



阿司匹林丁香酚酯对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢氧化应激和炎症反应预防作用

葛闻博, 言 凯, 杨亚军, 刘希望, 许 笑, 李世宏, 白莉霞, 秦 哲, 李 准, 李剑勇*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 农业农村部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药工程重点实验室, 兰州 730050)

摘 要: 旨在探讨阿司匹林丁香酚酯(aspirin eugenol ester, AEE)对脂肪肝出血综合征(fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS)蛋鸡卵巢氧化应激和炎症反应的预防作用。选取65羽健康的160日龄海兰褐蛋鸡,随机分为5组,每组13羽。空白对照组(Control)饲喂基础日粮;模型组(high-energy low-protein diet, HELP)和低、中、高剂量AEE给药组(AEE-L、AEE-M、AEE-H)均饲喂高能低蛋白日粮,并根据蛋鸡体重,分别在高能低蛋白日粮中添加0、25、50、100 mg·kg⁻¹阿司匹林丁香酚酯。结果显示,相较于Control组,HELP组蛋鸡卵巢有明显的大小不等的脂肪空泡;相较于HELP组,AEE组卵巢组织脂肪空泡数量显著减少。相较于Control组,HELP组蛋鸡卵巢中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性显著降低,丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平显著升高($P<0.05$);相较于HELP组,不同剂量AEE组SOD、CAT、GSH活性显著增加,MDA水平显著减少($P<0.05$),SOD和CAT mRNA转录显著升高($P<0.05$)。相较于Control组,HELP组蛋鸡卵巢中抗氧化相关基因和蛋白,如核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)、醌氧化还原酶1(NADPH: Quinone Oxidoreductase1, NQO1)、血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)表达显著降低,ke1ch样ECH关联蛋白1(ke1ch-like ECH-associated protein 1, Keap1)表达显著升高($P<0.05$);相较于HELP组,不同剂量AEE组Nrf2、NQO1、HO-1基因和蛋白表达显著升高,Keap1表达显著降低($P<0.05$)。相较于Control组,HELP组蛋鸡卵巢中炎性因子白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)mRNA转录显著升高,炎症相关基因和蛋白(toll-like receptor 4, TLR4)、核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、磷酸化p65(phosphorylated p65, p-p65)表达显著增加($P<0.05$);相较于HELP组,不同剂量AEE组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TLR4、NF- κ B基因转录显著减少,p-p65蛋白表达显著降低($P<0.05$)。综上,蛋鸡脂肪肝出血综合征可导致卵巢发生氧化应激和炎症反应;高能低蛋白日粮中添加不同剂量AEE对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢损伤均有一定的预防效果。

关键词: 阿司匹林丁香酚酯;蛋鸡脂肪肝出血综合征;卵巢;氧化应激;炎症

中图分类号: S859.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1099-11

Preventive Effects of Aspirin Eugenol Ester on Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Ovaries of Hens with Fatty Liver Hemorrhagic Syndrome

GE Wenbo, YAN Kai, YANG Yajun, LIU Xiwang, XU Xiao, LI Shihong, BAI Lixia, QIN Zhe, LI Zhun, LI Jianyong*

(Key Laboratory of New Animal Drug Project of Gansu Province, Key Laboratory of Veterinary

收稿日期: 2025-04-30

基金项目: 甘肃省科技计划资助(25ZDNA003;25JRRA456);国家自然科学基金青年基金(32402950);兰州市青年科技人才创新项目(2024-QN-54)

作者简介: 葛闻博,主要从事药理毒理学研究, E-mail: gewenbo@caas.cn; Tel: 0931-2117168

* 通信作者: 李剑勇,主要从事药理毒理学研究, E-mail: lijy1971@163.com

Pharmaceutical Development of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: This study aimed to investigate preventive effects of aspirin eugenol ester (AEE) on oxidative stress and inflammatory response in the ovaries of hens with fatty liver hemorrhagic syndrome (FLHS). A total of sixty-five 160-day-old Hy-Line Brown laying hens were randomly assigned to five groups, each containing 13 hens. The control group (Control) was fed a basal diet, while the model group (high-energy low-protein diet, HELP) and low-, medium-, and high-dose AEE treatment groups (AEE-L, AEE-M, AEE-H) were all fed a high-energy low-protein diet supplemented with 0, 25, 50, and 100 mg·kg⁻¹ aspirin eugenol ester, respectively. The results showed that, compared with the control group, the ovaries of laying hens in the HELP group exhibited distinct lipid vacuoles of varying sizes. In contrast, the number of lipid vacuoles in the ovarian tissue was significantly reduced in the AEE-treated groups compared with the HELP group. Compared with the control group, the activities of SOD, GSH, and CAT in the ovaries of hens in the HELP group were significantly decreased, while the level of MDA was significantly increased ($P < 0.05$). In contrast, AEE treatment groups demonstrated significantly enhanced SOD, CAT, and GSH activities and reduced MDA levels and significantly upregulated *SOD* and *CAT* mRNA transcription compared with the HELP group ($P < 0.05$). Compared with the Control group, the expression levels of antioxidant-related genes and proteins Nrf2, NQO1, and HO-1 were significantly decreased in the ovaries of hens in the HELP group, while the expression of Keap1 was significantly increased ($P < 0.05$). In contrast, the AEE-treated groups showed significantly increased expression of Nrf2, NQO1, and HO-1 and decreased expression of Keap1 compared with the HELP group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA transcription levels of inflammatory cytokines *IL-1 β* , *IL-6*, and *TNF- α* were significantly increased in the ovaries of hens in the HELP group. In addition, the expression levels of inflammation-related genes and proteins-including TLR4, NF- κ B, and p-p65 were also significantly elevated ($P < 0.05$). In contrast, AEE treatment groups exhibited significantly reduced expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *TLR4* and *NF- κ B* genes, along with significantly decreased p-p65 protein expression compared to the HELP group ($P < 0.05$). In summary, fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens can induce ovarian oxidative stress and inflammatory responses. Supplementation with varying doses of AEE demonstrated preventive effects against ovarian damage in laying hens with fatty liver hemorrhagic syndrome.

