

## 雏鸡肠组织中 CD44 的鉴定及时空表达特性

吕文强, 师润, 陈陆\*, 张金来, 杨霞, 赵军, 王新卫, 王川庆 (河南农业大学 禽病研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了解 CD44 分子在雏鸡肠组织内的表达及其时空表达特性, 设计 1 对引物, 建立 RT-PCR 方法对 CD44 mRNA 进行鉴定; 以 GAPDH 基因为内参, 建立检测鸡 CD44 基因表达水平的 SYBR Green I 实时荧光定量 (Q-PCR) 方法, 对 1~28 日龄商品鸡肠组织不同部位中 CD44 mRNA 表达水平进行检测。结果显示, 从鸡肠组织中成功鉴定出 CD44 mRNA, 建立的荧光定量方法能特异性检测到 CD44 mRNA, CD44 和 GAPDH 基因的扩增效率分别为 95% 和 101%, 线性范围均在  $10^8 \sim 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 敏感度高, 最低检测限分别为 45 和 77 个拷贝。建立的 CD44 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法具有特异、灵敏、快速、重复性好等优点。雏鸡不同日龄, 不同肠组织中 CD44 表达水平有所差异, 5~20 日龄时的空肠组织和 5~10 日龄时的直肠组织中 CD44 表达量较高。

**关键词:** 雏鸡; CD44; SYBR Green I; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** S852.2; S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-4545(2013)01-0053-06

## Identification and temporal and spatial expression characteristics of CD44 in chicken intestine

LU Wen-qiang, SHI Run, CHEN Lu\*, ZHANG Jin-lai, YANG Xia, ZHAO Jun, WANG Xin-wei, WANG Chuan-qing (Institute of Avian Infection Disease, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To understand the temporal and spatial expression characteristics of CD44 in chicken intestine, a pair of primers was designed for proving the presence of CD44 in chicken intestine. Another pair of primers for Real-time PCR was designed to establish a rapid and specific SYBR Green I Real-time PCR assay, CD44 expression levels in intestinal tissue of 1-28 day-old chickens were detected, the specificity, sensitivity and repeatability of the assay were tested. The results showed that CD44 mRNA was successfully identified in chicken intestine; the real-time PCR assay was highly specific with 95% (CD44) and 101% (GAPDH) amplification efficiency. The assay was highly sensitive, and detection thresholds were respectively 45 (CD44) copies and 77 (GAPDH) copies of plasmid DNA. The established SYBR Green I real-time PCR for detecting the expression level of CD44 in chickens is rapid, specific and sensitive. The expression levels of CD44 varied with different day-old chicken intestinal tissue, higher in jejunum of 5 to 20 day-old chicken and rectum of 5 to 10 day-old chicken than others.

**Key words:** chicken; CD44; SYBR Green I; Q-PCR

\* Corresponding author

许兰菊等<sup>[1]</sup>于 2004 年首次报道鸡志贺菌病例, 主要以雏鸡脓血痢为特征, 病死率可达 3.84%~33.3%, 耐过鸡生长缓慢。对我国部分地区有不同

程度腹泻病史的鸡群进行志贺菌感染血清流行病学调查发现, 鸡志贺菌血清抗体阳性率达 28.3% (155/547)~33.7% (226/670), 说明鸡志贺菌感染已成为我国鸡群发生腹泻疾病的重要病因之一<sup>[2]</sup>。病原学研究发现, 该致病菌在生物学及血清学特性等方面与人源志贺菌完全相同<sup>[3]</sup>, 表明志贺菌能在人禽间交互传播, 暗示着公共卫生和人类健康又面

收稿日期: 2011-11-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972187)

