

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.16

SPF 雏鸡感染 REV 后 IL-2 mRNA 表达的动态变化

李恩扩, 陈雪锋, 孔 斌, 胡敬东*

(山东农业大学 动物医学院, 山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘 要: 为研究 SPF 鸡感染禽网状内皮组织增生症病毒(REV)后白细胞介素 2 (IL-2) mRNA 表达的动态变化, 本研究应用荧光定量 RT-PCR 方法, 对 SPF 鸡感染 REV 后主要免疫器官的 IL-2 mRNA 转录水平进行了初步研究。结果显示, 与对照组相比, REV 感染组鸡的脾脏、胸腺和法氏囊中 IL-2 基因的表达量在感染后 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d 和 49 d 均呈现升高, 而且除 21 日龄、28 日龄鸡的脾脏外, 均为差异显著($p < 0.05$)。本研究表明 REV 感染后可以诱导鸡的机体表达 IL-2。

关键词: SPF 鸡; 禽网状内皮组织增生症病毒; 白细胞介素-2; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0067-04

Dynamic changes of IL-2 mRNA expressions in SPF chickens infected with reticuloendotheliosis virus

LI En-kuo, CHEN Xue-feng, KONG Bin, HU Jing-dong*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In this study, a real-time RT-PCR was developed for quantitative analysis of chicken IL-2 mRNA and the expression levels of IL-2 mRNA in the primary immune organs of SPF chickens infected with reticuloendotheliosis virus (REV) were detected by using this method. The results indicated that IL-2 gene expression levels in the spleen, thymus and bursa of Fabricius in SPF chickens from REV infected group were significantly higher ($p < 0.05$) than those in the control group at 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days post REV infection, except that the day 21 and 28 in the spleen were not significantly changed ($p > 0.05$). The results show that the expression of ChIL-2 was able to be induced by REV infection.

Key words: SPF chickens; reticuloendotheliosis virus; interleukin-2; real-time fluorescent quantitative PCR

白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2), 主要是由活化的 T 淋巴细胞产生的一类细胞因子, 在机体的免疫调节中具有重要作用, 其分泌水平的高低可以反映机体的细胞免疫功能状态^[1-2]。

禽网状内皮增生症病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)是一种可以造成感染鸡只严重免疫抑制后果的肿瘤病毒^[3], 本实验通过荧光定量 PCR 检测

REV 感染鸡免疫器官中 IL-2 mRNA 的表达水平, 可以对免疫器官中 T 细胞的活化程度进行初步评价, 以研究 IL-2 在 REV 致病中的作用。

1 材料和方法

1.1 病毒株及实验动物 REV 由山东农业大学动

*Corresponding author

收稿日期: 2012-03-31

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2008D12)

作者简介: 李恩扩(1985-), 男, 山东汶上人, 兽医硕士, 主要从事动物传染病诊断与防治研究。

* 通信作者: E-mail: hjd1968@163.com

物医学院孙淑红提供;1日龄SPF鸡购自山东济南SAIS家禽科技有限公司(许可证号SCXK[鲁]20090003)。

1.2 主要试剂 SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒和DNA Marker DL2000购自宝生物工程(大连)有限公司;TransZol Up和反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物合成 根据GenBank中登录的鸡IL-2(ChIL-2)基因(AJ224516.1)和内参核糖体蛋白亚基4(RPL4)基因序列(AJ720803.1),应用DNASar软件设计两对特异性引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。ChIL-2引物为,P1:5'-TCTTTGGCTGTATTTTCGG-3',P2:5'-CTGGGTCTCAGTTGGTGT-3',预期扩增片段为270 bp;RPL4引物为,P3:5'-TCTGCATTTGGACTGAAAGC-3',P4:5'-TTCTGGATCTCCTGGCTTCT-3',预期扩增片段为154 bp。

