二乙烯三胺/一氧化氮聚合物诱导的奶牛外周血单个核细胞氧化损伤模型的建立

郑亚光　齐敬宇　张博綦　史彬林　闫素梅*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在利用二乙烯三胺/一氧化氮聚合物（DETA/NO）作为一氧化氮(NO)供体，以细胞存活率和抗氧化指标作为判断依据，确定建立奶牛外周血单个核细胞（PBMC）的氧化损伤模型的适宜条件。试验分 2 部分进行。试验 1 采用单因子完全随机试验设计，以不同浓度[0（对照）、50、100、200、300、500 μmol/L）]的 DETA/NO 作为刺激源，在 37 ℃下分别作用细胞 2、4、6、8、12 h，通过测定细胞存活率，初步确定适宜的 DETA/NO 作用时间。试验 2 根据试验 1 得出的 DETA/NO 适宜作用时间，以不同浓度[0（对照）、50、100、200、300、500 μmol/L）]的 DETA/NO 作为刺激源，依据抗氧化指标、炎症因子含量进一步筛选出适宜的 DETA/NO 作用浓度。结果显示：200 μmol/LDETA/NO 作用细胞 4 h，PBMC 存活率降低至 72.3%，超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性均较对照组显著降低（P<0.05），白细胞介素-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子-α、丙二醛和 NO 含量均较对照组显著上升（P<0.05）。结果提示，在 37 ℃下，DETA/NO 诱导 PBMC 建立 PBMC 氧化损伤模型的适宜作用浓度和作用时间分别为 200 μmol/L 和 4 h。

关键词：奶牛外周血单个核细胞；二乙烯三胺/一氧化氮聚合物；氧化损伤

中文分类号：S823　　文献识别码：A　　　文章编号：

高产奶牛尤其是泌乳高峰期的奶牛，由于较高的营养需求和代谢水平，通常伴随着自由基类代谢产物的增加。过量的自由基可以诱导动物机体产生脂质过氧化，引起细胞膜结构和功能的改变，造成机体的抗氧化应激能力、免疫功能及炎症应答能力下降，使奶牛对疾病的易感性增强。研究表明，从妊娠后期到围产期和泌乳高峰期，奶牛氧化应激水平的进程性提高是导致免疫功能障碍的主要原因[1-2]。因此，深入探讨奶牛机体的氧化应激发生机制、减缓氧化应激的发生、提高其免疫功能对保障奶牛的健康生产具有重要的理论与实际意义。一氧化氮（NO）是生物体内的一种气体信号分子和活性氮自由基，存在于多种细胞（如巨噬细胞、肝细胞、肌细胞和内皮细胞等）中，主要具有免疫调节、神经信号传递、血压生理调

收稿日期：2018-02-09

基金项目：国家自然科学基金（31672463）

作者简介：郑亚光（1990—），男，内蒙古包头人，博士研究生，从事动物矿物质与维生素营养研究。E-mail: zhengyaguangg@163.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail: yansmimau@163.com

控和血小板凝聚抑制等生理功能[3]。研究证实，NO 的浓度与机体多种信号通路的活性和炎症反应有关，低剂量的 NO 对维持机体免疫功能、血流量、血小板凝集反应和神经传递等内环境的稳定具有重要的生理作用，而过多的 NO 通常伴随有炎症和免疫紊乱。诱导型一氧化氮合酶（*iNOS*）在生理情况下不表达，而在炎症状态下 iNOS 被激活产生大量 NO，导致组织损伤，加剧炎症进程[4]，由此得出，NO 的过量产生可能是引起奶牛氧化应激产生的原因之一。本课题组的前期研究表明，高剂量二乙烯三胺/一氧化氮聚合物（DETA/NO）使奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，BMEC）产生明显的氧化应激反应，并已成功建立 NO 诱导的 BMEC 氧化损伤模型[5]。奶牛外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）是一类重要的免疫效应细胞，能够反映机体感染及疾病的发生，其抗氧化应激能力与奶牛的抗氧化功能和免疫功能密切相关。目前，关于 PBMC 氧化应激发生机制的研究报道较少。有研究认为，分布于巨噬细胞的 iNOS 在机体的免疫应答后激活并产生过量的 NO，是引起 PBMC 氧化应激和机体炎症反应加剧的原因之一[6]。鉴于此，本研究以 DETA/NO 为 NO 供体，筛选 NO 的作用浓度与作用时间，建立奶牛体外 PBMC 的 NO 损伤模型，为通过体外法揭示奶牛 PBMC 的氧化应激机制，进一步缓解高产奶牛氧化应激提供基础性理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PBMC，采用单次密度梯度离心分离法分离培养制备；RPMI-1640 基础培养基购自美国 Gibco 公司；台盼蓝、牛 PBMC 分离液，购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司；DETA/NO，购自美国 Sigma 公司；Cell Counting Kit-8（CCK-8），购自上海碧云天生物技术有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS），购自美国 HyClone 公司。