Keywords: aspirin eugenol ester; fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens; ovary; oxidative stress; inflammation

* **Corresponding author:** LI Jianyong, E-mail: lijy1971@163.com

蛋鸡脂肪肝出血综合征 (FLHS) 是笼养高产蛋鸡常见的营养代谢性疾病, 其可由环境、遗传、激素、营养等因素诱发^[1-2]。蛋鸡 FLHS 是一种多系统疾病综合征, 可导致肝、卵巢、肾和肠道出血及脂质沉积, 甚至引起蛋鸡死亡^[3-4]。代谢紊乱、氧化应激和炎症反应可能是脂肪肝疾病的相关机制^[4-5]。蛋鸡 FLHS 最显著的特征是产蛋率骤降和产蛋高峰期严重缩短, 给蛋鸡养殖业造成巨大的经济损失^[6]。

研究表明, 蛋鸡 FLHS 还会引发卵泡闭锁、卵巢氧化应激和炎症反应^[5, 7-8]。卵巢是促进蛋鸡排卵产蛋的主要器官, 其功能障碍会导致产蛋量和蛋品质显著下降^[9-10]。因此, 改善卵巢功能对维持蛋鸡生产性能具有积极意义。

当机体受到各种有害刺激时, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 生成增加, 导致体内动态氧化还原平

衡被破坏,这种失衡进而促进动脉粥样硬化、糖尿病、脂肪肝出血综合征等多种疾病的病理生理过程^[11-13]。肝脏脂质合成与分泌的平衡是调控蛋鸡肝脏及肝外脂肪沉积的关键^[14]。蛋鸡 FLHS 发生过程,脂肪沉积肝细胞内,尤其是含有大量易被氧化的脂肪酸,会生成大量 ROS 引起脂质过氧化反应^[15]。肝细胞内产生的 ROS 可导致溶酶体释放,进而激活核因子 κ B (NF- κ B) 炎症通路,促进 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的转录,最终触发炎症反应^[16]。

阿司匹林丁香酚酯(AEE)是利用结构拼合的李药原理将阿司匹林与丁香酚进行酯化修饰而合成的一种新型药用化合物^[17];其具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、降血脂等多种药理活性^[18-20]。SOD、GSH、CAT 作为三种重要的内源性自由基清除剂,在维持机体氧化与抗氧化平衡,保护细胞免受氧化损伤发挥关键作用。MDA 是脂质过氧化产物,也是公认的氧化应激和抗氧化的标志物^[21]。研究表明,阿司匹林通过提高 SOD、GSH、CAT 活性和降低 MDA 水平,改善脱氢表雄酮诱导的多囊卵巢综合征大鼠卵巢代谢^[22]。AEE 可改善蛋鸡 FLHS 的生产性能,并且显著提高 FLHS 蛋鸡肝脏的抗氧化能力。基于 AEE 的研究成果,推测 AEE 可能对 FLHS 蛋鸡卵巢氧化应激和炎症反应具有一定的调控作用。因此,本试验通过高能低蛋白日粮诱导蛋鸡 FLHS 的发生,研究在饲料中添加 AEE 颗粒剂对蛋鸡卵巢抗氧化能力及炎症反应的影响,旨在为将 AEE 开发成防治蛋鸡 FLHS 创新药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阿司匹林丁香酚酯(AEE)颗粒剂(含量 99.8%,由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所自制);海兰褐蛋鸡(甘肃省兰州市皋兰吉祥村养殖场);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)和丙二醛(MDA)ELISA 检测试剂盒(上海酶联);TRIzol Reagent 和 10% 中性福尔马林(索莱宝);PrimeScript RT Master Mix 和 TB Green Premix Ex Taq(宝生物工程);BCA 检测试剂盒和增强型 ECL 发光液(塞维爾);一抗 Anti-Nrf2、Anti-Keap1、Anti-NQO1、Anti-HO-1 和 Anti- β -actin(武汉三鹰);一抗 Anti-p-p65、Anti-p65(艾比玛特);二抗 HRP 标记的山羊抗

兔 IgG(武汉三鹰)。

1.2 试验分组与饲养管理

选取 65 羽健康的 160 日龄海兰褐蛋鸡,随机分为 5 组,每组 13 羽。空白对照组(Control)饲喂基础日粮;模型组(HELP)和低、中、高剂量 AEE 给药组(AEE-L、AEE-M、AEE-H)均饲喂高能低蛋白日粮,根据体表面积换算,分别在高能低蛋白日粮中添加 0、25、50、100 mg·kg⁻¹阿司匹林丁香酚酯颗粒剂。参照 NRC(1994)蛋鸡营养需求及课题组前期研究配制基础日粮和高能低蛋白日粮^[23],基础日粮和高能低蛋白日粮组成及营养水平见表 1。自由采食、饮水,每天给予光照 16 h,按正常免疫程序免疫接种,预饲期 7 d,试验期 90 d。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 卵巢组织采集 试验结束后,将试验鸡麻醉,通过颈动脉放血安乐死,剖开腹腔并快速取出整个卵巢组织,用预冷的 PBS 冲洗去除表面的血液。

1.3.2 样品处理及检测 取一部分卵巢组织置于 10% 中性福尔马林中固定,用于观察卵巢组织病理变化;另一部分卵巢组织立即存于液氮中速冻,之后-80℃保存,待用荧光定量 PCR 和相应试剂盒检测卵巢中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)和丙二醛(MDA)水平、抗氧化和炎症相关基因和蛋白表达。

1.4 组织病理学观察

将蛋鸡卵巢组织固定于 10% 中性福尔马林中 24 h 后,取出进行石蜡包埋并使用切片机制成 5 μ m 切片,随后进行 HE 染色,在光学显微镜下观察卵巢组织的病理变化。

