



王金辉,付梦思,李发达,等. 外源性脂多糖对马冈鹅胚胎期胸腿肌发育的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):52-60.  
WANG Jinhui,FU Mengsi,LI Fada,et al. Effects of exogenous lipopolysaccharide on breast and leg muscle development during embryonic stages in Magang goose[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):52-60.

## 外源性脂多糖对马冈鹅胚胎期胸腿肌发育的影响

王金辉,付梦思,李发达,江丹莉,田允波,许丹宁,黄运茂,张续劼\*

(仲恺农业工程学院动物科技学院,广东 广州 510225)

**摘要:**[目的]胚胎期是脊椎动物肌肉发育的重要时期,在鹅胚发育过程中,易受到种鹅体内脂多糖(LPS)垂直污染而导致死胚和弱苗的产生。本研究通过注射外源性LPS,模拟受LPS污染的马冈鹅胚胎,探究外源性LPS对马冈鹅胸腿肌发育的影响。[方法]选取8胚龄(E8)马冈鹅胚,分别注射含0、25、50和100 μg LPS的生理盐水100 μL于尿囊腔。于15胚龄(E15)、23胚龄(E23)和雏鹅1日龄(1 d)时采集尿囊液(1日龄采集血清)进行LPS含量检测,取胸腿肌组织进行HE染色切片并统计肌束面积和密度,检测胸腿肌中基因和1 d时蛋白表达量。[结果]外源性LPS显著降低鹅胚的孵化率。E23时,100 μg LPS组雏鹅尿囊液LPS含量显著高于其他3组( $P<0.05$ )。LPS显著降低E23和1 d胸腿肌束面积,显著降低E15肌束密度,显著提高E23胸腿肌束密度,显著降低E15和1 d腿腿肌束面积( $P<0.05$ )。LPS组E15鹅胚胸腿肌炎症相关因子基因(*IL-6*、*TNF-α*)和成肌增殖相关基因(*IGF-1*、*MyoD*)的表达量显著降低( $P<0.05$ );1 d时,*IGF-1*基因表达量显著升高,成肌分化相关基因(*Myogenin*、*Myh1*)表达量显著降低( $P<0.05$ );LPS组E15鹅胚腿腿肌*IL-6*、*TNF-α*、*MyoD*、*Myogenin*和*Myh1*基因表达量显著上调,*IGF-1*基因表达量显著下调( $P<0.05$ ),1 d时,仅100 μg组*IL-6*和*Myogenin*基因表现出显著上调( $P<0.05$ )。蛋白表达方面,1 d时,外源性LPS组胸腿肌*TNF-α*蛋白表达量显著升高,*MyoD*蛋白表达量显著降低( $P<0.05$ );腿腿肌*IL-6*、*TNF-α*和*MyHC*蛋白表达量显著升高,*MyoD*蛋白表达量显著降低( $P<0.05$ )。[结论]外源性LPS会导致雏鹅孵化率降低,胸腿肌肌束横截面积极显著降低,炎症因子表达量上升,成肌增殖相关基因表达量降低,不利于马冈鹅胚胎肌纤维生长发育。

**关键词:**马冈鹅;脂多糖(LPS);胚胎;胸腿肌

中图分类号:S853

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0052-09

## Effects of exogenous lipopolysaccharide on breast and leg muscle development during embryonic stages in Magang goose

WANG Jinhui, FU Mengsi, LI Fada, JIANG Danli, TIAN Yunbo, XU Danning,  
HUANG Yunmao, ZHANG Xumeng\*

(College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** [Objectives] The embryonic stage is an important period for muscle development of vertebrates. During the development of goose embryo, it is easy to be polluted by lipopolysaccharide (LPS), which leads to the generation of dead embryos and weak seedlings. The objective of this study was to investigate the effects of exogenous LPS on breast and leg muscle development of Magang goose embryos by injecting exogenous LPS to simulate LPS contaminated Magang goose embryos. [Methods] Magang goose embryos of embryonic age day 8 (E8) were selected and injected 100 μL of normal saline containing 0, 25, 50 and 100 μg LPS into allantoic cavity. Allantoic fluid (blood on 1 day-old age goose, 1 d) was collected at embryonic age day 15 (E15), day 23 (E23) and 1 day after birth (1 d) for LPS content detection. Breast and leg muscle tissue was collected for HE staining section to count muscle bundle area and density, and gene and protein expression levels of pectoral and leg muscle from 1 d were detected. [Results] Exogenous LPS significantly decreased the hatchability of goose embryos. At E23, LPS content in allantoic fluid of goslings in 100 μg LPS group was significantly higher than that in the other three groups ( $P<0.05$ ). LPS decreased breast muscle bundle area at E23 and 1 d, significantly decreased muscle bundle density at E15, significantly increased breast muscle bundle density at E23, and significantly decreased leg muscle bundle area at E15 and 1 d ( $P<0.05$ ). The expression levels of inflammatory factor-related genes (*IL-6*, *TNF-α*) and myoproliferative genes (*IGF-1*, *MyoD*) of goose embryo breast muscle significantly decreased in LPS injection group E15 ( $P<0.05$ ). At 1 d, *IGF-1* expression level significantly increased, and *Myogenin*, *Myh1* expression levels significantly decreased ( $P<0.05$ ).

收稿日期:2022-07-06

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2020B020222003);广州市科技计划基础与应用基础研究项目(202201010187);大学生创新创业训练计划项目(202211347012)

\*通信作者:张续劼,博士,副教授,主要研究方向为动物遗传育种与繁殖,E-mail:zhangxumeng@zhku.edu.cn。

0.05)。In LPS group, the expression levels of *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MyoD*, *Myogenin* and *Myh1* at E15 goose embryo leg muscle were significantly upregulated, while the expression levels of *IGF-1* were significantly downregulated ( $P < 0.05$ ). At 1 d, only *IL-6* and *Myogenin* genes in 100  $\mu\text{g}$  group showed significant upregulation ( $P < 0.05$ ). In terms of protein expression, the expression level of *TNF- $\alpha$*  protein in breast muscle significantly increased and the expression level of *MyoD* protein significantly decreased ( $P < 0.05$ ) at 1 d after injection of exogenous LPS. The protein expression levels of *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and *MyHC* in leg muscle significantly increased, while the protein expression level of *MyoD* significantly decreased ( $P < 0.05$ ). [Conclusions] Exogenous LPS could decrease the hatchability of goslings, significantly decrease the cross-sectional area of breast and leg muscle bundle, increase the expression levels of inflammatory factors, and decrease the expression levels of genes related to muscle proliferation, which was not conducive to the growth and development of myofibers of Magang goose embryos.