作者简介: 吕文强 (1986-), 男, 硕士。

\* 通讯作者

临新的挑战。CD44 分子是细胞表面重要的分化抗原,作为一种细胞黏附分子,发挥着多种功能。Skoudy 等<sup>[4]</sup>和 Lalont 等<sup>[5]</sup>均发现,人源志贺菌通过 ipaB 蛋白和细胞表面蛋白 CD44 特异性结合,从而介导志贺菌侵袭人肠上皮细胞并造成感染发病的。目前家禽中 CD44 研究报道较少,Catherine 等<sup>[6]</sup>曾用单抗技术鉴定鸡胚早期发育过程中 CD44 的分泌情况。然而,志贺菌的主要侵袭部位在肠组织,目前家禽肠组织中 CD44 的表达情况尚未见报道。本试验拟通过 RT-PCR 方法鉴定肠组织中是否表达 CD44,另外通过荧光定量 PCR(Q-PCR)进一步研究雏鸡肠组织中 CD44 分子的时空表达特性,从而为研究 CD44 在志贺菌侵袭鸡肠上皮细胞中的作用及感染鸡的机制奠定基础,以期阐明人源志贺菌获得感染鸡的能力及宿主谱扩大的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试验动物** 1 日龄商品三黄鸡购于河南农业大学畜牧站。

**1.2 主要试剂与仪器** rTaqDNA 聚合酶、小量凝胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品; TaqTM 酶、SYBR Green I PreMix 聚合酶、DL2000 DNA Marker、Easy dilution 稀释液、pMD18-T 载体、工程菌 DH5 $\alpha$  等为大连宝生物工程有限公司产品;质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶快速回收 DNA 试剂盒、病毒基因组 DNA 提取试剂盒等购自 Biotek 公司; Lightcycle 1.5 荧光定量 PCR 仪为美国 Roche 公司产品;核酸蛋白检测仪为美国 Bio-Rad 公司产品;超纯水仪为美国 Barnstead 公司产品。

**1.3 CD44 mRNA RT-PCR 检测方法的建立及测定**

**1.3.1 引物的设计** 根据 GenBank 收录的鸡 CD44 基因(NM\_204860),在其核苷酸保守序列设计 1 对引物,能扩增 339 bp 的特异性片段。上游引物(P1):5'-GAGTG TAGCGGTACGAAG-3',下游引物(P2):5'-AATGCCTGTAAGATGGAG-3',引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.3.2 雏鸡肠组织总 RNA 提取** 按 Trizol 法提取鸡肠组织总 RNA,-20℃ 保存备用。

**1.3.3 CD44 cDNA 的反转录合成** 反应体系为:模板 RNA 8  $\mu$ L、5 $\times$ buffer 4  $\mu$ L、dNTP(10 mol/mL) 1  $\mu$ L,下游引物(20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L,RNase 抑制剂(40 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L,反转录酶 M-MLV(200 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L,加 DEPC 水至 20  $\mu$ L,反应条件为 42℃ 1 h,95℃ 5 min。

**1.3.4 鸡 CD44 PCR 扩增及测序** PCR 反应体系

为:反转录产物 5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.5  $\mu$ L、10 $\times$ buffer 5.0  $\mu$ L、10 mol/mL dNTPs 0.5  $\mu$ L、25 mol/mL MgCl 5.0  $\mu$ L、10 mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ L,加灭菌纯水至 50  $\mu$ L,反应条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min。取 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行电泳,将 339 bp 的 DNA 目的条带切下后,用小量凝胶回收试剂盒回收。按说明书将目的片段与 pMD18-T 载体连接,并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑选生长的菌落进行纯培养,提取质粒进行 PCR 鉴定及测序分析。

**1.4 相对荧光定量检测 CD44 基因表达方法的建立**

**1.4.1 引物的设计** 根据 NCBI 已发表的鸡 CD44 基因序列(NM\_204860)设计 1 对引物,上游引物 P3 5'-GAGTG TAGCGGTACGAAG-3',下游引物 P4 5'-TAGGA ACTGGGA ACTGACT - 3'。GAPDH 参照文献<sup>[7]</sup>介绍的方法设计引物,上游引物 P5 5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT - 3',下游引物 P6 5'-ACCTCTGTCACTCTCCACA-3。CD44、GAPDH 预期扩增片段分别为 226、264 bp,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.4.2 总 RNA 的制备** 方法同 1.3.2。