1.5 抗氧化指标检测

将冻存的卵巢组织取出,根据 ELISA 检测试剂盒说明书测定卵巢组织中 SOD、CAT、GSH 和 MDA 水平。

1.6 实施荧光定量 PCR 检测

为了检测蛋鸡卵巢中炎症相关基因(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NF- κ B、TLR4)和抗氧化相关基因(SOD1、CAT、Nrf2、HO-1、Keap1、NQO1)的相对转录量。将冻存的卵巢组织取出,利用 TRIzol 法提取组织中的 RNA,微量核酸定量仪检测 RNA 质量合格后,根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA。利用 Primer5.0 软件设计引物序列,引物序列见表 2。随后按照反应体系加入 96 孔板后,低速离心。使用荧光定量 PCR 仪进行 RT-

表1 基础饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal and high-energy low-protein diet (air-dry basis)

%

项目 Items	含量 Content	
	基础日粮 Basic diet	高能低蛋白日粮 High-energy low-protein diet
原料 Ingredients		
玉米 Corn	64.00	70.00
豆粕 Soybean meal	26.00	15.78
豆油 Soybean oil		4.22
钙 Calcium	8.00	8.00
预混料* Premix*	2.00	2.00
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient level		
代谢能 ME/(kJ·kg ⁻¹)	11 248.64	13 212.22
粗蛋白质 CP	15.50	12.30
有效磷 AP	0.53	0.51
精氨酸 Arg	1.03	0.74
蛋氨酸 Met	0.37	0.32
缬氨酸 Val	0.77	0.58
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.67	0.56

*预混料为每千克饲粮提供:维生素 A 7 500 IU, 维生素 D 3 500 IU, 维生素 E 15 IU, 维生素 K 2 mg, 维生素 B₃ 20 mg, 维生素 B₆ 64 mg, 维生素 B₇ 0.1 mg, 维生素 B₉ 1 mg, 维生素 B₁₂ 0.01 mg, 核黄素 4 mg, 硫胺素 2 mg, 泛酸钙 5 mg, 硒 0.045 mg, 锰 21 mg, 铁 45 mg, 铜 6 mg, 碘 0.034 mg, 锌 34 mg

The premix provides the following per kg of diets: VA 7 500 IU, VD 3 500 IU, VE 15 IU, VK 2 mg, VB₃ 20 mg, VB₆ 64 mg, VB₇ 0.1 mg, VB₉ 1 mg, VB₁₂ 0.01 mg, Riboflavin 4 mg, Thiamine 2 mg, Calcium pantothenate 5 mg, Se 0.045 mg, Mn 21 mg, Fe 45 mg, Cu 6 mg, I 0.034 mg, Zn 34 mg

qPCR 检测,反应条件为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s 后, 60 ℃ 30 s, 循环 40 次, 72 ℃ 10 s。按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算目的基因的相对转录量,利用内参基因 β -actin 进行相对转录量分析,并进行统计学分析。

1.7 Western blot 检测

将冻存的卵巢组织放在预冷的 RIPA (含 1 mmol·L⁻¹ PMSF) 中,在组织匀浆仪上研磨 5 min,随后放在 4 ℃ 裂解 30 min,在 4 ℃ 以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心后吸取上清液。接着用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,根据检测的结果调整蛋白浓度并放置在金属浴中进行高温变性处理。按照等量的蛋白 (30 μg) 上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后在冰浴条件下转印至 PVDF 膜上,将膜放置在封闭液中,室温摇晃封闭 1 h,与目的一抗 (1:1 000 稀释) 在 4 ℃ 条件下孵育过夜。第二天在室温条件下与二抗羊抗兔 IgG-HRP (1:3 000 稀释) 进行孵育 1 h,最后加入增强型 ECL 化学发光液,在曝光仪中显示拍照。

1.8 数据分析

数据采用 SPSS Statistics 25.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和多重比较 (LSD),分析数据的显著性。所有结果以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著,利用 GraphPad Prism 9.1 软件进行作图。

2 结 果

2.1 AEE 对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢病变的影响

由图 1A~E 可知,相较于对照组,模型组蛋鸡卵巢组织有较多的脂滴浸润;相较于模型组,不同剂量 AEE 组脂肪滴明显减少,其中 AEE-H 组优于 AEE-M 和 AEE-L 组。图 1F 显示,HELP 组脂肪滴数量较对照组显著升高;与 HELP 组相比,不同剂量 AEE 组脂肪滴数量显著减少, AEE-H 组优于 AEE-L 和 AEE-M 组。

表2 荧光定量PCR扩增引物

Table 2 Real-time fluorescent quantitative PCR amplification primers

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences	登录号 Accession No.
<i>IL-1β</i>	F: ACTGGGCATCAAGGGCTA R: GGTAGAAGATGAAGCGGGTC	NM_204524. 2
<i>IL-6</i>	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGT R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT	NM_204628. 2
<i>TNF-α</i>	F: GCCCTTCCTGTAACCAGATG R: ACACGACAGCCAAGTCAACG	NM_204267. 2
<i>NF-κB</i>	F: TCAACGCAGGACCTAAAGACAT R: GCAGATAGCCAAGTTCAGGATG	NM_205134
<i>TLR4</i>	F: GGATCTTTCAAGGTGCCACA R: CAAGTGTCGGATGGGTAGGT	KP410249. 1
<i>SOD1</i>	F: GGTGCTCACTTTAATCCTG R: CTACTTCTGCCACTCCTCC	NM_205064. 2
<i>CAT</i>	F: TGCAAGGCGAAAGTGTTTGA R: CCCACAAGATCCCAGTTACCT	NM_001031215. 2
<i>Nrf2</i>	F: ATCACCTCTTCTGCACCGAA R: GCTTTCTCCCGCTCTTTCTG	NM_205117. 2
<i>HO-1</i>	F: CTTCGCACAAGGAGTGTTAAC R: CATCCTGCTTGTCCTCTCAC	NM_205344. 2
<i>Keap1</i>	F: TGCCCCTGTGGTCAAAGTG R: GGTTTCGGTTACCGTCCTGC	MN416132. 1
<i>NQO1</i>	F: CGCACCTGAGAAAACCTCT R: TTCTTGAGGGGTCCGGTGAT	NM_001277620. 2
<i>β-actin</i>	F: AGCGAACGCCCCCAAAGTTCT R: AGCTGGGCTGTTGCCTTCACA	NM_205518