**Keywords:** Magang goose; lipopolysaccharide (LPS); embryo; breast and leg muscle

中国是世界肉鹅出栏量最大的国家<sup>[1]</sup>,广东省更是由于地理环境优势和食用水禽的传统,素有“水禽之乡”的美誉。近年来,随着鹅反季节繁殖技术的成功开发和积极推广,广东省鹅养殖业得到迅速发展,但也出现了一些问题,例如种鹅的产蛋量下降,种蛋受精率低,胚胎死亡率高<sup>[2]</sup>。目前业内普遍认为这些问题产生的主要原因在于夏季炎热的环境所导致的鹅场洗浴池中细菌和脂多糖(LPS)含量的增加<sup>[3-5]</sup>。

LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成成分,在细菌死亡或快速繁殖时被释放至细胞外。施振旦等<sup>[6]</sup>认为,由于夏季温度较高,导致洗浴池中细菌含量快速增加,进而造成水体中LPS含量增加,水体中的LPS会随种鹅饮水及在洗浴池中的活动等过程进入种鹅体内,并且进入种鹅消化道的细菌也会在分解后产生LPS,受LPS污染的种鹅繁殖性能明显降低,雏鹅的生长速度和免疫机能也显著下降。刘容珍等<sup>[7]</sup>对广东省内2家鹅场母鹅血浆内毒素含量检测,结果发现孵化率较低的鹅场种鹅血浆中LPS含量显著高于孵化率较高的鹅场,且活胚囊胚液中的内毒素水平明显低于死胚中的内毒素( $P < 0.05$ )。对其他禽类的研究也表明,细菌释放的LPS会对禽类生长性能造成不利影响<sup>[8]</sup>。目前LPS对鹅胚影响的研究主要集中在鹅胚孵化率降低和弱苗产生,较少关注LPS对鹅胚和雏鹅肌纤维发育和生长的影响。

胚胎期是脊椎动物肌肉发育的重要时期,禽类与其他脊椎动物肌纤维发育过程类似,在胚胎期时,肌纤维的数量就已经确定。出生后肌纤维数量将不再改变,出生后肌纤维的发育主要体现在肌纤维长度增加和直径增大<sup>[9]</sup>。骨骼肌的生长发育受到多种基因的调控,成肌调节因子MRF家族(*Myf5*、*MyoD*、*Myogenin*和*Myf4*)在肌生成中起着决定性的作用<sup>[10]</sup>。其中*MyoD*是决定肌细胞启动和形成的重要基因,*Myogenin*在成肌细胞的分化和肌纤维平衡的维持方面起重要作用<sup>[10]</sup>。肌球蛋白重链(MyHC)是肌球蛋白的基本组成单位,在保证细胞正常工作中发挥重要作用,主要功能是为肌球蛋白提供动力,而*Myh1*基因则承担着编码MyHC蛋白的作用<sup>[11]</sup>。肌纤维的生长发育还受其他基因的调控,如*IGF-1*能有效促进成肌细胞增殖及分化,从而促进骨骼肌再生<sup>[12]</sup>。除此之外,炎症因子也会影响肌肉的生长,目前主要认为炎症因子会促进成肌细胞的凋亡和肌管的萎缩<sup>[13-14]</sup>,但也有研究认为炎症因子*TNF- $\alpha$* 和*IL-6*可以促进成肌细胞的增殖,并影响受刺激卫星细胞的发育至分化的早期阶段<sup>[15]</sup>。

本研究通过在8胚龄鹅胚尿囊液中注射不同剂量的LPS模拟鹅胚受种鹅不同程度的LPS垂直污染水平,记录鹅胚孵化率,并通过检测一定时期胚胎期尿囊液和出生后雏鹅血清LPS含量,检测建模有效性。同时通过对鹅胚和雏鹅胸腿肌肌纤维束横截面积和密度,炎症和成肌相关基因和部分蛋白相对表达量的检测,探究外源性LPS对鹅胚肌纤维生长发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计与材料

试验所用鹅胚均购自广州文健明种鹅养殖有限公司,于入孵第8天(8胚龄,E8)第1次照蛋确定受精后,随机选取160只受精卵,随机分为4组,每组4个重复,每个重复10只鹅胚。照蛋后用铅笔画出气室边缘,用碘伏消毒蛋壳表面后,75%乙醇进行脱碘;用尖头镊子在气室边缘2~8 mm处轻轻钻一个小孔,避开血管并用注射器将100  $\mu\text{L}$ 分别含0、25、50、100  $\mu\text{g}$  LPS(Sigma, L2880, USA)的生理盐水分别注射到4组鹅胚的尿囊腔内。用石蜡封口后,再次放回孵化机内进行常规孵育(以上操作在超净台内无菌操作,并尽量在20 min内完成),记录孵化过程中的死胚数。于15胚龄(注射后7 d, E15)、23胚龄(注射后15 d, E23)和孵化后1日龄(1 d),每组随机选取6枚(只)鹅胚(雏鹅)采集尿囊液(血液),检测尿囊液(血清)

中 LPS 含量,取出胚胎(屠宰雏鹅)左侧约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 体积的胸腿肌放入 4%多聚甲醛中固定,留待 HE 染色,石蜡切片检测肌纤维横截面积和直径;采集右侧相同部位约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 体积的胸腿肌,立刻冻入液氮中运回实验室后置于-80 °C 超低温冰箱保存,留待检测相关基因和蛋白表达量。

### 1.2 尿囊液和血清 LPS 含量测定

将血液常温放置 30 min,离心后取血清进行相关检测。采用鲎试剂法测定尿囊液和血清中 LPS 含量。所有检测步骤均按厦门鲎试剂生物科技有限公司 EC80545S 试剂盒说明书规范操作。其中 E15 和 E23 由于胚胎血液较少,故检测尿囊液的内毒素含量,1 日龄雏鹅检测血清的内毒素含量。

### 1.3 HE 染色及肌束横截面积和密度统计

HE 染色步骤:将肌肉样品放入 4%多聚甲醛并放置 24~48 h 进行组织固定;脱水,70%乙醇(2 h)→80%乙醇(2 h)→95%乙醇(30 min)→无水乙醇(2.5 h)→50%无水乙醇+50%透明剂(30 min)→透明剂(2.5 h)→50%透明剂+50%石蜡(30 min)→石蜡(5 h);将脱水后的组织放入钢包埋盒中,用包埋机加入融化的石蜡,在制冷平台上凝固成蜡块;将蜡块固定在石蜡切片机上切片,厚度 4 μm;将漂浮在 37 °C 水面上的切片置于载玻片正中位置,随后放在 50 °C 烘片机上烘干;将有石蜡切片的载玻片放入透明剂中脱蜡 10 min;将载玻片依次在 100%、95%、85%、70%、50%的乙醇以及 PBS 和纯水中各浸泡并振荡 2 min;将载玻片放入苏木素中 1~5 min,纯水冲洗 1 min,加入活化剂 30 s,纯水冲洗 1 min,伊红染色 0.5~2 min,自来水冲洗 1 min;玻片自然风干后滴 20 μL 中性树脂于载玻片标本中心,用镊子盖上载玻片。用正置荧光显微镜(ZEISS,ImagerZ1)观察并拍摄图片。