1.2 DETA/NO 培养液的配制

准确称取 10 mg DETA/NO 溶于 612.8 μL 的超纯水中，配制成浓度为 0.1 mol/L 的母液，配制方法参照本课题组前期试验[5]。再将 DETA/NO 母液按试验要求配制成不同浓度（0、50、100、200、300、500 μmol/L）的 DETA/NO 贮备液。取不同浓度的 DETA/NO 贮备液加入到 RPMI-1640 基础培养基中，配制成 DETA/NO 终浓度分别为 0、50、100、200、300、500 μmol/L 的细胞培养液。各细胞培养液中除 DETA/NO 浓度不同外，其他成分均相同。将

上述细胞培养液经 22 μm 的过滤器过滤，现用现配，避光保存。

1.3 PBMC 的培养

本试验利用单次密度梯度离心分离法分离培养 PBMC，分离培养方法参照天津灏洋 TBD 牛 PBMC 分离液说明书。健康奶牛尾静脉采血后，12 h 内进行 PBMC 分离。将血液样本用 RPMI-1640 基础培养基稀释 1 倍后，小心地将血液加于牛 PBMC 分离液上方，15 mL 离心管中稀释后血液与分离液比例为 1:1，400～500×*g* 分离 40 min（离心机温度低于 25 ℃，细胞获得率高低与室温有关，超过 25 ℃时会影响细胞获得率），离心后由上至下分为 4 层，第 1 层为血浆层，第 2 层为环状乳白色 PBMC 层，第 3 层为透明分离液层，第 4 层为红细胞层。吸取第 2 层，并用 PBS 重悬清洗细胞，250×*g* 离心 10 min 后弃上清，重复清洗细胞 2 次后，将细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中，于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，培养 68 h 后将细胞离心后收集进行后续试验。在细胞培养结束前 4 h 取部分细胞用台盼蓝进行染色并计数活细胞数（>95%）

1.4 试验设计

试验分为 2 个部分。试验 1 采用单因子完全随机试验设计，将细胞离心后重悬于不同浓度的 DETA/NO 培养液中，以 6×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中，并随机分为 30 个组，每组 8 个重复，细胞培养液中 DETA/NO 的终浓度分别为 0、50、100、200、300、500 μmol/L，并在 37 ℃下分别作用 2、4、6、8、12 h，通过测定其对细胞存活率的影响，初步筛选 DETA/NO 适宜的作用时间，其中以 0 μmol/L 为对照组。试验 2 采用单因子完全随机试验设计，将培养后得到的 PBMC 以 6×10^6 个/mL 的密度接种于 24 孔培养板中，并随机分为 6 个组，每组 6 个重复，细胞培养液中 DETA/NO 的终浓度分别为 0、50、100、200、300、500 μmol/L，在 37 ℃下以试验 1 筛选得出的 DETA/NO 适宜作用时间为 DETA/NO 的处理时间，通过检测细胞培养液抗氧化指标和炎症因子，进一步筛选出 DETA/NO 的适宜作用浓度，其中以 0 μmol/L 为对照组。

1.5 样品采集与处理

将 24 孔培养板中的细胞培养液以重复为单位，分别收集于 1.5mL Eppendorf 离心管中，于 4 ℃、10 000×*g* 离心 5min，收集上清液用于抗氧化指标与炎症因子的测定，样品采集与处理方法参照本课题组前期相关试验[7]。

1.6 测定指标与方法

1.6.1 细胞存活率

采用 CCK-8 法检测细胞存活率，以吸光度值反映细胞的数量[8]。按照试验 1 的试验设计将细胞悬液以 6×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板，100 μL 的细胞悬液加入 CCK-8 的体积为 10 μL，避光 37 ℃孵育 4 h 后在波长 450 nm 处检测各孔的吸光度值（$OD_{450\ nm}$），各组的细胞存活率用相对于对照组 $OD_{450\ nm}$ 的百分比表示。对照组的细胞存活率表示为 100%。