F. 上游引物;R. 下游引物

F. Forward primer; R. Reverse primer

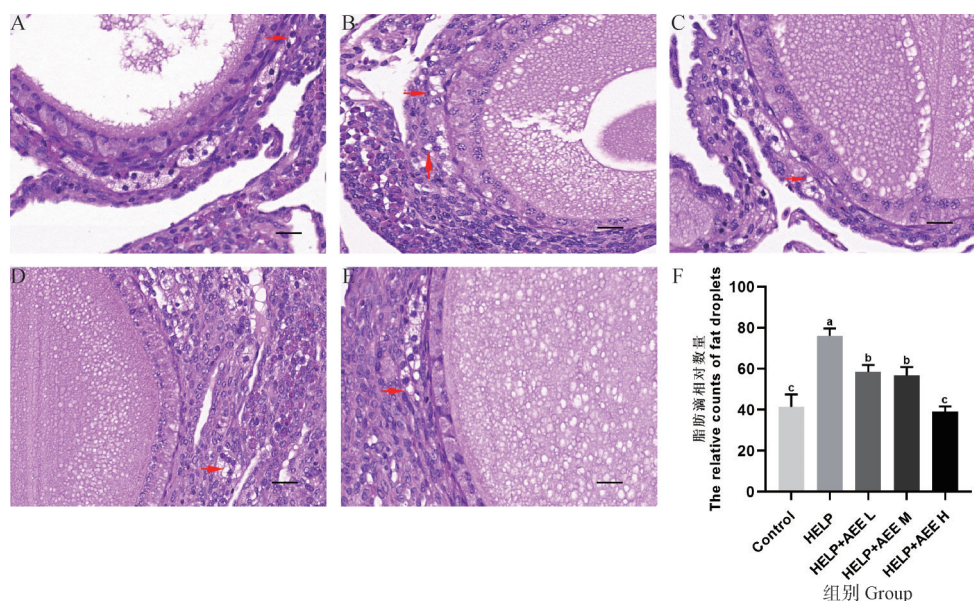
2.2 AEE对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢抗氧化酶活性的影响

由图2A~D可知,和对照组相比,模型组蛋鸡卵巢组织中SOD、CAT、GSH活性显著降低($P<0.05$),MDA水平显著增加($P<0.05$);相较于模型组,AEE-L组SOD、CAT、GSH、MDA活性无显著变化($P>0.05$),AEE-M和AEE-H组SOD、CAT、GSH活性显著增加($P<0.05$),MDA水平显著降低($P<0.05$)。

2.3 AEE对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢抗氧化相关基因和蛋白表达的影响

由图3A~F可知,模型组蛋鸡卵巢组织中*Nrf2*和*NQO1*的mRNA转录量显著低于对照组($P<0.05$),*Keap1*的mRNA转录量显著高于对照组($P<0.05$),*HO-1*、*SOD*、*CAT*的mRNA转录量与

对照组差异不显著($P>0.05$);AEE-L组*Nrf2*、*HO-1*、*CAT*的mRNA转录量与模型组差异不显著($P>0.05$),AEE-M和AEE-H组*Nrf2*、*HO-1*、*CAT*的mRNA转录量显著高于模型组($P<0.05$),AEE-L、AEE-M、AEE-H组*NQO1*和*SOD*的mRNA转录量显著高于模型组($P<0.05$),*Keap1*的mRNA转录量显著低于模型组($P<0.05$)。由图3G~K可知,和对照组相比,模型组*Nrf2*、*NQO1*、*HO-1*蛋白表达量显著降低($P<0.05$),*Keap1*蛋白表达量显著升高($P<0.05$);相较于模型组,AEE-L组*Nrf2*、*NQO1*、*HO-1*蛋白表达量差异不显著($P>0.05$),AEE-M和AEE-H组*Nrf2*、*NQO1*、*HO-1*蛋白表达量显著升高($P<0.05$),AEE-L和AEE-H组*Keap1*蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。

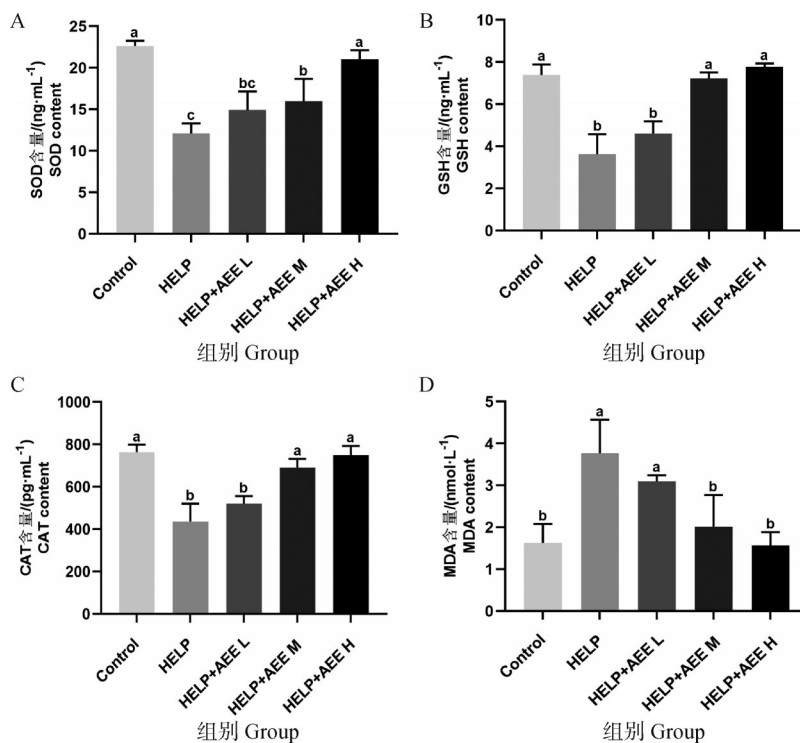


A. 对照组; B. 模型组; C. AEE低剂量组; D. AEE中剂量组; E. AEE高剂量组; F. 脂肪滴相对数量; 红色箭头代表脂滴空泡。相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