利用 Image-Pro Plus 6.0(Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA)软件统计 HE 染色胸腿肌横切面图片。每张切片随机挑选至少 3 个 400 倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野。保证每张照片的背景光一致。每张切片随机挑选 6 个肌纤维束,测量肌纤维束的面积(mm<sup>2</sup>),求出平均值。统计每个视野中的纤维束数,测量肌纤维束的总横截面积(mm<sup>2</sup>),求出单位面积内肌纤维束密度(mm<sup>-2</sup>)。

### 1.4 qPCR 分析

用 Trizol(Thermo, USA)法提取样品总 RNA。利用凝胶成像分析仪(Bio-Bad)以及核酸蛋白仪测定 RNA18S 与 28S 条带亮度以及 RNA 在 260 和 280 nm 下吸光度值并计算两者的比值,初步判定质量并记录总 RNA 浓度与纯度。利用反转录试剂盒(TOYOBO, FSQ-301, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA,置于-20 °C 保存备用。选用 GAPDH 作为内参基因,引物见表 1。实时荧光定量(qPCR)反应体系(20 μL):cDNA 1.0 μL,上、下游引物(10 pmol·L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL,SYBR Green Real-time PCR Master Mix(5×)10 μL, RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至总体积为 20 μL。扩增程序:95 °C 5 min;95 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C 15 s,共 45 个循环;同时以溶解曲线分析扩增产物的特异性,扩增程序:95 °C 15 s,60 °C 1 min;95 °C 15 s,60 °C 15 s。每个样本重复 3 次,取平均值。定量结果根据 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>法进行计算。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature
<i>Myh1</i>	F: CTCCTCACGCTTTGGTAAAT/R: GCTCTGGCTTCTTGTGGAC	55
<i>MyoD</i>	F: AAGGCGTGCAAGAGGAAGAC/R: TGCTTGGGTTGCTGGA	55
<i>Myogenin</i>	F: CCCGAGCACTGCCCCGGCAAT/R: CGCTCTGCTGTTGAGGCTGCTG	55
<i>GAPDH</i>	F: TCTGTCTGGACCTGACCTGC/R: GCCAGCACCCGCATCAAA	60
<i>IGF-1</i>	F: AGGTCGTCCATCGTAGTCCTTGCACCTTTAAGAAGCAATGGA/ R: ACAGCGTCGTTATCGTTCCTGCAAACAGGCCAAGGTAG	55
<i>IL-6</i>	F: TTCGACGAGGAGAAATGCTT/R: CCTTATCGTCTGCCAGAT	55
<i>TNF-α</i>	F: ATGAACCCTCCTCCGTACAC/R: AGAGGCCACCACATGATAGC	60

### 1.5 Western blot 分析

将 1 日龄雏鹅的胸腿肌组织于冰上剪取约 60 mg,加入 600 μL 含有 1%蛋白酶抑制剂混合物(碧云天,P1006)的 RIPA 强力裂解液(碧云天,P0013B),于组织破碎仪中破碎混匀,低温下 10 000 g 离心 15 min,收集上清液,BCA 试剂盒(碧云天)检测蛋白浓度并进行调平,分装置于-80 °C 备用。蛋白在离心管中与 6×蛋白上样缓冲液(碧云天,P0015F)于 100 °C 金属浴变性 10 min。以 20 μg 蛋白/泳道上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,电转膜至聚偏二氟乙烯膜(PVDF);50 g·L<sup>-1</sup>脱脂奶

粉室温振荡封闭 1 h,分别加入检测目标一抗(抗体见表 2),4 °C 冰箱孵育过夜,PBST 振荡清洗 3 次,每次 5 min;加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,37 °C 摇床孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次;电化学发光(ECL)试剂盒行曝光约 2 min,待蛋白条带显色清晰时,立刻拍摄照片,记录试验结果,根据光密度分析蛋白表达水平。

表 2 所用抗体信息

Table 2 Antibody information

抗体名称 Name of antibody	品牌 Brand	货号 Lot number	稀释比例 Dilution ratio
GAPDH	艾博抗(上海)贸易有限公司	ab181602	1:10 000
MyoD	艾博抗(上海)贸易有限公司	ab16148	1:10 000
TNF- $\alpha$	沈阳万类生物科技有限公司	WL01581	1:1 000
IL-6	艾博抗(上海)贸易有限公司	ab9324	1:10 000
MyHC	西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司	M4276	1:10 000
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H&L)	艾博抗(上海)贸易有限公司	ab97023	1:10 000
HRP 标记山羊抗兔 IgG(H&L)	沈阳万类生物科技有限公司	WLA023a	1:1 000

## 1.6 数据分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件统计分析数据,试验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。使用 Duncan's 多重比较法进行同一日龄内不同处理组间的差异性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 注射外源性 LPS 对鹅胚孵化率和尿囊液(血清)LPS 含量的影响

随着注射 LPS 剂量的增加,鹅胚的孵化率持续降低(图 1-A)注射 LPS 会导致鹅胚尿囊液中 LPS 含量升高,在注射后 7 d(E15),4 组鹅胚尿囊液 LPS 含量随注射剂量的增加而增加。在注射后 15 d(E23),100  $\mu$ g 组鹅胚尿囊液 LPS 含量极显著高于其他 3 组( $P<0.01$ )。在雏鹅出壳当天即 1 日龄(1 d),4 组鹅血清 LPS 含量随注射剂量的增加而增加,但未达到显著性差异(图 1-B)。

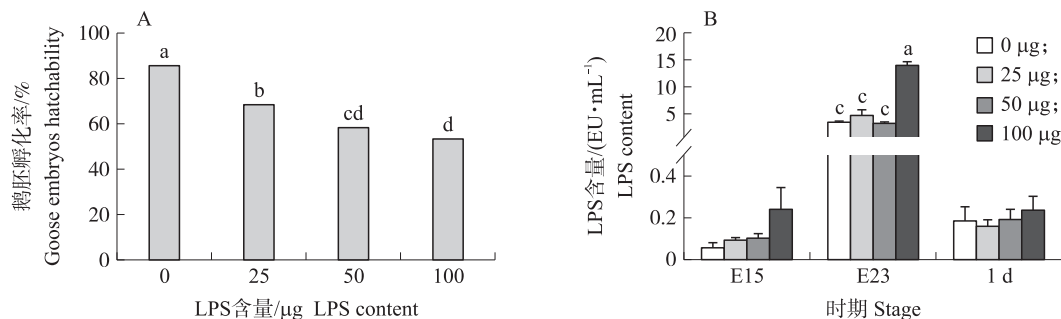


图 1 注射外源性 LPS 对鹅胚孵化率(A)和尿囊液(血清)LPS 含量(B)的影响

Fig. 1 Effects of exogenous LPS injection on hatchability of goose embryos(A) and LPS content(B) in allantoic fluid (or serum) of goose embryos