**1.4.3 CD44、GAPDH cDNA 的反转录合成** 方法参照 1.3.3 所述。

**1.4.4 CD44、GAPDH 分子阳性标准品的制备** PCR 反应体系相同:反转录产物 5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.5  $\mu$ L、10 $\times$ buffer 5.0  $\mu$ L、10 mol/mL dNTPs 0.5  $\mu$ L、25 mol/mL MgCl<sub>2</sub> 5.0  $\mu$ L,上、下游引物各 1  $\mu$ L,补水至 50  $\mu$ L。CD44 PCR 循环,94℃ 5 min,94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min。GAPDH 退火温度为 59℃,其余操作相同。取 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行电泳,将 DNA 目的条带切下后,用小量凝胶回收试剂盒回收。按说明书将目的片段与 pMD18-T 载体连接,并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑选生长的菌落进行纯培养,提取质粒进行 PCR 鉴定及测序分析。取重组质粒作为标准品,用核酸蛋白检测仪测定  $D_{280}$  和  $D_{260}$ ,计算标准品的纯度和浓度。

**1.4.5 相对定量 PCR 方法的初步建立** 反应总体积为 20  $\mu$ L,其中 SYBR 荧光 PCR 反应液 10  $\mu$ L,上、下游引物(10 mol/L)各 0.8  $\mu$ L,质粒模板 2  $\mu$ L,补水至 20  $\mu$ L。反应程序共分 3 个步骤,扩增曲线的制作过程:95℃ 1 min;95℃ 1 s,55℃ 5 s,72℃ 11 s,扩增 40 个循环;荧光定量 PCR 反应结束后溶解曲线的生成:95℃ 5 s,20℃/s(每秒温度递升 20℃);60℃ 60 s,95℃ 0 s 后 0.1℃/s;仪器温度回位:40℃ 30 s 冷

却。同时设不加模板的阴性做对照。

**1.4.6 循环条件优化** 采用 SYBR@Premix Ex Taq™ 试剂推荐的 20  $\mu\text{L}$  反应体系,即 SYBR@Premix Ex Taq™ 10  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,7.0  $\mu\text{L}$  去离子水,分别采用二步法(95 $^{\circ}\text{C}$  30 s;95 $^{\circ}\text{C}$  5 s,60 $^{\circ}\text{C}$  20 s,40 个循环)和三步法(95 $^{\circ}\text{C}$  30 s;95 $^{\circ}\text{C}$  5 s,60 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  40 s,40 个循环)扩增 CD44、GAPDH 分子 cDNA。

**1.4.7 退火温度优化** 采用优化的循环条件,在其他条件不变的情况下,在 55~65 $^{\circ}\text{C}$  对扩增 CD44、GAPDH 分子 DNA 的退火温度进行优化。

**1.4.8 引物浓度优化** 采用优化的循环条件及退火温度,分别对 2~10 pmol 引物量进行优化。

**1.4.9 标准曲线的制作** 将阳性标准品连续 10 倍系列稀释,用优化的 Q-PCR 条件进行检测,建立标准曲线。

**1.4.10 重复性评价** 用建立的 Q-PCR 分别对 5 个稀释度( $10^{-3}$ ~ $10^{-7}$ ) CD44、GAPDH 分子标准阳性样本进行检测,在同一次检测设 4 个重复管,计算批内变异系数;上述标准阳性样本于 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存,定期复检,间隔 1 周,每个样本 3 次重复,共复检 4 次,计算批间变异系数。