A. Control; B. HELP; C. AEE-L; D. AEE-M; E. AEE-H; F. The relative counts of fat droplets; The red arrows indicate lipid droplet vacuoles. The same lowercase letters indicate no significant difference ($P>0.05$), different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

图1 卵巢组织切片HE染色(图A~E中, 标尺=20 μm)

Fig. 1 HE staining of ovary tissue sections (In FigA-E, scale bar=20 μm)

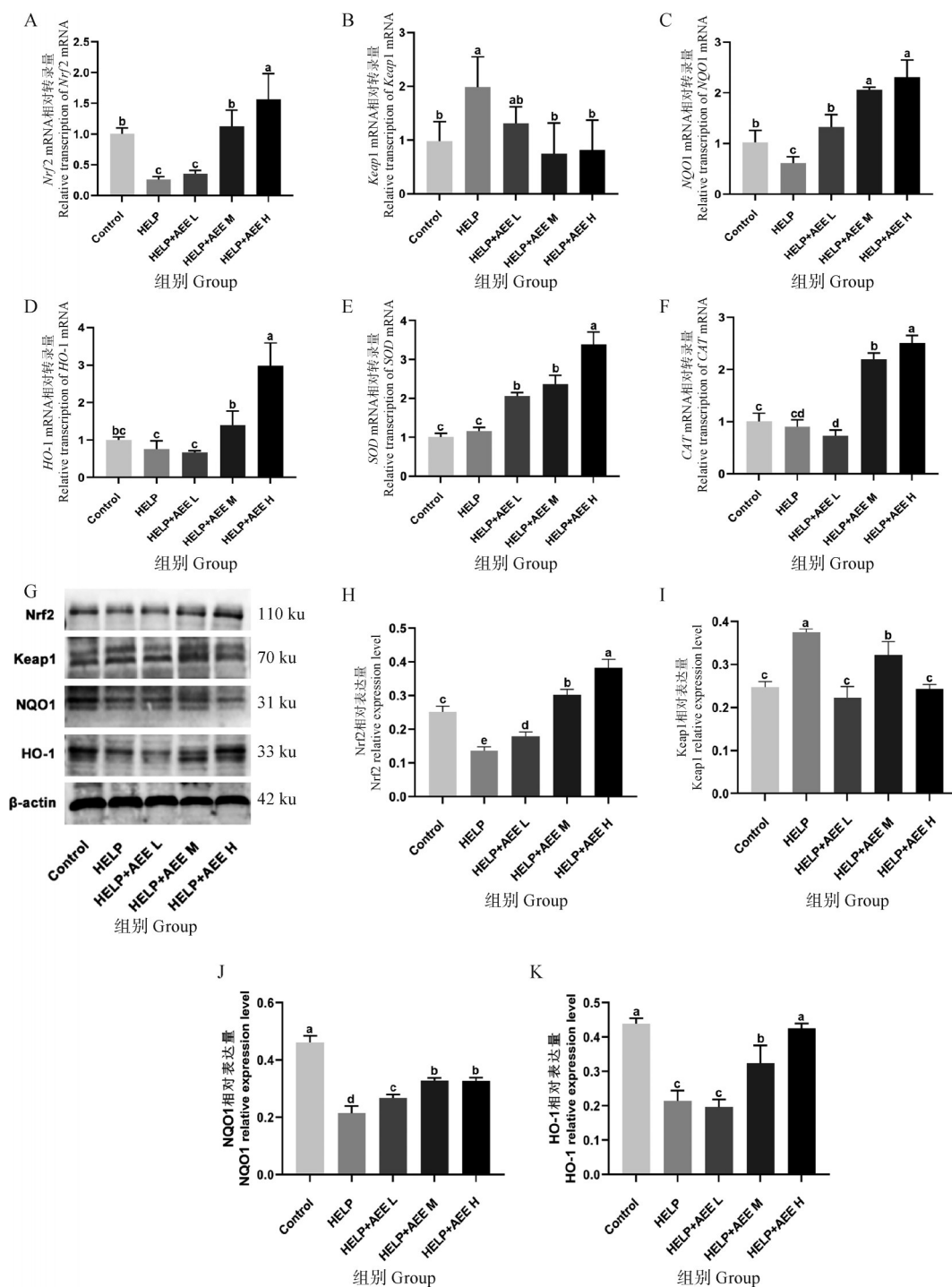


A. SOD含量; B. GSH含量; C. CAT含量; D. MDA含量

A. SOD content; B. GSH content; C. CAT content; D. MDA content

图2 AEE对卵巢组织抗氧化指标的影响

Fig. 2 Effects of AEE on ovary antioxidant indicators



A. *Nrf2* mRNA 相对转录量; B. *Keap1* mRNA 相对转录量; C. *NQO1* mRNA 相对转录量; D. *HO-1* mRNA 相对转录量; E. *SOD* mRNA 相对转录量; F. *CAT* mRNA 相对转录量; G. Western blot 结果; H. Nrf2 蛋白相对表达量; I. Keap 蛋白相对表达量; J. NQO1 蛋白相对表达量; K. HO-1 蛋白相对表达量

