质细胞中 ACLY 和 LOC105061856 基因上调表达,其中 ACLY 编码的是 TCA 循环的关键酶柠檬酸合酶^[13],LOC105061856 编码的是血红蛋白亚基,与氧气的运输相关,这 2 个基因在肾皮质细胞中上调表达,推测是因为肾皮质细胞吸收过多的葡萄糖,导致细胞内 TCA 循环加速,细胞新陈代谢加快,对氧气的需求量增加。

结合抗氧化基因结果可见,肾皮质细胞中 CAT、Gpx1、SLC6A1、SOD2、SOD3、LOC105061856、Gpx3、SLC14A1、GR 基因上调表达,PCBP2、ACLY 基因下调表达;肾髓质细胞中 CAT、Gpx3、Gpx1 基因上调表达,PEX5L、PCBP2、SOD1、SOD2、SLC14A1、ACLY、LOC105061856 基因下调表达。因为 Gpx1、SOD1、SOD2 在线粒体中发挥作用,SOD3 与 Gpx3 在细胞膜发挥作用^[21-22],由此推测在 10 mmol/L 糖浓度下,肾皮质细胞的 Glut1 表达量增加,过多的葡萄糖被运输至细胞内,从而引起了细胞内 ROS 的增加。线粒体内 SOD2 将 ROS 分解 H_2O_2 ,基因 SLC6A1 mRNA 表达量增加,降低细胞的新陈代谢,减少 ROS 的产生;由氧分子作为电子受体在代谢中产生的 ROS 被 SOD3 分解为 H_2O_2 ,随后 H_2O_2 均被运输至细胞内并且在细胞内被分解,其中一部分被 CAT 分解为水和氧气,另一部分被 Gpx1 与 Gpx3 分

解为水。肾髓质细胞对糖浓度并不敏感, Glut1 的 mRNA 表达量与对照组相比呈下降趋势, 在 10 mmol/L 糖浓度下, 细胞内由于渗透压等因素的改变, 产生的 ROS 均被 SOD1 分解为 H_2O_2 , 之后经过 CAT 与 Gpx3 协同分解为水与氧气。

在最高糖浓度 (40 mmol/L) 下, 肾皮质细胞中 Gpx1、Gpx3、Gpx4、GR、Glut1、PEX5L、PCBP2、ACLY 基因上调表达, 基因 CAT、SOD2、SOD3、SLC6A1、SLC14A1 下调表达; 肾髓质细胞中 CAT、SOD1、Gpx1、Gpx3 基因上调表达, Glut1、SOD2、SLC6A1、PEX5L、PCBP2、ACLY、LOC105061856、SLC14A1 基因下调表达。肾皮质细胞中的 SOD3 下调表达, 与 Mahmoud 等^[23]对骆驼肾皮质脱水试验期间的 SOD3 表达趋势一致。Gpx4 有防止细胞凋亡的功能^[24], 40 mmol/L 糖浓度下肾皮质细胞中 Gpx4 上调表达, 表明肾皮质细胞在该浓度下会发生凋亡。由此推测在 40 mmol/L 糖浓度下, 肾皮质细胞内的 ROS 主要被 Gpx 分解为水, 并且抗氧化基因 PEX5L、PCBP2 上调表达; 肾髓质细胞内的 ROS 被 SOD1 分解为 H_2O_2 , 之后被 CAT、Gpx1、Gpx3 分解为水和氧气, 以此来保护细胞。

肾皮质细胞中, CAT、SOD2、SOD3 基因在 40 mmol/L 糖浓度下下调表达, 在 10 mmol/L 糖浓度下上调表达, 这种在高浓度下调表达, 低浓度上升表达的趋势与不同浓度纳米塑料对日本沼虾抗氧化基因 (SOD、CAT) 表达影响趋势一致^[25]。推测在 40 mmol/L 糖浓度下, 抗氧化基因 CAT 与 SOD 产生了毒性或者抑制作用, 使得该基因在 40 mmol/L 糖浓度下低表达; 也可能是因为 CAT 只清除 H_2O_2 , 而 40 mmol/L 糖浓度下, 产生的 ROS 种类不同, 使得 CAT 在 40 mmol/L 糖浓度下并不发挥主要作用。后期我们将对肾皮质与肾髓质细胞中差异表达抗氧化基因进行 Western blot 在蛋白水平进一步验证, 已期获得更有效证据来阐述双峰驼肾脏的抗逆机制。