A. 鹅胚孵化率( $n=40$ );B. 鹅胚尿囊液(血清)LPS 含量( $n=6$ ),E15、E23 和 1 d 表示 15 日龄、23 日龄和 1 日龄雏鹅。同一日龄中,连续小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不连续小写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

A. Hatchability of goose embryos( $n=40$ );B. LPS content in goose embryo allantoic fluid(or serum)( $n=6$ ). E15, E23 and 1 d indicate 15, 23 embryo age and 1 day-old age gosling. At the same day of age, the adjacent lowercase letter indicates significant difference ( $P<0.05$ ), and the non-adjacent lowercase letter indicates extremely significant difference ( $P<0.01$ ). The same below.

### 2.2 注射外源性 LPS 对鹅胚肌纤维束横截面积和密度的影响

对 4 组鹅胚胸肌肌纤维 HE 染色分析结果发现,在 E15 时,4 组雏鹅肌束横截面积差异均不显著。但 100  $\mu$ g 组肌束密度显著低于 0  $\mu$ g(对照)组( $P<0.05$ )。E23 时,胸肌肌束横截面积随注射 LPS 剂量的增加而降低,其中 50 和 100  $\mu$ g 组显著低于 0  $\mu$ g 组( $P<0.05$ ),肌束密度则为 100  $\mu$ g 组极显著高于其他 3 组( $P<0.01$ )。1 d 时,100  $\mu$ g 组肌束横截面积显著低于 25 和 50  $\mu$ g 组( $P<0.05$ )(图 2)。对 4 组鹅胚腿肌纤维 HE 染色分析结果发现,在试验的 3 个时期,4 组鹅胚(雏鹅)腿肌肌束密度均无显著性差异。而鹅胚(雏鹅)腿肌肌束的面积在 E15 时,25  $\mu$ g 组显著高于 50 和 100  $\mu$ g 组( $P<0.05$ );1 d 时,25、50 和 100  $\mu$ g 组肌束面积积极显著低于 0  $\mu$ g 组( $P<0.01$ )。

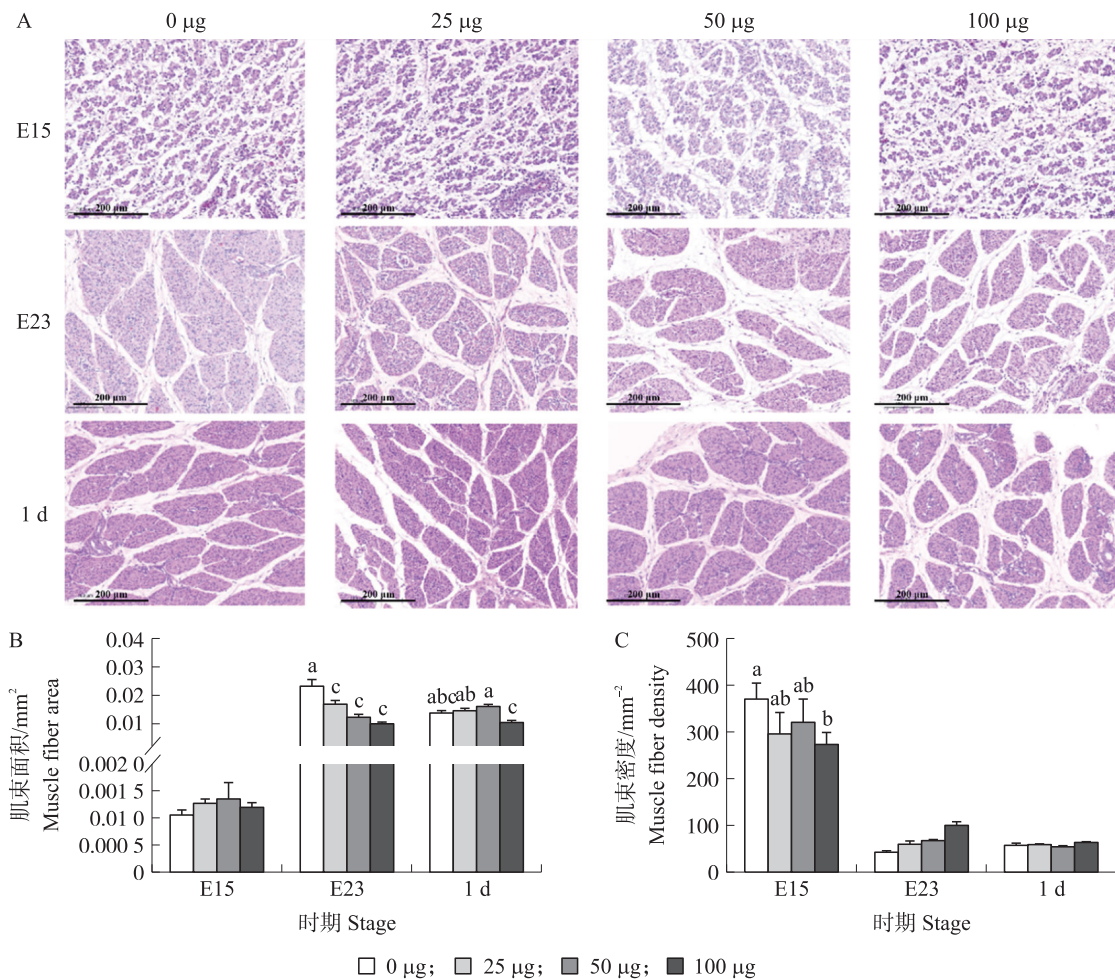


图 2 注射不同剂量 LPS 对鹅胚(雏鹅)胸肌纤维 HE 染色(A)以及肌束横截面积(B)和密度(C)的影响

Fig. 2 Effect of injection different doses of LPS on HE staining(A) and cross-sectional area(B) and density(C) of the breast muscle fibers of goose embryos(gosling)