A. The relative transcription of *Nrf2* mRNA; B. The relative transcription of *Keap1* mRNA; C. The relative transcription of *NQO1* mRNA; D. The relative transcription of *HO-1* mRNA; E. The relative transcription of *SOD* mRNA; F. The relative transcription of *CAT* mRNA; G. The result of Western blot; H. The relative expression of Nrf2 protein; I. The relative expression of Keap1 protein; J. The relative expression of NQO1 protein; K. The relative expression of HO-1 protein

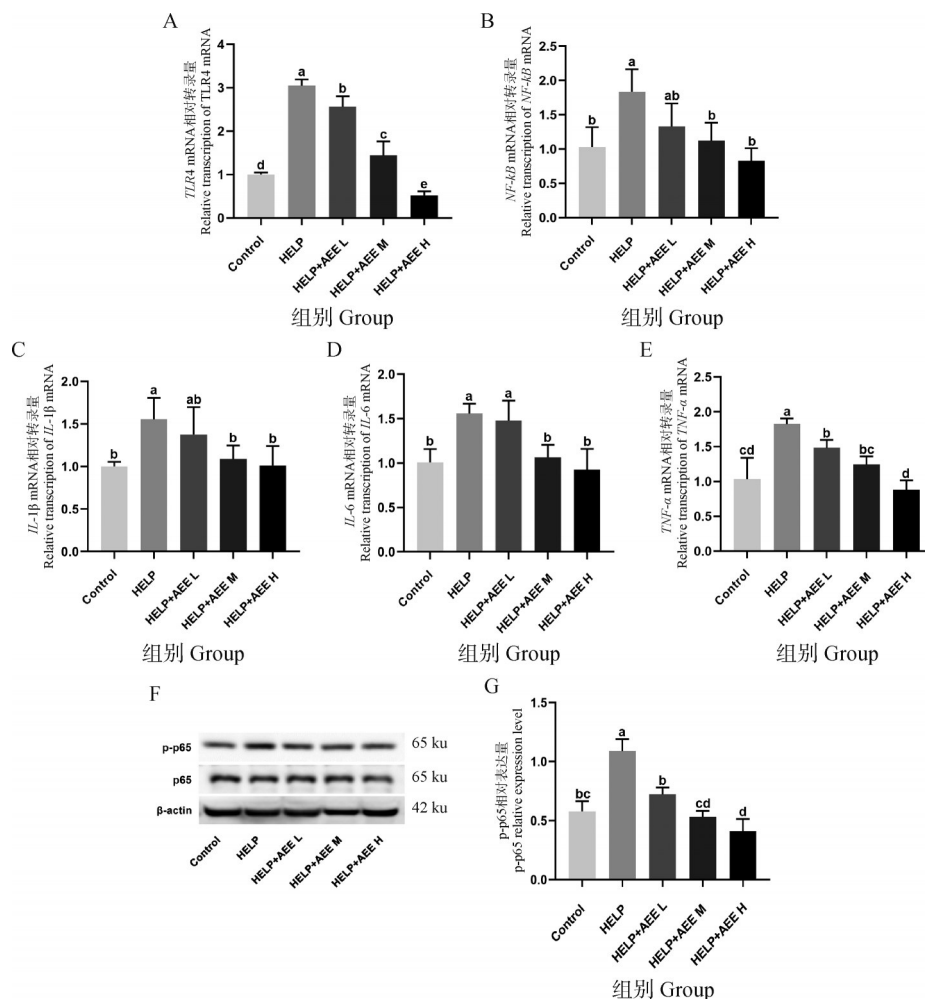
图3 AEE对卵巢组织抗氧化基因和蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of AEE on ovary antioxidant gene and protein expression

2.4 AEE对脂肪肝出血综合征蛋鸡卵巢炎症相关基因和蛋白表达的影响

由图4A~E可知,与对照组相比,模型组蛋鸡卵巢组织中 *TLR4*、*NF-κB*、*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 的 mRNA 转录量显著增加 ($P < 0.05$);与模型组相比, AEE-L、AEE-M、AEE-H 组 *NF-κB* 和 *TNF-α* 的 mRNA 转录量显著降低 ($P < 0.05$), AEE-M、AEE-

H 组 *TLR4*、*IL-1β*、*IL-6* 的 mRNA 转录量显著降低 ($P < 0.05$), AEE-L 组 *TLR4*、*IL-1β*、*IL-6* 的 mRNA 转录量差异不显著 ($P > 0.05$)。由图4F和G可知,相较于对照组,模型组 p-p65 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$);相较于模型组, AEE-L、AEE-M、AEE-H 组 p-p65 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$)。



A. *TLR4* mRNA 相对转录量; B. *NF-κB* mRNA 相对转录量; C. *IL-1β* mRNA 相对转录量; D. *IL-6* mRNA 相对转录量; E. *TNF-α* mRNA 相对转录量; F. Western blot 结果; G. p-p65 蛋白相对表达量

A. The relative transcription of *TLR4* mRNA; B. The relative transcription of *NF-κB* mRNA; C. The relative transcription of *IL-1β* mRNA; D. The relative transcription of *IL-6* mRNA; E. The relative transcription of *TNF-α* mRNA; F. The result of Western blot; G. The relative expression of p-p65 protein

图4 AEE对卵巢组织炎症基因和蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of AEE on ovary inflammation gene and protein expression

3 讨论

蛋鸡 FLHS 是一种与氧化应激相关的代谢障碍性疾病,可导致蛋鸡产蛋率和蛋品质下降,以及死

淘率增加^[5,24]。研究表明,外源性雌激素或高能低蛋白日粮(HELP)可诱发蛋鸡 FLHS,不仅抑制生产性能,而且导致输卵管和卵巢快速退化^[25]。本研究采用高能低蛋白日粮诱导蛋鸡发生脂肪肝出血

综合征,该方法是建立蛋鸡 FLHS 模型的典型方案。本研究发现,与对照组相比,HELP 组的产蛋率显著降低,卵巢组织出现脂肪变性这与前人研究结果一致^[5,26-27],表明蛋鸡 FLHS 模型成功建立。本研究进一步证实,AEE 颗粒剂能够改善卵巢脂肪变性。