1.4 RNA的提取及cDNA的合成 鸡的3种免疫器官细胞总RNA提取按照TransZol Up说明书进行,反转录按照TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix说明书进行,cDNA合成反应体系为20 μ L:总RNA 1 μ g,0.5 μ g/ μ L Oligo(dT) 18 1 μ L,10 μ L 2 $\times$ TS Reaction Mix,1 μ L TransScript RT/RI Enzyme Mix,其余加RNase-free水补足,混匀后于42 $^{\circ}$ C孵育30 min,85 $^{\circ}$ C反应5 min,cDNA于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.5 IL-2和RPL4基因片段的扩增与鉴定 采用20 μ L体系进行PCR扩增,各取上步反应得到的cDNA 6 μ L,分别加入10 μ mol/L P1和P2、P3和P4引物2 μ L,25 mmol/L dNTP 2 μ L,10 μ L 2 $\times$ PCR Reaction Mix进行PCR扩增。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、58.5 $^{\circ}$ C 45 s(ChIL-2)/60 $^{\circ}$ C 30 s(RPL4)、72 $^{\circ}$ C 30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物于2%琼脂糖凝胶中电泳检测。经胶回收,与pMD18-T载体连接,转化DH5 α 感受态细胞,挑选单菌落后扩大培养提取重组质粒,经PCR初步鉴定正确后,阳性重组质粒由上海生工生物工程技术有限公司测序,按文献[4]方法计算重组质粒的拷贝数。将构建的重组质粒pMD-chIL-2和pMD-RPL4作为本研究的阳性标准品。

1.6 IL-2 SYBR Green 实时荧光定量PCR检测方法的建立 反应总体积为20 μ L,其中SYBR Premix Ex TaqTM (200 $\times$) 10.0 μ L,ROX Reference Dye

(50 $\times$) 0.4 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.3 μ L,质粒模板2.0 μ L,灭菌蒸馏水7.0 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 15 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40个循环。为了分析SYBR Green I PCR扩增特异性,对扩增产物制作熔解曲线,条件为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s。反应设内参RPL4基因和空白对照。并利用相应软件进行分析,建立标准曲线和熔解曲线^[5]。

1.7 动物试验 120只1日龄SPF鸡随机分为两组:REV处理组和正常对照组(处理组每只腹腔注射10² TCID₅₀ REV,对照组注射生理盐水),每组60只,相同方式饲养,每组分别于7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d、49 d随机取6只迫杀,立即取脾脏、胸腺和法氏囊并置于-80 $^{\circ}$ C,备用。

1.8 实时荧光定量PCR检测不同时期IL-2基因mRNA的转录水平 以纯化的cDNA为模板,内参RPL4为对照,每一时期取6个样品,每个样品重复两次,用建立的最优方法进行检测。

1.9 数据处理与分析 根据比较阈值法^[4]计算出目的基因的相对含量,目的基因的相对含量=2^{- $\Delta\Delta$ Ct}。注释: $\Delta\Delta$ Ct=[Ct_T-Ct_{HK}]-[Ct_T-Ct_{HK}]₀,T=待测基因;HK=内参基因;X=待测样本;0=校正样本。数据采用SPSS17.0统计软件,两组试验结果采用t检验法进行分析。

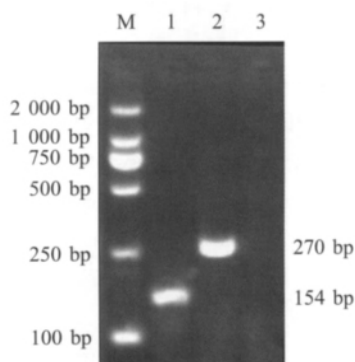
2 结 果

2.1 IL-2和内参RPL4基因片段的PCR扩增及重组质粒的鉴定 以鸡免疫器官细胞提取的总RNA为模板,通过特异性引物扩增chIL-2和RPL4基因片段,经3%琼脂糖凝胶电泳结果显示,其扩增片段分别约为270 bp和154 bp(图1),与预期大小相符。对构建的重组质粒pMD-chIL-2和pMD-RPL4进行测序鉴定,结果两基因片段均与GenBank中登录的序列完全一致。

2.2 SYBR Green 实时荧光定量PCR熔解曲线和标准曲线的建立 SYBR Green 实时荧光定量PCR熔解曲线分析表明,该方法扩增的目的基因(IL-2)和内参基因(RPL4)均具有特异性,只出现各自的单一峰(图2),无引物二聚体或其他非特异性产物生成。

该方法具有较高的灵敏度,IL-2的检测下限为

10^0 copies/ μ L, 建立的标准曲线斜率分别为 -3.0406 (IL-2)和 -3.1504 (RPL4), 两基因的扩增效率均在 107 %左右, 其相关系数也均在 0.99 以上(图 3、图 4), 符合比较阈值法相对定量分析的前提, 检测所得 Ct 值可以按比较阈值法分析^[4]。



M: DL2000 Marker; 1: RPL4 基因 PCR 扩增产物;
2: IL-2 基因 PCR 扩增产物; 3: 阴性对照

M: DL2000 Marker; 1: PCR product of RPL4 gene;
2: PCR product of IL-2 gene; 3: Negative control