### 2.3 注射外源性 LPS 对鹅胚(雏鹅)胸腿肌炎症和成肌基因相对表达量的影响

对 4 组鹅胚(雏鹅)胸肌炎症和成肌相关基因表达量检测结果显示:炎症因子 *IL-6* 基因表达量在 E15 时随 LPS 注射剂量增加而下降( $P < 0.05$ ); *TNF- $\alpha$*  基因在 E15 和 E23 时, LPS 组鹅胚表达量低于对照组, 50  $\mu\text{g}$  组除外( $P < 0.05$ ); 1 d 时, 25  $\mu\text{g}$  组显著高于 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ) (图 4-A)。增殖相关基因 *IGF-1* 表达量在 E15 时, 25 和 100  $\mu\text{g}$  组显著低于 0 和 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), 1 d 时, 100  $\mu\text{g}$  组显著高于 25  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ); *MyoD* 在 E15 时, 50  $\mu\text{g}$  组表达量显著高于 0、25 和 100  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), 但 100  $\mu\text{g}$  组显著低于 0、25 和 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ); 在 1 d 时, 25  $\mu\text{g}$  组显著高于 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ) (图 4-B)。成肌分化相关基因 *Myogenin* 表达量在 E15 时, 25  $\mu\text{g}$  组显著低于 0 和 100  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), E23 和 1 d 时, LPS 组均低于对照组, 仅在 1 d 时达到显著性差异; *Myh1* 基因在 E15 时, 表达量随 LPS 注射剂量增加而下降, 且 100  $\mu\text{g}$  组显著低于 0 和 25  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ) (图 4-C)。

对 4 组鹅胚(雏鹅)腿肌炎症和成肌相关基因表达量检测结果显示:与对照组(0  $\mu\text{g}$  组)相比, 炎症因子 *IL-6* 基因表达量在 E15 时无明显趋势和差异; E23 时, 25  $\mu\text{g}$  组显著高于 0  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), 1 d 时, 100  $\mu\text{g}$  组显著高于 0、25 和 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ); *TNF- $\alpha$*  基因表达量在 E15 时, 随 LPS 剂量增加而增加, 且 100  $\mu\text{g}$  组显著高于 0 和 25  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), E23 时, 25  $\mu\text{g}$  组显著高于 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ) (图 5-A)。*IGF-1* 基因表达量在 E15 时, LPS 组低于 0  $\mu\text{g}$  组, 且 25  $\mu\text{g}$  组显著低于 0  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), 1 d 时, 100  $\mu\text{g}$  组显著低于 0  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ); *MyoD* 基因表达量在 E15 时, LPS 组高于 0  $\mu\text{g}$  组, 且 50 和 100  $\mu\text{g}$  组显著高于 0  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ), E23 时, 100  $\mu\text{g}$  组 *MyoD* 基因表达量显著高于 0、25 和 50  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ) (图 5-B)。*Myogenin* 基因表达量在 E15 时, 随 LPS 剂量增加而增加( $P < 0.05$ ), 1 d 时, 100  $\mu\text{g}$  组显著高于 0  $\mu\text{g}$  组( $P < 0.05$ ); *Myh1* 基因表达量在 E15 时, 随 LPS 剂量增加而增加( $P < 0.05$ ) (图 5-C)。

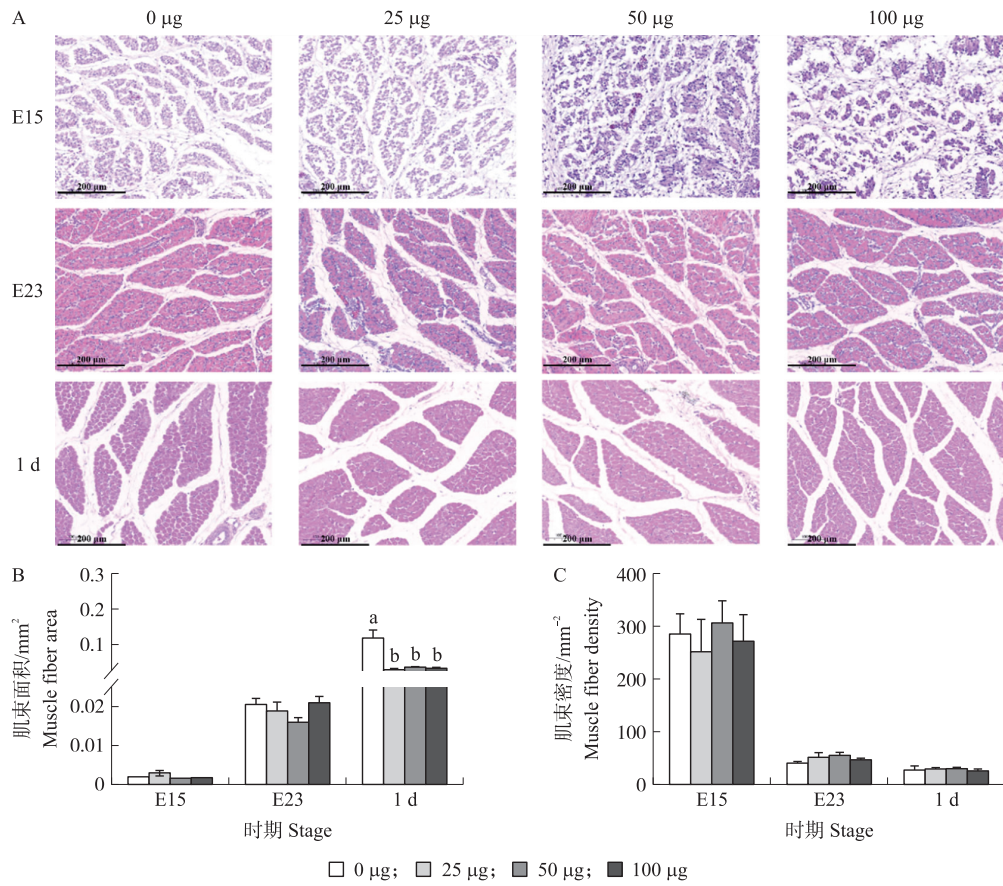


图 3 注射不同剂量 LPS 对鹅胚(雏鹅)腿肌 HE 染色(A)以及肌束横截面积(B)和密度(C)的影响  
 Fig. 3 Effect of injection different doses of LPS on HE staining(A) and cross-sectional area(B) and density(C) of the leg muscle fibers of goose embryos(gosling)