**1.4.11 灵敏度测定** 核酸蛋白检测仪测定阳性标准品  $D$  值并换算其拷贝数,用极限稀释法对阳性标准品进行 10 倍系列稀释,用优化的 Q-PCR 条件进行检测,确定其最小检出拷贝数。

**1.5 雏鸡鸡肠组织 CD44 mRNA 动态表达水平的测定** 用本试验建立的荧光定量 PCR 方法对 1、5、10、15、20、28 日龄鸡肠组织 CD44 分子 mRNA 表达量进行检测,计算 CD44 mRNA 相对表达水平。

## 2 结果

**2.1 鸡肠组织 CD44 鉴定** 用 CD44 特异性引物从鸡肠组织中扩增出 1 条约 339 bp 的片段,与预期结果相符(图 1)。在 GenBank 上进行 BLAST 比对,结果显示扩增产物与已公布的鸡 CD44 核苷酸序列(NM\_204860)的同源性为 99%。

### 2.2 CD44 相对荧光定量检测方法的建立

**2.2.1 常规反转录 PCR 扩增结果** 分别用 CD44、GAPDH 的特异性引物对鸡肠组织的反转录产物进行 PCR 扩增,CD44 和 GAPDH 的 PCR 产物经琼脂糖电泳分别得到 226 bp 和 264 bp 的特异条带,且无杂带(图 2)。经序列测定和比对,结果显示与鸡 CD44 核苷酸序列(序列号:NM\_204860)和 GAPDH

核苷酸序列(序列号:K01458)的同源性均为 100%。

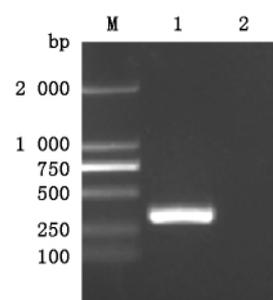


图 1 鸡肠组织 CD44 mRNA 反转录产物常规 PCR M. DL2000 DNA Marker;1. 肠组织 CD44 mRNA 反转录 PCR 产物;2. 阴性对照

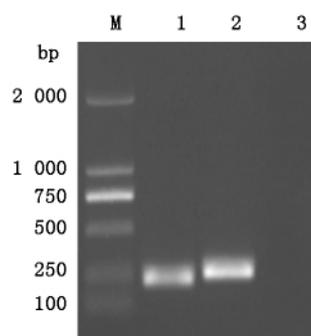


图 2 鸡肠组织 CD44、GAPDH mRNA 反转录产物 PCR 结果 M. DL2000 DNA Marker;1. 肠组织 CD44 mRNA 反转录 PCR 产物;2. 肠组织 GAPDH mRNA 反转录 PCR 产物;3. 阴性对照

**2.2.2 标准质粒 DNA 浓度的测定** 将提取的标准质粒经 PCR 鉴定后,用核酸蛋白检测仪测定 CD44、GAPDH 的质量浓度分别为 47.7 mg/L 和 76.1 mg/L,换算成拷贝数分别  $1.47 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  和  $2.35 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

**2.2.3 优化的 Q-PCR 条件** 根据试验结果,确定了 Q-PCR 的最佳反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ 10  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.7  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.6  $\mu\text{L}$ ,总体积 20  $\mu\text{L}$  荧光定量 PCR 反应采用三步法,95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,52 $^{\circ}\text{C}$  退火 5 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 s(断点搜集荧光),95 $^{\circ}\text{C}$  0 s、20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ (每秒温度递升 20 $^{\circ}\text{C}$ ),60 $^{\circ}\text{C}$  30 s、20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 、95 $^{\circ}\text{C}$  0 s 后 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  连续搜集荧光,40 $^{\circ}\text{C}$  冷却 10 s。

**2.2.4 溶解曲线分析** CD44、GAPDH 分子 mRNA Q-PCR 产物溶解曲线分析结果见图 3 和图 4。从图中可见,CD44、GAPDH 分子 mRNA Q-PCR 产物都只有 1 个特异峰,无引物二聚体及非特异性

产物形成, 溶解温度 ( $T_m$ ) 分别为  $(82.21 \pm 0.12)^\circ\text{C}$ 、 $(86.70 \pm 0.20)^\circ\text{C}$ 。