综上所述, 高糖条件下, 双峰驼肾皮质和髓质细胞均具有一定的抗氧化作用, 肾皮质细胞抗氧化能力更强。

参考文献:

- 方艳, 周俊文, 关伟军, 等. 基于瘤胃转录组探究双峰驼沙漠适应性分子机制 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52 (1): 77-87.
- 苏布登格日勒, 阿丽玛, 乌云格日勒, 等. 内蒙古地区双峰驼生活习性的研究 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29 (4): 49-53.
- 曾献春, 郑李娟, 庄伟伟. 骆驼消化道内嗜咪降解菌的分离、筛选及降解能力 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2017, 39 (6): 1073-1081.
- ELMAHDI B, SALLMANN H P, FUHRMANN H, et al. Comparative aspects of glucose tolerance in camels, sheep, and ponies [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology, 1997, 118 (1): 147-151.
- HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity [J]. Antioxidants, 2021, 10 (2): 313.
- ANTONIO C M, PIERRE S, FABIO C. Inhibitory effect of fungoid chitosan in the generation of aldehydes relevant to photooxidative decay in a sulphite-free white wine [J]. Food Chem, 2021, 6 (12): 129222-129226.
- HABER F, WEISS J, POPE W J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts [J]. A Math Physi, 1997, 147 (861): 332-351.
- PROUSEK J. Fenton chemistry in biology and medicine [J]. Pure & Applied Chemistry, 2007, 79 (12): 2325-2338.
- DAS K, ROYCHOUDHURY A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental-stress in plants [J]. Front Environ, 2014, 53 (2): 53-56.
- HATZ S, LAMBERT J, OGILBY P R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability [J]. Photochemical and Photobiological Sciences, 2007, 6 (10): 1106-1116.
- LI R, JIA Z, TRUSH M A. Defining ROS in biology and medicine [J]. React Oxyg Species (Apex), 2016, 1 (1): 9-21.
- 朱纯霄, 孙睿, 孟凡华. 阿拉善双峰驼 ENaC α 亚基基因克隆及激素对肾皮质细胞中该基因表达的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (2): 338-344.
- 曹宇. 基于骆驼肾脏、肝脏和回肠的 RNA-seq 揭示其耐盐抗旱的机制 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- 葛勤敏, 边帆, 苏青. 高浓度葡萄糖在内皮细胞氧化应激中的作用 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 28 (2): 4-8.
- OLIVES B, MATTEI M G, HUET M, et al. Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (26): 15607-15610.
- YANG B, VERKMAN A S. Analysis of double knockout mice lacking aquaporin-1 and urea transporter UT-B. Evidence for UT-B-facilitated water transport in erythrocytes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (39): 36782-36786.
- MATTHEWS E JR, RAHNAMA-VAGHEF A, ESKANDARI S. Inhibitors of the γ -aminobutyric acid transporter 1 (GAT1) do not reveal a channel mode of conduction [J]. Neurochemistry International, 2009, 55 (8): 732-740.
- DAYAN O, BENYONA A, KANNER B I. The aromatic and charge pairs of the thin extracellular gate of the γ -aminobutyric acid transporter GAT-1 are differently impacted by mutation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289 (41): 28172-28178.
- BOUCHE N, FROMM H. GABA in plants: just a metabolite [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9 (3): 110-115.
- AMERY L, SANO H, MANNAERTS G P, et al. Identification of PEX5p-related novel peroxisome-targeting signal 1 (PTS1) -binding proteins in mammals [J]. Biochemical Journal, 2001, 357 (3): 635-646.
- YU A H, PARK C W. Catalytic antioxidants in the kidney [J]. An-

tioxidants, 2021, 10 (1): 130-135.

[22] 凌宇. 转录组揭示双峰驼高浓度血糖耐受机制 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.