蛋鸡 FLHS 与氧化应激和炎症密切相关,可导致卵巢功能障碍并引发生殖机能衰退^[5,10,28]。研究表明,抗氧化剂能改善蛋鸡产蛋性能与卵巢功能^[5,10,29]。本试验结果显示,高能低蛋白饲喂组蛋鸡卵巢中 SOD、CAT、GSH 活性显著降低,MDA 含量显著升高,*IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *IL-6* 的 mRNA 转录显著升高,表明饲喂高能低蛋白日粮可导致蛋鸡卵巢氧化应激和炎症反应加剧,该结果与 Xing 等^[5]的研究结果一致。前期研究表明,AEE 在体内外均具有明显的抗氧化活性和预防炎症相关代谢疾病作用^[17,20,30]。AEE 通过提高大鼠 BRL-3A 细胞和肝脏中 SOD、GSH、CAT 活性并降低 MDA 含量,从而缓解百草枯诱导的氧化损伤^[31]。李剑勇等^[32]发现,AEE 可降低 D-半乳糖诱导的衰老小鼠血清和肝脏 MDA 水平。本研究中,AEE 通过上调 SOD、CAT、GSH 活性及下调 MDA 水平来增强卵巢抗氧化能力,以及 AEE 能显著抑制炎症相关基因的表达,这与前人研究结果^[33]类似,表明 AEE 可有效缓解高能低蛋白日粮导致的蛋鸡卵巢氧化和炎症损伤。

作为抗氧化反应的关键调控因子,Nrf2 可通过介导下游抗氧化酶活性抵御氧化应激,在氧化损伤中具有重要作用^[16]。正常情况下,Nrf2 与 Keap1 结合,在氧化应激状态时与 Keap1 解离,进而调控 NQO1、HO-1 等下游因子的表达^[28,34-35]。Toll 样受体 4 在炎症反应中起关键作用,其信号激活可触发 NF- κ B 信号通路活化^[36]。NF- κ B 被激活,诱导炎症因子 *IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *IL-6* 的表达,这些因子在脂肪肝损伤中发挥关键作用^[37-38]。研究表明,AEE 可通过激活 Nrf2 信号通路缓解氧化应激并增强抗氧化能力^[20]。为此,本研究检测了 FLHS 蛋鸡卵巢 Nrf2 通路相关因子的表达。结果显示,AEE 显著促进 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1*、*SOD*、*CAT* mRNA 转录和抑制 *Keap1* 基因转录,蛋白结果和基因表达结果类似。此外,本研究发现,HELP 组蛋鸡卵巢中 TLR4 基因和 p-p65 蛋白表达升高,表明 NF- κ B 信号通路被激活。该结果与前人研究 FLHS 蛋鸡卵巢炎症的结果一致^[5,10,33]。以上结果表明 AEE 可能通过激活 Nrf2 通路或抑制 NF- κ B 通路提高抗氧化酶活性及抑制

炎症基因表达,从而缓解 FLHS 蛋鸡卵巢氧化损伤和炎症反应。

综上所述,通过饲喂高能低蛋白日粮导致蛋鸡 FLHS,引起卵巢损伤;AEE 颗粒剂可有效缓解 FLHS 蛋鸡卵巢损伤。

4 结 论

饲喂 HELP 日粮会引起蛋鸡 FLHS,导致卵巢氧化应激和炎症反应;AEE 颗粒剂可显著提高卵巢抗氧化能力和抑制炎症反应。本研究结果为将 AEE 开发成兽医临床防治蛋鸡 FLHS 的新型药物奠定基础。

参考文献(References):

- [1] SONG Y L, RUAN J M, LUO J R, et al. Abnormal histopathology, fat percent and hepatic apolipoprotein A I and apolipoprotein B100 mRNA expression in fatty liver hemorrhagic syndrome and their improvement by soybean lecithin[J]. *Poult Sci*, 2017, 96(10): 3559-3563.
- [2] GAO X N, LIU P, WU C, et al. Effects of fatty liver hemorrhagic syndrome on the AMP-activated protein kinase signaling pathway in laying hens[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(5): 2201-2210.
- [3] YE H E, WOOD R D, LEESON S, et al. Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on clotting activities of Factor V, VII and X in fatty liver haemorrhagic syndrome-susceptible laying hens[J]. *Br Poult Sci*, 2009, 50(3): 382-392.
- [4] TROTT K A, GIANNITTI F, RIMOLDI G, et al. Fatty liver hemorrhagic syndrome in the backyard chicken: a retrospective histopathologic case series[J]. *Vet Pathol*, 2014, 51(4): 787-795.
- [5] XING C H, WANG Y, DAI X Y, et al. The protective effects of resveratrol on antioxidant function and the mRNA expression of inflammatory cytokines in the ovaries of hens with fatty liver hemorrhagic syndrome[J]. *Poult Sci*, 2020, 99(2): 1019-1027.
- [6] NEUSCHWANDER-TETRI B A. Fatty liver and the metabolic syndrome[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(2): 193-198.
- [7] WALZEM R L, SIMON C, MORISHITA T, et al. Fatty liver hemorrhagic syndrome in hens overfed a purified diet. Selected enzyme activities and liver histology in relation to liver hemorrhage and reproductive performance[J]. *Poult Sci*, 1993, 72(8):