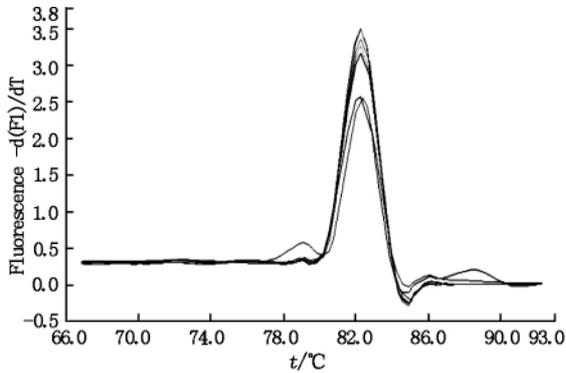


图3 荧光定量 PCR 检测 CD44 标准品的溶解曲线

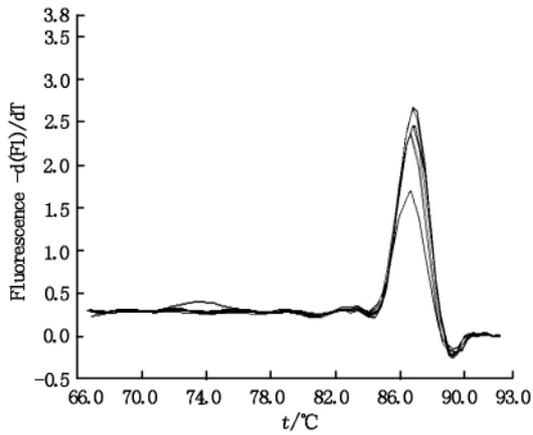


图4 荧光定量 PCR 检测 GAPDH 标准品的溶解曲线

**2.2.5 标准曲线** CD44、GAPDH 分子的扩增曲线分别见图 5 和图 6, 标准曲线见图 7 和图 8。从图 7 和图 8 可见, 本试验建立的 Q-PCR 定量检测鸡 CD44、GAPDH 分子 mRNA 的线性范围分别是  $10^{-3} \sim 10^{-8}$  和  $10^{-2} \sim 10^{-8}$ , 标准曲线相关系数均为  $r^2 = 1.00$ , 扩增效率分别 95% 和 101%, 标准曲线方程分别为:  $y(\text{CD44}) = -3.279x + 32.17$ ;  $y(\text{GAPDH}) = -3.436x + 37$ 。

**2.2.6 特异性** 在相同反应体系和条件下, 特异性检测结果显示, 本试验建立的 Q-PCR 方法与志贺菌、大肠杆菌等鸡常见病原无交叉反应。

**2.2.7 重复性及再现性** Q-PCR 检测 CD44、GAPDH 分子 mRNA 的重复性及再现性结果见图 9 和图 10。从中可见, Q-PCR 检测同一批样本 CD44、GAPDH 分子 mRNA 表达水平的 2 次平行试验的批内变异系数分别为 1.13% ~ 2.15%、1.16% ~ 3.4%。另外, 不同时间检测同一批样本的批

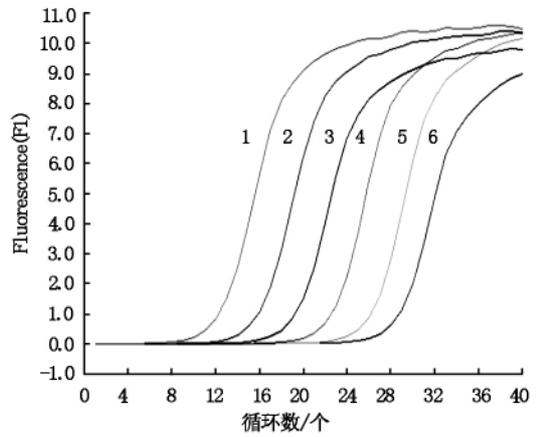


图5 荧光定量 PCR 检测 CD44 标准品的扩增曲线 1~6. 1,  $1.47 \times 10^8$ 、 $1.47 \times 10^7$ 、 $1.47 \times 10^6$ 、 $1.47 \times 10^5$ 、 $1.47 \times 10^4$ 、 $1.47 \times 10^3$  拷贝/L。