[23] MAHMOUD A A, HASSAN A D, OSMAN M A. The effect of long-term dehydration and subsequent rehydration on markers of inflammation, oxidative stress and apoptosis in the camel kidney [J]. BMC Veterinary Research, 2020, 458 (16): 1-13.

[24] FRIEDMANN A J, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol, 2014, 76 (12): 1180-1191.

[25] LI Y, LIU Z, LI M, et al. Effects of nanoplastics on antioxidant and immune enzyme activities and related gene expression in juvenile macrobrachium nipponense [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 398 (5): 122990-122996.

· 信息 ·

21 种畜牧、兽医科学类中国科技核心期刊中《畜牧与兽医》综合评价总分排名第9

《2024 年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》以《中国科技论文与引文数据库》（CSTPCD）为基础，采用科学客观的研究方法与评价方式，遴选中国自然科学领域各学科分类重要期刊作为统计来源期刊。2024 年版引证报告共收录了在中国（不含港澳台地区）正式出版的 1 998 种中文期刊和 167 种英文期刊，其中畜牧、兽医科学类期刊共收录 21 种，包括 19 本中文期刊和 2 本英文期刊，《畜牧与兽医》综合评价总分排名第 9。21 种期刊主要指标详见附表。

附表 2023 年畜牧、兽医科学类期刊主要指标

序号	刊名	核心总被引频次			核心影响因子			综合评价总分		学科扩散指标	学科影响指标	红点指标
		数值	排名	离均差率	数值	排名	离均差率	数值	排名			
1	ANIMAL NUTRITION	951	15	-0.49	1.612	2	0.65	51.9	2	6.52	0.81	0.25
2	JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY	1 123	13	-0.40	1.403	4	0.44	46.8	4	6.48	0.81	0.08
3	蚕业科学	627	19	-0.66	0.660	16	-0.32	34.3	13	7.19	0.43	0.25
4	动物医学进展	1 522	9	-0.19	0.670	15	-0.31	41.7	8	16.05	0.90	0.52
5	动物营养学报	7 671	1	3.11	1.990	1	1.04	78.4	1	16.33	1.00	0.82
6	家畜生态学报	1 158	12	-0.38	0.643	17	-0.34	34.6	12	8.90	0.95	0.54
7	经济动物学报	215	21	-0.88	0.510	20	-0.48	26.6	19	3.71	0.71	0.53
8	粮食与饲料工业	807	16	-0.57	0.618	19	-0.37	28.3	18	7.81	0.57	0.22
9	饲料工业	2 549	6	0.36	1.529	3	0.57	45.6	5	11.00	0.90	0.73
10	饲料研究	3 500	3	0.87	1.202	6	0.23	32.2	16	13.43	0.95	0.70
11	畜牧兽医学报	2 563	5	0.37	1.060	8	0.09	44.1	7	12.14	0.95	0.59
12	畜牧与兽医	1 484	11	-0.21	0.730	14	-0.25	39.1	9	9.48	0.86	0.57
13	畜牧与饲料科学	797	17	-0.57	0.620	18	-0.37	36.8	11	8.14	0.86	0.47
14	中国动物传染病学报	648	18	-0.65	0.821	11	-0.16	24.7	20	5.33	0.76	0.56
15	中国家禽	1 966	7	0.05	0.911	10	-0.07	33.6	15	7.71	0.95	0.56
16	中国兽药杂志	572	20	-0.69	0.462	21	-0.53	23.6	21	7.95	0.76	0.25
17	中国兽医科学	1 102	14	-0.41	0.772	12	-0.21	33.8	14	8.05	0.86	0.57
18	中国兽医学报	1 808	8	-0.03	0.761	13	-0.22	37.4	10	11.38	0.95	0.56
19	中国畜牧兽医	3 121	4	0.67	1.004	9	0.03	45.3	6	15.29	0.95	0.65
20	中国畜牧杂志	3 551	2	0.90	1.189	7	0.22	47.4	3	12.95	1.00	0.63
21	中国预防兽医学报	1 484	10	-0.21	1.338	5	0.37	31.0	17	6.52	0.81	0.47
21 种期刊平均值		1 868			0.976							

注：数据来自中国科学技术信息研究所《2024 年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》。