图 1 IL-2 和 RPL4 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 PCR amplifications of IL-2 and RPL4 genes

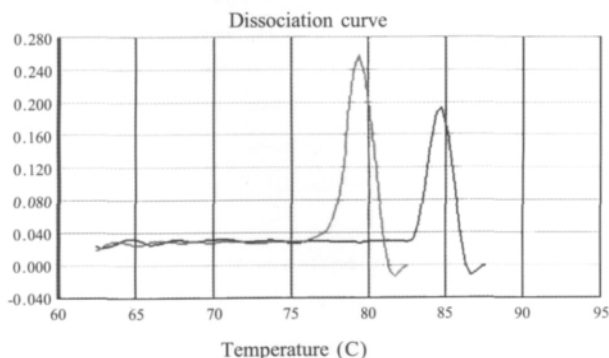


图 2 IL-2 和 RPL4 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig.2 Real-time quantitative PCR melting curve of IL-2 and RPL4

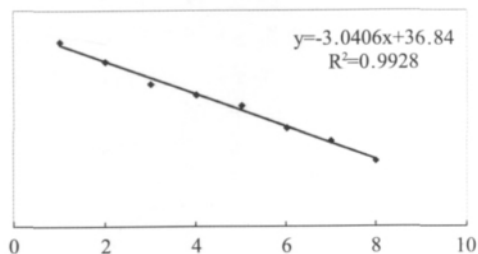


图 3 IL-2 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.3 Real-time quantitative PCR standard curve of IL-2

2.3 IL-2 基因荧光定量的表达水平 本实验将对对照组 7 d 时 IL-2 基因的表达量作为参照因子, 处理组及其他时期 IL-2 基因的表达量与其相比, 得到相应基因表达量的倍数, 采用内参 RPL4 对 IL-2 基因进行均一化处理, SPF 鸡免疫器官 IL-2 基因的相对

表达情况见图 5~图 7。

图 5~图 7 表明, 处理组与对照组相比, 除 21 d、28 d 脾脏 IL-2 基因表达量升高但不显著以外 ($p>0.05$), 其他均表现显著升高 ($p<0.05$)。

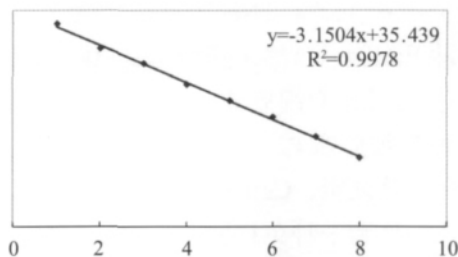


图 4 RPL4 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.4 Real-time quantitative PCR standard curve of RPL4