细胞存活率（%）=（试验组 $OD_{450\ nm}$－空白组 $OD_{450\ nm}$）/（对照组 $OD_{450\ nm}$－空白组 $OD_{450\ nm}$）×100。

1.6.2 抗氧化指标与炎症因子

抗氧化指标：超氧化物歧化酶（SOD）活性采用黄嘌呤氧化酶法测定，过氧化氢酶（CAT）活性采用比色法测定，谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）活性采用二硫代二硝基苯甲酸法测定，丙二醛（MDA）含量采用硫代巴比妥酸（TBA）法测定，操作步骤按照试剂盒说明书进行，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

炎症因子：NO、白细胞介素-1（IL-1）、白细胞介素-6（IL-6）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）含量均采用双抗体夹心法测定，具体操作按照试剂盒说明书进行，试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.7 数据统计与分析

试验数据用 Excel 2007 进行初步整理，采用 SAS 9.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析，应用 Duncan 氏法进行多重比较，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结　果

2.1 DETA/NO 作用浓度与作用时间对 PBMC 存活率的影响

由表 1 可以看出，与对照组相比，作用时间为 4~12 h 时，所有作用浓度的 DETA/NO 对 PBMC 存活率均具有显著的降低作用（$P<0.05$），且随着 DETA/NO 作用浓度的增加，PBMC 存活率呈逐渐的降低趋势。作用时间为 4 h 时，DETA/NO 作用浓度为 50、100 μmol/L 时，PBMC 存活率组间差异不显著（$P>0.05$），但数值上有下降的趋势；DETA/NO 作用浓度为 200~500 μmol/L 时，PBMC 存活率随作用浓度的增加显著下降（$P<0.05$）；作用浓度为 300、

500 μmol/L 时 PBMC 存活率分别为 59.3%和 47.7%，显著低于作用浓度为 50、100 和 200 μmol/L 时（P<0.05），作用浓度为 50、100 和 200 μmol/L 时 PBMC 存活率均在 70%以上。作用时间为6、8 h 的各浓度组中，100~500 μmol/L 组作用 6 h 时 PBMC 存活率为 30.9%~54.1%，作用 8 h 时 PBMC 存活率为 22.1%~52.6%，均显著低于对照组和 50 μmol/L 组（P<0.05）；作用时间为 12 h 的各浓度组中，100~500 μmol/L 组 PBMC 存活率为 22.5%~50.4%，显著低于对照组和 50 μmol/L 组（P<0.05）。当 DETA/NO 作用浓度为 50 μmol/L 时，作用时间分别为 2、4、6 h 时，PBMC 存活率均在 80%以上，当作用时间延长至 8、12 h 时，PBMC 存活率降低，分别为 76.8%、75.8%。当 DETA/NO 作用浓度分别为 300、500 μmol/L 时，随着 DETA/NO 作用时间的延长，PBMC 存活率分别由 2 h 的 83.7%、79.5%均降低至 60%以下，最低降到 22.1%。

表 1　DETA/NO 作用浓度与作用时间对 PBMC 存活率的影响

Table 1　Effects of action concentration and time of DETA/NO on PBMC survival rate　　%

DETA/NO 作用浓度 DETA/NO action concentration /（μmol/L）	DETA/NO 作用时间 DETA/NO action time/h				
	2	4	6	8	12
0	100.0	100.0^{a}	100.0^{a}	100.0^{a}	100.0^{a}
50	89.9	89.9^{b}	80.6^{b}	76.8^{b}	75.8^{b}
100	88.3	87.2^{b}	54.1^{c}	52.6^{c}	50.4^{c}
200	85.7	72.3^{c}	47.6^{cd}	33.6^{d}	30.2^{d}
300	83.7	59.3^{d}	43.4^{d}	31.7^{d}	24.5^{d}
500	79.5	47.7^{e}	30.9^{e}	22.1^{e}	22.5^{d}
SEM	2.45	2.77	3.48	2.14	4.96
P 值 P-value	0.080 9	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

同列数据肩标相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。下表同。

Values in the same column with the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 DETA/NO 作用浓度对 PBMC 抗氧化指标和炎症因子的影响

由表 2 可以看出，不同浓度的 DETA/NO 作用 4 h 后，SOD 活性随着 DETA/NO 作用浓度的增加呈下降趋势。当 DETA/NO 作用浓度为 50 μmol/L 时，SOD 活性相比对照组差异不显著（P>0.05）；当 DETA/NO 浓度为 100～500 μmol/L 时，SOD 活性相比对照组显著降低（P<0.05），且 DETA/NO 作用浓度为 200～500 μmol/L 时的 SOD 活性还显著低于 DETA/NO