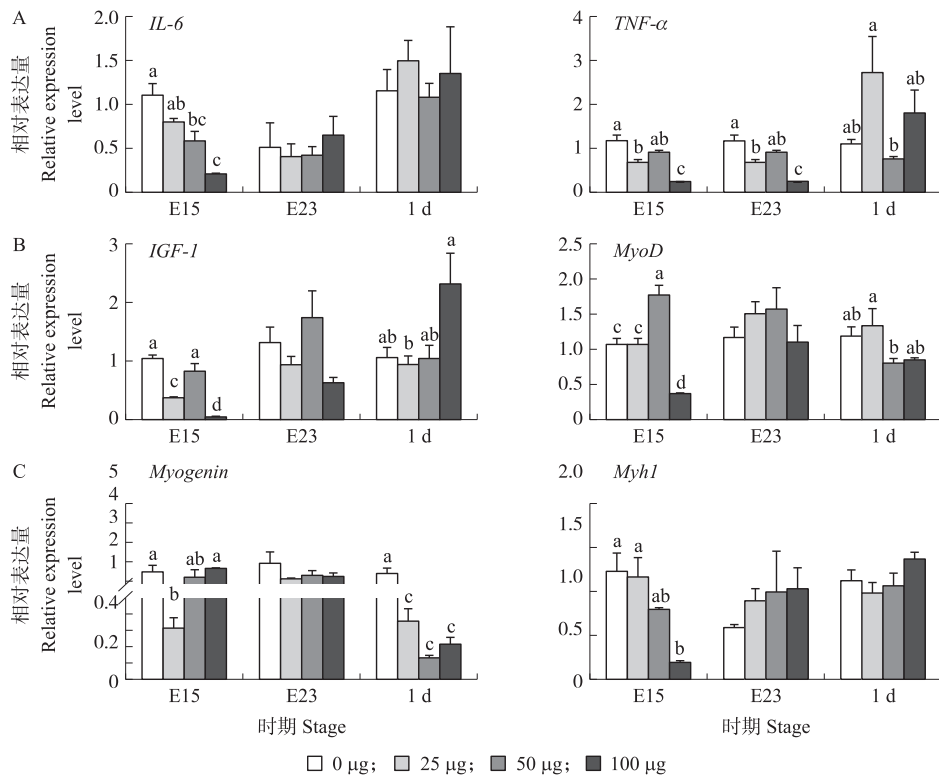


图 4 注射不同剂量 LPS 对鹅胚(雏鹅)胸肌炎症因子(A)、增殖(B)和成肌分化(C)相关基因表达的影响  
 Fig. 4 Effect of injection of different doses of LPS on the expression of inflammatory factors(A), proliferation(B) and myogenic differentiation(C) related genes in breast muscle of goose embryo(gosling)

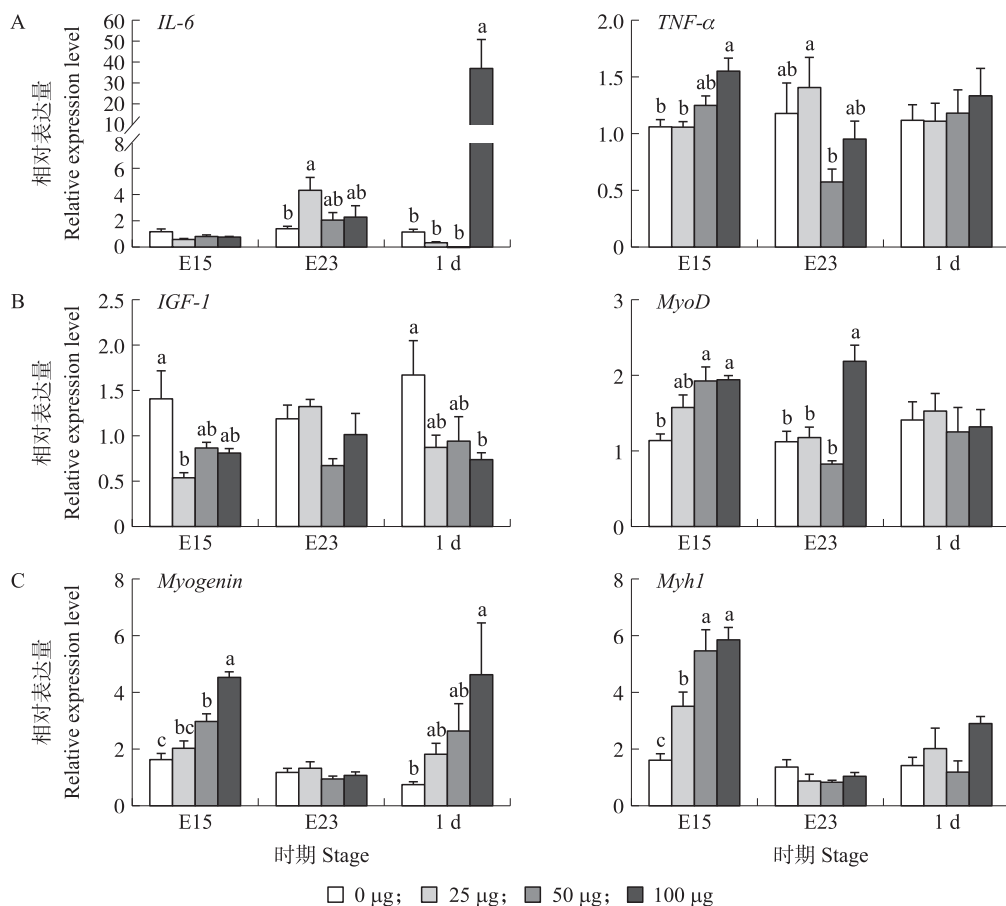


图 5 注射不同剂量 LPS 对鹅胚(雏鹅)腿肌炎症因子(A)、增殖(B)和成肌分化(C)相关基因表达的影响

Fig. 5 Effect of injection of different doses of LPS on the expression of inflammatory factors(A), proliferation(B) and myogenic differentiation(C) related genes in leg muscle of goose embryo (gosling)

2.4 注射外源性 LPS 对雏鹅胸腿肌炎症和成肌相关蛋白表达量的影响

注射不同浓度 LPS 组 1 日龄雏鹅胸肌炎症和成肌相关蛋白表达量检测结果显示:在胸肌中未检测到炎症因子 IL-6 蛋白(图 6)。而炎症因子 TNF-α 蛋白表达量随 LPS 注射剂量增加而增加,且 50 和 100 μg 组显著高于 0 μg 组(P<0.05)。LPS 组雏鹅胸肌 MyoD 蛋白表达量低于 0 μg 组,且 50 μg 组显著低于 0 μg 组(P<0.05)。各处理组 MyHC 表达量无明显差异。

注射不同浓度 LPS 组雏鹅腿肌炎症和成肌相关蛋白表达量检测结果显示:1 日龄雏鹅 100 μg 组腿肌 IL-6 蛋白表达量显著高于 0、25 和 50 μg 组(P<0.05)(图 7)。TNF-α 蛋白表达量则是 50 μg 组显著高于 0 μg 组(P<0.05)。100 μg 组 MyoD 表达量显著低于其他 3 组(P<0.05)。MyHC 表达量则为 25、50 和 100 μg 组显著高于 0 μg 组(P<0.05)。