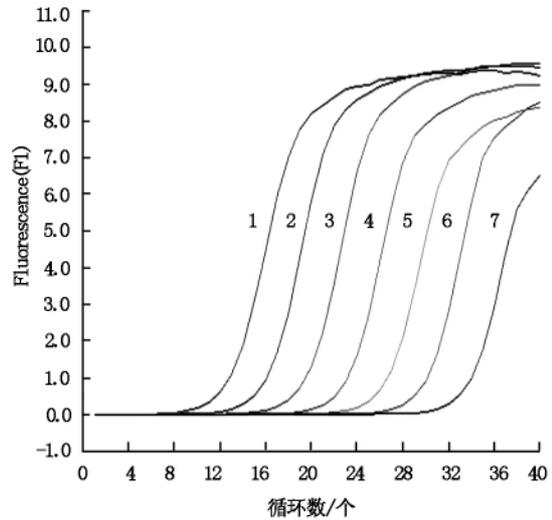


图6 荧光定量 PCR 检测 GAPDH 标准品的扩增曲线 1~7 分别为  $2.35 \times 10^8$ 、 $2.35 \times 10^7$ 、 $2.35 \times 10^6$ 、 $2.35 \times 10^5$ 、 $2.35 \times 10^4$ 、 $2.35 \times 10^3$ 、 $2.35 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

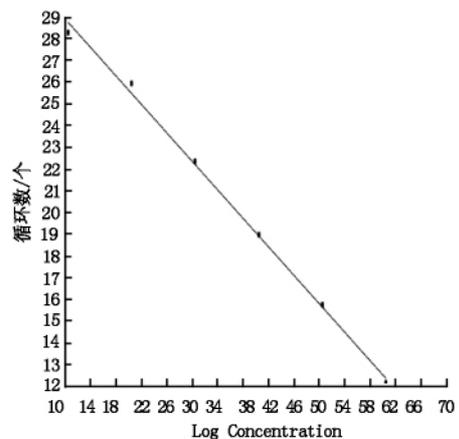


图7 荧光定量 PCR 检测 CD44 标准品的标准曲线

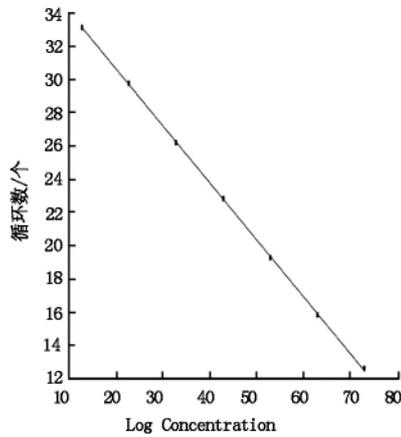


图8 荧光定量PCR检测GAPDH标准品的标准曲线

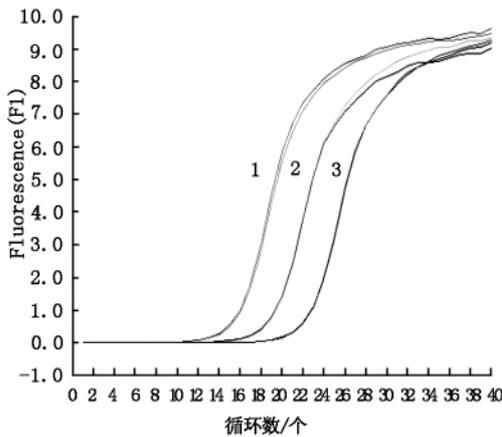


图9 荧光定量PCR检测CD44标准质粒重复性扩增曲线  
1~3分别为  $1.47 \times 10^7$ 、 $1.47 \times 10^6$ 、 $1.47 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$