作用浓度为 50 μmol/L 时（P<0.05），尤以作用浓度为 500 μmol/L 时 SOD 活性最低。GPx 和 CAT 活性呈现与 SOD 活性相似的变化规律，MDA 含量则呈现与 SOD 活性相反的变化规律，且以作用浓度为 DETA/NO 500 μmol/L 时 GPx 和 CAT 活性最低，MDA 含量最高。

表 2　DETA/NO 作用浓度对 PBMC 抗氧化指标的影响

Table 2　Effects of DETA/NO concentration on antioxidant parameters of PBMC

DETA/NO 作用浓度 DETA/NO action concentration/(μmol/L)	超氧化物歧化酶 SOD/（U/mL）	过氧化氢酶 CAT/（U/mL）	谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/（U/mL）	丙二醛 MDA/（nmol/mL）
0	1.03^{a}	3.24^{a}	60.37^{a}	0.91^{f}
50	0.98^{ab}	3.07^{a}	56.99^{ab}	0.97^{df}
100	0.93^{b}	2.25^{b}	52.45^{b}	1.02^{d}
200	0.82^{c}	1.97^{b}	44.26^{c}	1.99^{c}
300	0.66^{d}	1.45^{c}	37.07^{d}	2.67^{b}
500	0.43^{e}	0.56^{d}	29.01^{e}	3.11^{a}
SEM	0.020 1	0.122 5	1.925 0	0.081 2
P 值 P-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

由表 3 结果可以看出，不同浓度的 DETA/NO 作用 4 h 后，随着 DETA/NO 作用浓度的增加 TNF-α含量逐渐升高，以 500 μmol/L 组 TNF-α含量最高；DETA/NO 作用浓度为 50~500 μmol/L 时的 TNF-α含量相较对照组均显著上升（P<0.05）。NO、IL-1、IL-6 含量与 TNF-α含量呈现相似的变化趋势，但 DETA/NO 作用浓度为 50 μmol/L 时 IL-1 含量与对照组相比在数值上呈上升趋势，但差异未达显著水平（P>0.05）。

表 3　DETA/NO 作用浓度对 PBMC 炎症因子含量的影响

Table 3　Effects of DETA/NO concentration on inflammatory cytokine contents of PBMC

DETA/NO 作用浓度 DETA/NO action concentration/(μmol/L)	一氧化氮 NO/（μmol/L）	白细胞介素-1 IL-1/（ng/L）	白细胞介素-6 IL-6/（ng/L）	肿瘤坏死因子-α TNF-α/（ng/L）
0	190.1^{e}	130.7^{d}	150.5^{f}	131.2^{e}
50	205.3^{d}	134.4^{d}	155.3^{e}	159.4^{d}
100	213.4^{dc}	140.5^{c}	157.9^{d}	163.3^{d}
200	220.2^{c}	145.6^{bc}	162.0^{c}	170.0^{c}
300	249.5^{b}	150.7^{ab}	167.0^{b}	180.6^{b}
500	290.3^{a}	155.5^{a}	170.3^{a}	187.7^{a}
SEM	2.797 6	1.806 5	0.848 5	1.471 8

P 值 *P*-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

3 讨　论

NO 是生物体内的一种气体信号分子和活性氮自由基，介导多种生物功能，如宿主防御、血管舒张等[9]。NO 是由 *L*-精氨酸向 *L*-瓜氨酸转化过程中生成的，并通过一氧化氮合酶（NOS）内源合成。巨噬细胞来源的 NO 在生理、病理和炎症反应中起重要作用，然而 NO 的过量产生引发机体炎症反应及氧化应激[10]。DETA/NO 是人工合成的 NO/核苷化合物，无需酶催化便能迅速释放 NO 且半衰期长，有利于体外试验的长时程观察，是较为理想的外源性 NO 供体[11]。因此，以 DETA/NO 为 NO 供体，诱导 PBMC 建立氧化损伤模型，可为科学调控奶牛抗氧化能力及机制研究提供理想的试验平台。