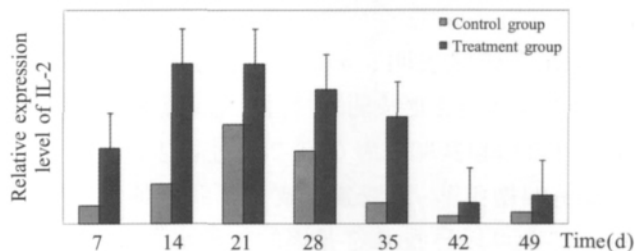


图 5 脾脏 IL-2 基因在不同时间点的相对表达量

Fig.5 Relative expression level of IL-2 in the spleen at different time points

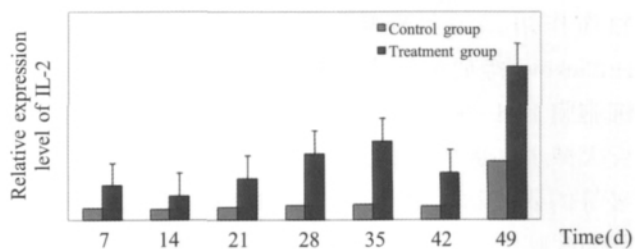


图 6 胸腺 IL-2 基因在不同时间点的相对表达量

Fig.6 Relative expression level of IL-2 in the thymus at different time points

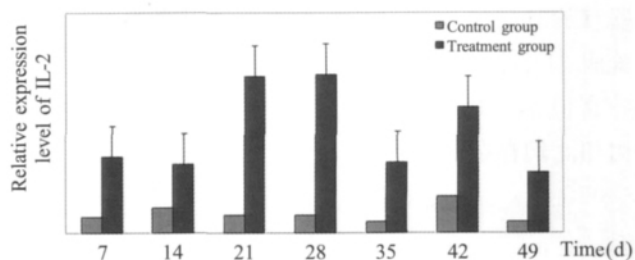


图 7 法氏囊 IL-2 基因在不同时间点的相对表达量

Fig.7 Relative expression level of IL-2 in the bursa at different time points

3 讨论

IL-2 主要由激活的 Th1 淋巴细胞产生并分泌,

它通过与 IL-2 受体(IL-2R)结合产生以下作用:(1)刺激 T 淋巴细胞增殖;(2)激活 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等效应细胞产生杀灭肿瘤细胞作用;(3)刺激 T 淋巴细胞产生 IL-2、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)等免疫增强因子,间接增强 B 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等效应细胞产生杀灭肿瘤细胞作用^[6];(4)通过刺激产生 TNF 使肿瘤细胞凋亡,在机体免疫中处于中心地位。许多实验证明,ChIL-2 与哺乳动物的 IL-2 生物活性相似,作为一种免疫调节分子在鸡的免疫系统中起重要作用^[7]。利用 IL-2 活性检测来反映淋巴细胞功能,特别是 T 细胞的功能,日趋用于免疫功能的研究^[8]。

Xu 等研究表明,miR-26a 作为一种肿瘤抑制物,在 REV 转化形成的多种淋巴瘤细胞系中下调表达,可以引起其靶基因 ChIL-2 的过表达,继而刺激瘤细胞的增殖^[9]。这一发现支持了我们的结果,即 REV 感染可以导致 IL-2 基因的转录水平显著升高。IL-2 能够刺激产生 TNF^[6],而且已有学者报道,REV 感染会引起脾细胞肿瘤坏死因子(TNF)水平明显增高,这种过高水平的 TNF 对免疫器官具有免疫损伤作用,与免疫功能的下降密切相关^[10]。但 Hrdlickova 等研究认为,REV-T 株感染转化的瘤变细胞膜上 IL-2R 结合性地降低 IL-2 的水平,使 IL-2 大大减少,造成严重的免疫功能障碍^[11]。国内李广兴等的研究结果显示 SPF 雏鸡感染 REV 后造成胸腺和脾脏 T 淋巴细胞 IL-2 诱生活性明显降低^[12]。

脾脏、法氏囊和胸腺是禽类的主要免疫器官,本研究采用实时荧光定量 PCR 对 REV 感染鸡上述器官的 IL-2 表达量进行了检测,结果表明,除了试验组 21 日龄、28 日龄鸡的脾脏 IL-2 基因转录水平升高但不明显外($p>0.05$),其他处理组与正常对照组相比均存在显著差异($p<0.05$)。

参考文献:

- [1] Lilleho H S, Kaspers B, Jenkins M C, et al. Avian interferon and interleukin-2: a review by comparison with mammalian homologues [J]. *Poult Sci Rev*, 1992, 4(1): 67-68.
- [2] 刘佳, 单安山, 孙进华. 白细胞介素-2 的研究进展与应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2009(11): 19-21.
- [3] 杜岩, 崔治中. 禽网状内皮组织增生病毒感染引起的鸡群免疫抑制 [J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(2): 122-124.
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-Delta Delta C) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [5] 罗勇军, 刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用 [J]. *重庆医学*, 2005, 34(3): 414-415.
- [6] Gaffen S L, Liu K D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications [J]. *Cytokine*, 2004, 8 (3): 109-123.
- [7] 邵卫星, 彭大新, 刘秀梵, 等. 鸡的 7 种细胞因子的一些分子生物学特性 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(4): 11-15.
- [8] Matsushita K, Fujiwara H, Matsumoto T, et al. Interleukin 2 mediated growth of leukemia cell in lymphnodes of patients with acute-T cell leukemia/lymphoma [J]. *Leuk Res*, 1996, 20 (2): 135-139.
- [9] Xu Hong-tao, Yao Yong-xiu, Lorraine P Smith, et al. MicroRNA-26a-mediated regulation of interleukin-2 expression in transformed avian lymphocyte lines [J]. *Cancer Cell Int*, 2010, 10: 15.
- [10] Zavala G. Immunosuppression induced by reticuloendotheliosis virus [J]. *American Association of Avian Pathologists*, 2006, 70-80.
- [11] Hrdlickova R, Nehyba J, Humphris E H. V-rel induces expression of three avian immunoregulatory surface receptors more efficiently than c-rel [J]. *J Virol*, 1994, 68: 308-319.
- [12] 李广兴, 刘忠贵, 郎跃深. SPF 雏鸡感染网状内皮组织增殖病病毒后白细胞介素 2 和干扰素诱生活性的变化 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(4): 3-5.

(本文编辑: 李 爽)