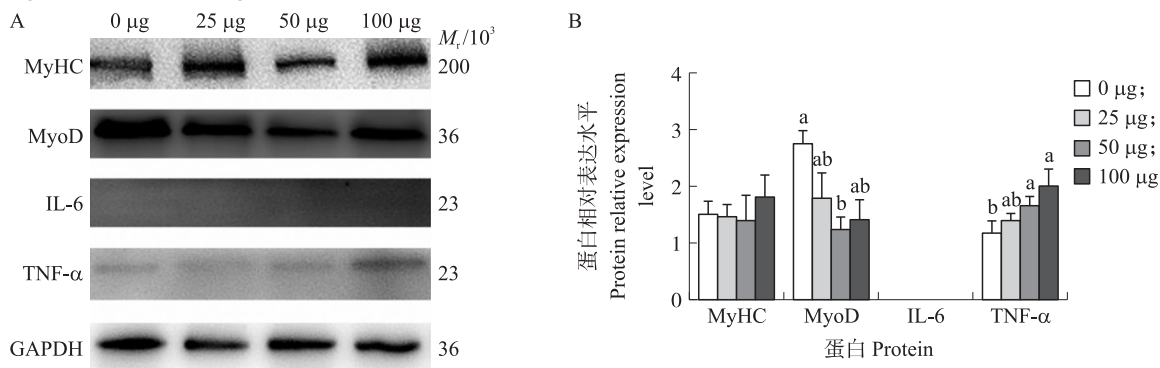


图 6 注射不同剂量 LPS 的雏鹅胸肌炎症因子和成肌相关蛋白的 Western blot 分析(A)和表达水平(B)

Fig. 6 Western blot analysis(A) and expression level(B) of breast muscle fibromyoinflammatory factor and myoblast associated protein in goose goslings injected different doses of LPS

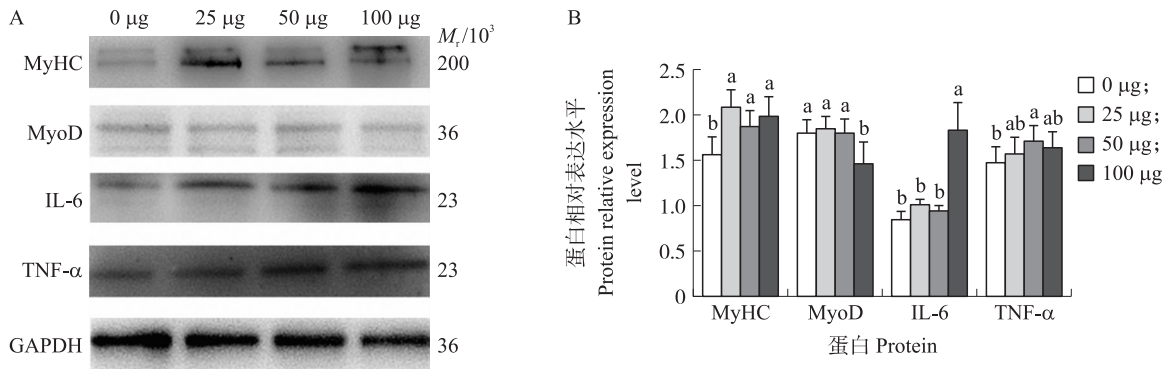


图 7 注射不同剂量 LPS 的雏鹅腿肌炎症因子和成肌相关蛋白的 Western blot (A) 分析和表达水平 (B)

Fig. 7 Western blot analysis (A) and expression level (B) of leg muscle fibromyoinflammatory factor and myoblast associated protein in goose goslings injected different doses of LPS

### 3 讨论

LPS 可通过激活单核巨噬细胞来释放一系列炎症细胞因子 (IL-6 和 TNF- $\alpha$  等), 引起全身性炎症反应。因此 LPS 刺激常用于构建免疫应激模型。种鹅血液中 LPS 会垂直污染受精卵, 从而影响鹅胚孵化率<sup>[16-17]</sup>。在孵育第 25 天死亡或发育迟缓的鹅胚胎尿囊液中含有大量 LPS, 而正常发育的胚胎中的 LPS 含量可忽略不计<sup>[17]</sup>。此外, 研究发现, LPS 作为一种脂溶性分子, 通过饮水或细菌进入鹅体内和血液后, 容易随甘油三酯或卵黄物质沉积到发育中的卵泡中, 从而进入所产种蛋内, 在孵化时危害胚胎造成死亡, 降低种蛋受精率和孵化率<sup>[18]</sup>。在广东省台山市 2 家活胚率差异明显的鹅场中发现, 2 家鹅场的活胚囊胚液中的内毒素水平均明显低于各自死胚中的内毒素水平 ( $P < 0.05$ )<sup>[7]</sup>。本试验结果显示, 注射 LPS 导致鹅胚孵化率随注射剂量增加而降低, 这与江丹莉等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。对鹅胚尿囊液 LPS 检测结果表明, 死亡率较高的组鹅胚尿囊液含量较高。上述结果也与生产中的实际情况相符。

Frost 等<sup>[19]</sup>用 LPS 处理 C2C12 小鼠成肌细胞的结果表明, LPS 能诱导成肌细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子 mRNA 表达量上升并分泌 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白。本研究中, 各处理组炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量无显著差异, 但注射 LPS 组雏鹅胸腿肌纤维中 TNF- $\alpha$  蛋白相对表达量显著升高。研究表明, 受 LPS 刺激后, 肌纤维 (成肌细胞) 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达量在 LPS 刺激 1~4 h 显著上升, 但后期追踪时, 炎症因子 mRNA 表达量均回落至正常水平<sup>[14,20]</sup>。说明炎症因子 mRNA 的表达具有瞬时性。因此这可能是本试验所在的时间点, IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达量无明显变化的主要原因。

Orellana 等<sup>[21]</sup>对仔猪注射 LPS 建立疾病模型的结果显示, LPS 导致仔猪背最长肌和腓肠肌中蛋白质含量下降。本课题组前期研究发现, 高浓度外源性 LPS 会导致山麻鸭雏鸭的采食量下降, 体重显著降低, 并显著抑制肌纤维的发育<sup>[22]</sup>。与该结果相似, 本研究中胚胎期注射 LPS 会导致鹅胚肌束横截面积和密度呈现一定的剂量依赖性降低。这说明 LPS 不利于鹅胚肌纤维的生长和发育。Yang 等<sup>[23]</sup>也发现, 雏鹅血清中 LPS 含量较低组胸肌率和腿肌率较高。但注射 LPS 组 1 日龄雏鹅腿肌纤维 MyHC 蛋白相对表达量显著高于对照组, 这与该时期成肌分化相关基因相对表达量的上升相一致。有研究显示, 炎症因子可以促进成肌细胞的凋亡和增殖<sup>[24]</sup>。因此, 结合本研究炎症因子表达量变化的情况, 较高的结构蛋白 MyHC 相对表达量可能是由于炎症因子蛋白促进了成肌细胞的增殖, 从而引起更多成肌细胞的分化, 但具体影响机制有待进一步验证。