周丽娜等[12]的研究指出，细胞死亡率为 20%~30%可以作为建立小鼠脊髓神经元细胞氧化应激模型的评判标准。Huo 等[13]报道，在小鼠的心肌细胞中，选取细胞存活率为 40%~50%作为过氧化氢（H_2O_2）氧化损伤模型的依据。孙婧陶等[14]指出，以细胞死亡率为 50%~60%作为建立延边奶山羊 BMEC 氧化损伤模型的判别标准。叶新平等[15]在人的体外淋巴细胞损伤试验中，使用低浓度乙醇建立了氧化损伤模型，将乙醇对淋巴细胞的抑制率控制在 10%。郭咏梅等[5]在用 DETA/NO 建立 BMEC 损伤模型时，将细胞死亡率控制在 20%~30%作为判断标准。根据上述研究报道可知，由于细胞种类及使用的刺激源不同，细胞对氧化损伤的耐受能力也不相同，在选择细胞损伤标准上也存在差异。

本试验初步确定将细胞死亡率控制在 20%~30%作为判断标准，结果表明，当 DETA/NO 作用 4 h 后，50、100 μmol/L 组的 PBMC 存活率分别为 89.9%和 87.2%，而 200 μmol/L 组的 PBMC 存活率表现出显著下降，为 72.3%。在全部浓度组中以细胞存活率控制在 70%~80%范围内的 DETA/NO 作用浓度与作用时间可供参考的是：50 μmol/L 作用 8 或 12 h，PBMC 存活率分别为 76.8%和 75.8%；200 μmol/L 作用 4 h，PBMC 存活率为 72.3%；500 μmol/L 作用 2 h，PBMC 存活率为 79.5%。

DETA/NO 作用时间为 2 h 时，各浓度组的 PBMC 存活率随着作用浓度的增加在数值上有下降的趋势，除 500 μmol/L 组 PBMC 存活率为 79.5%外，其余各组 PBMC 存活率均在 80%~90%之间，表现为细胞在不同浓度的 DETA/NO 处理下仍保持较好的生长状况和细胞活力，即 PBMC 对 DETA/NO 的氧化损伤具有较好的耐受性；但考虑到作用浓度过高不适合作为 DETA/NO 损伤的适宜作用浓度。另外，当 DETA/NO 作用时间为 12 h 时，尽管 50 μmol/L

组 PBMC 存活率为 75.8%，但作用时间过长，不便于试验进行。200 μmol/LDETA/NO 作用时间 4 h，可使 PBMC 存活率降低至 72.3%，综合作用时间不宜过长、作用浓度不宜过高，初步筛选 DETA/NO 作用 4 h 即可使 PBMC 的氧化应激达到较为理想的损伤效果，便于后续试验继续对 DETA/NO 的作用浓度进行合理筛选。

活性氧物质的生物效应在体内受到多种酶和非酶防御机制的控制，SOD、CAT、GPx、活性及 MDA 含量可反映出细胞是否受到氧化损伤以及细胞的氧化损伤程度[16]。NO、IL-1、IL-6、TNF-α是当机体发生氧化应激后产生的常见的炎症因子，测定这些炎症因子含量可以进一步反映细胞氧化损伤的程度[17]。因此，细胞氧化应激模型的建立，除了以细胞存活率作为判别指标外，细胞的抗氧化指标和炎症因子含量的变化也是非常关键的判别指标。通过本试验的结果可以看出，与对照组相比，当 DETA/NO 作用时间为 4 h、作用浓度为 100~500 μmol/L 时，即可引起 SOD、CAT、GPx 活性显著下降，MDA 含量显著升高；当 DETA/NO 作用时间为 4 h、作用浓度为 50 μmol/L 时，即可引起 NO、IL-6、TNF-α含量显著上升。如前所述，引起 PBMC 存活率达到 70%～80%的 DETA/NO 作用浓度为 200 μmol/L、作用时间为 4 h，因此，结合以上抗氧化指标与炎性因子的结果可以得出，以 DETA/NO 为外源刺激源作用于 PBMC 时，当其作用浓度为 200 μmol/L、作用时间为 4 h 时，即可引起 PBMC 的氧化应激损伤和抗氧化能力降低，并增强炎症反应。

4 结　论

以 DETA/NO 为刺激源，其在 37 ℃下作用诱导 PBMC 建立 PBMC 氧化损伤模型的适宜作用浓度和作用时间分别为 200 μmol/L 和 4 h。

参考文献：

[1] SORDILLO L M,MAVANGIRA V.The nexus between nutrient metabolism,oxidative stress and inflammation in transition cows[J].Animal Production Science,2014,54(9):1204–1214.

[2] ABUELO A,HERNÁNDEZ J,BENEDITO J L,et al.The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period:revisiting antioxidant supplementation[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(6):1003–1016.