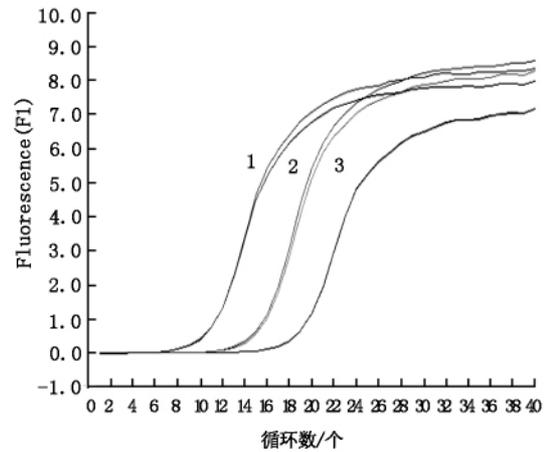


图10 荧光定量PCR检测GAPDH标准质粒重复性扩增曲线  
1~3分别为  $2.35 \times 10^8$ 、 $2.35 \times 10^7$ 、 $2.35 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$

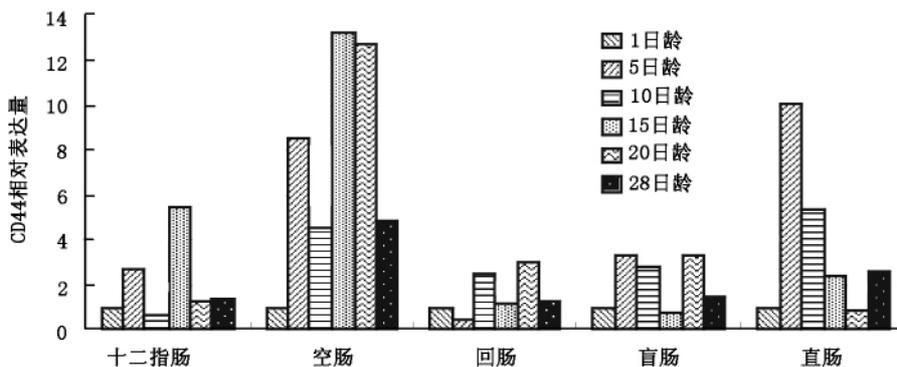


图11 雏鸡不同肠段组织CD44的动态表达

间变异系数分别为 1.16%~2.25%、1.66%~3.86%。

2.2.8 灵敏度 Q-PCR对CD44分子mRNA的最小检出量为45拷贝,对GAPDH分子mRNA的最小检出量为每个反应77拷贝。

2.3 雏鸡肠组织CD44、GAPDH分子mRNA的动态表达 以1日龄雏鸡mRNA表达水平为1,不同肠段为横坐标,CD44分子mRNA相对表达水平的差异倍数为纵坐标,1~28日龄雏鸡不同肠段组织均有CD44表达,表达水平见图11。从图中可见,1~28日龄雏鸡肠组织CD44分子mRNA表达并非十分平稳,其中空肠、直肠的表达量要高于十二指肠、回肠、盲肠组织,空肠组织在5~20日龄时相对表达量高,直肠组织在5~10日龄时相对表达量较高。

### 3 讨论

3.1 受体的鉴定 CD44分子是细胞表面重要的分化抗原,属黏附分子家族,是一种细胞表面跨膜糖蛋白分子,目前研究表明,CD44作为一种细胞黏附

分子,发挥着多种功能,如参与细胞间的黏附,促进成纤维细胞和淋巴细胞与细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)如透明质酸、硫酸软骨素、纤维素、糖以及层黏蛋白、纤连蛋白和胶原蛋白等的黏附;与细胞骨架蛋白结合,参与细胞的运动及细胞内

外的信号传导,并且通过胞质尾部外显子的变异拼接,使其具有不同的转导功能;结合并中和透明质酸,更新间质组织成分等。另外,CD44与肿瘤的关系,特别是与肿瘤的发生、发展、转移和预后的关系是近几年提出的较新课题,其研究还处于早期阶段<sup>[8]</sup>。