- 1479-1491.
- [8] SHINI A, SHINI S, BRYDEN W L. Fatty liver haemorrhagic syndrome occurrence in laying hens: impact of production system[J]. *Avian Pathol*, 2019, 48(1):25-34.
- [9] LIU Z C, XIE Y L, CHANG C J, et al. Feed intake alters immune cell functions and ovarian infiltration in broiler hens: implications for reproductive performance[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(6):134.
- [10] TAO W J, JIN F, FAN Q W, et al. Effects of chitosan oligosaccharide on production performance, egg quality and ovarian function in laying hens with fatty liver syndrome[J]. *Animals*, 2022, 12(18):2465.
- [11] KAPLOWITZ N. Mechanisms of liver cell injury[J]. *J Hepatol*, 2000, 32:39-47.
- [12] BENNETT S, GRANT M M, ALDRED S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology[J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 17(2):245-257.
- [13] WU X L, ZOU X Y, ZHANG M, et al. Osteocalcin prevents insulin resistance, hepatic inflammation, and activates autophagy associated with high-fat diet-induced fatty liver hemorrhagic syndrome in aged laying hens[J]. *Poult Sci*, 2021, 100(1):73-83.
- [14] ZHU Y, ZHANG X L, DU P F, et al. Dietary herbaceous mixture supplementation reduced hepatic lipid deposition and improved hepatic health status in post-peak laying hens[J]. *Poult Sci*, 2022, 101(6):101870.
- [15] YAO Y, WANG H H, YANG Y, et al. Dehydroepiandrosterone activates the GPER-mediated AMPK signaling pathway to alleviate the oxidative stress and inflammatory response in laying hens fed with high-energy and low-protein diets[J]. *Life Sci*, 2022, 308:120926.
- [16] YAO Y, WANG H H, YANG Y, et al. Dehydroepiandrosterone protects against oleic acid-triggered mitochondrial dysfunction to relieve oxidative stress and inflammation via activation of the AMPK-Nrf2 axis by targeting GPR30 in hepatocytes[J]. *Mol Immunol*, 2023, 155:110-123.
- [17] TAO Q, ZHANG Z D, QIN Z, et al. Aspirin eugenol ester alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats while stabilizing serum metabolites levels[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:939106.
- [18] KARAM I, MA N, LIU X W, et al. Lowering effects of aspirin eugenol ester on blood lipids in rats with high fat diet[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1):196.
- [19] KARAM M S I. 阿司匹林丁香酚酯防治高脂血症的作用及其代谢组学研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2016:1-108.
- KARAM M S I. The prevention and cure effects of aspirin eugenol ester on hyperlipidemia and its metabonomics [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016:1-108. (in Chinese)
- [20] 马宁. 阿司匹林丁香酚酯干预动脉粥样硬化和预防血栓的作用及其基于组学的机制[D]. 北京:中国农业科学院, 2018:1-120.
- MA N. Effects and omics-based mechanism of aspirin eugenol ester on intervention of atherosclerosis and prevention of thrombosis[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018:1-120. (in Chinese)
- [21] SHEN C, CHENG W, YU P, et al. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 *in vitro*[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4):3646-3654.
- [22] OLANIYAN O T, BAMIDELE O, UCHE S, et al. Ovarian metabolic activity in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in Wistar rats treated with aspirin[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2020, 24(1):41-54.
- [23] DALE N. National research council nutrient requirements of poultry-ninth revised edition[J]. *J Appl Poult Res*, 1994, 3(1):101.
- [24] YANG F, RUAN J M, WANG T C, et al. Improving effect of dietary soybean phospholipids supplement on hepatic and serum indexes relevant to fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens[J]. *Anim Sci J*, 2017, 88(11):1860-1869.
- [25] ROZENBOIM I, MAHATO J, COHEN N A, et al. Low protein and high-energy diet: a possible natural cause of fatty liver hemorrhagic syndrome in caged White Leghorn laying hens[J]. *Poult Sci*, 2016, 95(3):612-21.
- [26] 郭小权, 胡国良, 曹华斌, 等. 高能低蛋白日粮致脂肪肝出血综合征鸡抗氧化能力和肝损伤的研究[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(6):829-832.
- GUO X Q, HU G L, CAO H B, et al. Antioxidative functions and liver injury in laying hens with fatty liver hemorrhagic syndrome induced by high energy-low protein diet[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(6):829-832. (in Chinese)
- [27] 杨长进. 苜蓿素对蛋鸡脂肪肝出血综合征预防效果

- 的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2015:1-58.
- YANG C J. Prophylactic effect of polysavone on fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015: 1-58. (in Chinese)
- [28] SHINI S, SHINI A, BRYDEN W L. Unravelling fatty liver haemorrhagic syndrome: 2. Inflammation and pathophysiology [J]. *Avian Pathol*, 2020, 49 (2) : 131-143.
- [29] LIU X T, LIN X, MI Y L, et al. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 9390810.
- [30] TAO Q, ZHANG Z D, LU X R, et al. Multi-omics reveals aspirin eugenol ester alleviates neurological disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115311.
- [31] ZHANG Z D, HUANG M Z, YANG Y J, et al. Aspirin eugenol ester attenuates paraquat-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 582801.
- [32] LI J Y, YU Y G, YANG Y J, et al. Antioxidant activity of aspirin eugenol ester for aging model of mice by D-galactose [J]. *J Ani Vet Adv*, 2012, 11 (23) : 4401-4405.
- [33] 李道捷. 植物乳植杆菌 FRT4 调控蛋鸡脂质代谢的机制研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2024: 1-108.
- LI D J. Effects and mechanisms of lipid metabolism in laying hens by *Lactiplantibacillus plantarum* FRT4 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024: 1-108. (in Chinese)
- [34] MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10 (11) : 549-57.
- [35] LUDTMANN M H, ANGELOVA P R, ZHANG Y, et al. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation[J]. *Biochem J*, 2014, 457(3): 415-24.
- [36] LIEW F Y, XU D, BRINT E K, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6): 446-458.
- [37] LI J W, LI L, WANG S, et al. Resveratrol alleviates inflammatory responses and oxidative stress in rat kidney ischemia-reperfusion injury and H₂O₂-induced NRK-52E cells via the Nrf2/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1677-1689.
- [38] HU B, WEI H J, SONG Y H, et al. NF- κ B and Keap1 interaction represses Nrf2-mediated antioxidant response in rabbit hemorrhagic disease virus infection [J]. *J Virol*, 2020, 94(10): e00016-20.
- (编辑 白永平)