[3] SCHMIDT H H H W,WALTER U.NO at work[J].Cell,1994,78(6):919–925.

[4] FÖRSTERMANN U.Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease[J].Pflügers Archiv-European Journal of Physiology,2010,459(6):923–939.

[5] 郭咏梅,张博綦,石惠宇,等.二乙烯三胺/一氧化氮聚合物诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J].动物营养学报,2016,28(8):2378–2384.

[6] JABŁOŃSKA E,PUZEWSKA W,MARCIŃCZYK M,et al.iNOS expression and NO production by neutrophils in cancer patients[J].Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis,2005,53(2):175–179.

[7] 李俊良,史彬林,闫素梅,等.不同壳聚糖浓度培养液对断奶仔猪外周血淋巴细胞中花生四烯酸代谢的影响[J].动物营养学报,2014,26(1):184–189.

[8] KIM J,PARK S,JUNG C M,et al.A case of cycloserine-induced lichenoid drug eruption supported by the lymphocyte transformation test[J].Allergy,Asthma & Immunology Research,2017,9(3):281–284.

[9] 潘会君,唐宁,华晓东,等.中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):202–205.

[10] ALDERTON W K,COOPER C E,KNOWLES R G.Nitric oxide synthases:structure,function and inhibition[J].Biochemical Journal,2001,357(3):593–615.

[11] KEEFER L K,NIMS R W,DAVIES K M,et al.“NONOates”(1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors:convenient nitric oxide dosage forms[J].Methods in Enzymology,1996,268:281–293.

[12] 周丽娜,叶文博.野木瓜注射液及其提取物对脊髓神经元的氧化保护和生长促进作用[J].上海师范大学学报（ 自然科学版）,2011,40(5):540–545.

[13] HUO R,SHI Y,XU J J,et al.Antioxidant effect of human selenium-containing single-chain Fv in rat cardiac myocytes[J].Chemical Research in Chinese Universities,2009,25(2):216–219.

[14] 孙婧陶,李兆华,张宝修,等.过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J].江苏农业科学,2013,41(10):149–152.

[15] 叶新平,彭涛,苏智雄,等.暴露于低浓度乙醇下体外淋巴细胞氧化损伤模型的建立[J].现代预防医学,2010,37(8):1514–1516.

[16] İNAL M E,KANBAK G,SUNAL E.Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging[J].Clinica Chimica Acta,2001,305(1/2):75–80.

[17] LINDQVIST D,DHABHAR F S,JAMES S J,et al.Oxidative stress,inflammation and treatment response in major depression[J].Psychoneuroendocrinology,2017,76:197–205.

Establishment of Oxidative Damage Model of Dairy Cow Peripheral Blood Mononuclear Cell Induced by Diethylenetriamine/Nitric Oxide Adduct

ZHENG Yaguang QI Jingyu ZHANG Boqi SHI Binlin YAN Sumei*

(*College of Animal Science*, *Inner Mongolia Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the suitable condition for oxidative damage model of dairy cow peripheral blood mononuclear cell (PBMC) induced by diethylenetriamine/nitric oxide adduct (DETA/NO) which provide nitric oxide (NO). The oxidative damage model of PBMC was established by detecting the cell survival rate and antioxidant parameters. The test was divided into 2 parts, test 1 was conducted as a single factor randomized arrangement, PBMC was exposed in DETA/NO with different concentrations [0 (control), 50, 100, 200, 300 and 500 μmol/L] for 2, 4, 6, 8 and 12 hours at 37 ℃, respectively The suitable action time of DETA/NO was determined by detecting the cell survival rate. Based on the results of suitable action time of DETA/NO in test 1, the cells exposed in DETA/NO with different

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com (责任编辑 菅景颖)

concentrations [0 (control), 50, 100, 200, 300 and 500 μmol/L] in test 2, the suitable action concentration of DETA/NO was further screened by detecting the antioxidant parameters and inflammatory cytokine contents. The results showed that the PBMC survival rate decreased to 72.3%, the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase decreased significantly ($P<0.05$), and the contents of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-α, malondialdehyde and NO increased significantly ($P<0.05$) after treated with 200 μmol/L DETA/NO for 4 hours. It is concluded that the suitable action concentration and action time at 37 ℃ of DETA/NO for establishing the oxidative damage model of dairy cow PBMC are 200 μmol/L and 4 hours, respectively.

Key words: peripheral blood mononuclear cell; diethylenetriamine/nitric oxide adduct; oxidative damage