综上所述, 马冈鹅受精卵受 LPS 污染会导致雏鹅孵化率降低, 肌纤维发育受阻, 不利于雏鹅生产性能的提高, 损害养殖户利益。因此, 在生产实际中, 应降低种鹅养殖环境中的 LPS 浓度, 避免 LPS 污染种鹅进而污染受精卵, 从而有助于雏鹅生长性能的提高。

#### 参考文献 References:

- [1] 侯水生, 刘灵芝. 2020 年水禽产业现状、未来发展趋势与建议[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(3): 235-239.  
Hou S S, Liu L Z. Present situation, future development trend and suggestions of waterfowl industry in 2020[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(3): 235-239 (in Chinese with English abstract).
- [2] 林晓萍, 陈玉莲, 龚呈, 等. 肉毒素对鹅繁殖性能的影响[J]. 广东农业科学, 2009, 36(9): 161-163.

- Lin X P, Chen Y L, Gong C, et al. Effects of endotoxin on reproductive performance of goose[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2009, 36(9): 161-163 (in Chinese with English abstract).
- [3] 刘丽, 李炎明, 许爱红, 等. 抑制鸭水体有害细菌和内毒素污染对肉鸭生长性能的影响研究[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(5): 59-65.  
Liu L, Li Y M, Xu A H, et al. Effects of inhibiting water enterobacteria and LPS contaminations on duck growth performance[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2015, 36(5): 59-65 (in Chinese with English abstract).
- [4] 李少雄, 吴鑫, 刘容珍. 种鹅血液内毒素水平与产蛋、受精率及胚胎成活率的关系[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(15): 54-56.  
Li S X, Wu X, Liu R Z. Relationship between blood endotoxin level and egg laying, fertilization rate and embryo survival rate in breeding geese[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2010(15): 54-56 (in Chinese with English abstract).
- [5] Hoekstra D, van der Laan J W, de Leij L, et al. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 455(3): 889-899.
- [6] 施振旦, 刘丽, 孙爱东. “禽-鱼”高密度养殖对水禽生产性能危害的研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(13): 1-3.  
Shi Z D, Liu L, Sun A D. Study on the harm of “bird-fish” high-density culture to waterfowl production performance[J]. China Poultry, 2011, 33(13): 1-3 (in Chinese with English abstract).
- [7] 刘容珍, 田允波, 施振旦, 等. 内毒素对鹅胚胎发育的影响[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(2): 56-59.  
Liu R Z, Tian Y B, Shi Z D, et al. Effects of endotoxin on embryo development in goose[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology, 2009, 22(2): 56-59 (in Chinese with English abstract).
- [8] 万江虹, 马龙, 谢礼裕. 大肠杆菌内毒素引起肉鸡腹水症的诊治[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(4): 57-58.  
Wan J H, Ma L, Xie L Y. Diagnosis and prevention of broiler ascites caused by *Escherichia coli* endotoxin[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2001, 21(4): 57-58 (in Chinese with English abstract).
- [9] Patel K, Christ B, Stockdale F E. Control of muscle size during embryonic, fetal, and adult life[J]. Results and Problems in Cell Differentiation, 2002, 38: 163-186.
- [10] Parker M H, Seale P, Rudnicki M A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis[J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(7): 497-507.
- [11] Ghosh M, Sodhi S S, Sharma N, et al. An integrated in silico approach for functional and structural impact of non-synonymous SNPs in the MYH1 gene in Jeju Native Pigs[J]. BMC Genetics, 2016, 17(1): 35.
- [12] Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [13] Baker L A, Martin N R W, Kimber M C, et al. Resolvin E1 (Rv E1) attenuates LPS induced inflammation and subsequent atrophy in C2C12 myotubes[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(7): 6094-6103.
- [14] Frost R A, Nystrom G J, Lang C H. Endotoxin (LPS) stimulates the expression of proinflammatory cytokines in c2c12 myoblasts[J]. Shock, 2002, 17(Supplement): 16.
- [15] Dziki J L, Velayutham M, Hussey G S, et al. Cytokine networks in immune-mediated muscle regeneration[J]. Journal of Immunology and Regenerative Medicine, 2018, 1: 32-44.
- [16] 杨宁. 家禽生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.  
Yang N. Poultry Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002 (in Chinese).
- [17] Jiang D L, Liu L, Wang C, et al. Raising on water stocking density reduces geese reproductive performances via water bacteria and lipopolysaccharide contaminations in “geese-fish” production system[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10: 1459-1466.
- [18] 江丹莉, 刘丽, 陈芳, 等. 细菌内毒素对肉鹅生长性能及免疫机能的影响研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(7): 10-15.  
Jiang D L, Liu L, Chen F, et al. Effects of LPS on growth performance and immune function in meat geese[J]. China Poultry, 2011, 33(7): 10-15 (in Chinese with English abstract).
- [19] Frost R A, Nystrom G J, Lang C H. Endotoxin and interferon-gamma inhibit translation in skeletal muscle cells by stimulating nitric oxide synthase activity[J]. Shock (Augusta, Ga), 2009, 32(4): 416-426.
- [20] 李先根, 汪洋, 王秀英, 等. 脂多糖刺激对断奶仔猪肌肉炎症和蛋白质降解相关基因表达的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(4): 74-77.  
Li X G, Wang Y, Wang X Y, et al. Effects of lipopolysaccharide challenge on genes related to muscle inflammation and protein degradation of weaned piglets[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2019, 55(4): 74-77 (in Chinese with English abstract).
- [21] Orellana R A, O'Connor P M J, Nguyen H V, et al. Endotoxemia reduces skeletal muscle protein synthesis in neonates[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2002, 283(5): E909-E916.
- [22] 张续勤, 黎颂超, 蔡颖宇, 等. 外源性脂多糖对山麻鸭雏鸭生长、血清激素、肝、脾及肌纤维发育的影响[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(10): 35-41.  
Zhang X M, Li S C, Cai Y Y, et al. Effect of exogenous LPS on growth, serum hormone, liver, spleen and myofiber development of Shanma duckling[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(10): 35-41 (in Chinese with English abstract).
- [23] Yang X W, Liu L, Jiang D L, et al. Improving geese production performance in “goose-fish” production system by competitive reduction of pathogenic bacteria in pond water[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(6): 993-1001.
- [24] 黄政渊. IGF-I 和 TNF- $\alpha$  对 C2C12 骨骼成肌细胞增殖、分化和凋亡的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2004.  
Huang Z Y. Effects of IGF-I and TNF- $\alpha$  on proliferation, differentiation and apoptosis of C2C12 skeletal myoblasts[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2004 (in Chinese with English abstract).