在志贺菌的致病机制研究中,Skoudy等<sup>[4]</sup>和Lafont等<sup>[5]</sup>均发现,志贺菌分泌的IpaB蛋白和细胞表面蛋白CD44特异性结合,在志贺菌侵袭肠上皮细胞过程中发挥着重要作用。目前,在家禽中尚未见有雏鸡肠组织CD44分子的相关报道。Corbel等<sup>[6]</sup>用针对CD44的单抗对鸡胚早期发育过程中包括神经脊在内的不同细胞迁移过程中CD44的表达情况做了研究,但CD44的单抗仍无商品化,制备单抗的成本也较高分子生物学的发展为CD44分子的研究提供可能性,随着鸡mRNA数据库的建立和不断完善<sup>[9-10]</sup>,鸡CD44 mRNA的序列得到公布。本试验以此为模板,通过设计特异性引物、反转录、PCR扩增,成功在鸡肠组织中检测到CD44 mRNA的存在,测序结果表明,扩增片段与NCBI公布的CD44已知序列同源性为99%,说明雏鸡肠组织能够表达CD44,这可能为志贺菌能侵袭感染鸡的物质基础。鸡肠组织中CD44的成功鉴定为进一步研究其时空性表达、建立荧光定量PCR方法提供了基础。此外,为进一步应用RNAi沉默等技术研究CD44在志贺菌感染家禽的分子机制提供了可能性。

**3.2 荧光定量方法的建立** 特定基因的时空性表达目前采用的技术主要有免疫组化技术、荧光定量PCR等。李淑玲等<sup>[11]</sup>曾应用免疫技术结合体视学方法对不同胎龄及生后日龄小鼠肾组织中的整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 及 $\alpha 5$ 的表达进行了系统观察和定量分析。而实时荧光定量PCR技术具有特异性强、重复性好、灵敏度高、定量准确、速度快、全封闭反应的优点,成为分子生物学研究中的重要工具。郭睿等<sup>[12]</sup>在研究睾丸特异基因在生精细胞中阶段性表达的定量分析中,认为应用荧光定量PCR技术能够更方便、更直接、更准确地对精子发生相关基因进行定量分析,所获数据可以更客观地反映基因的阶段性差异表达特性,同Northern杂交、普通PCR相比,荧光定量PCR技术具有独特的优势。同时,试验所得基因的阶段性差异表达结果为深入研究相关蛋白产物的功能提供了有力的数据支持。

本试验采用相对荧光定量PCR方法,选取应用较广的GAPDH基因作为内参,具有方法敏感性高、稳定性和再现性好的特性,可以作为应用检测鸡

肠组织内CD44时空性表达的研究方法。

**3.3 雏鸡CD44的时空性表达** 雏鸡各段肠组织在1到28日龄内均有CD44的表达,这与CD44本身功能有关,作为细胞表面重要的分化抗原,在许多细胞均有分布,包括淋巴细胞、单核细胞、红细胞、上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞及肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。肠组织作为一个机体重要组织,包括有肠上皮细胞、淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞等细胞。

但是,不同的肠组织在不同的日龄表达各异,5~15日龄时空肠、直肠组织CD44的表达量相对于十二指肠、回肠和盲肠的表达要高。许兰菊等<sup>[1]</sup>研究发现,鸡志贺菌病能够引起雏鸡脓血痢疾,肠道出血、水肿和肠黏膜溃疡,发病雏鸡主要集中在5~9日龄。本试验发现,相同日龄内空肠和直肠中CD44的表达量也相对较高,志贺菌对雏鸡感染的敏感期很可能与肠组织中CD44的表达量相关。Skoudy等<sup>[4]</sup>发现,CD44参与志贺菌的侵袭过程,在志贺菌侵入期间,CD44在侵入位点聚集,用抗CD44单抗对细胞进行处理后,志贺对细胞的侵染受到抑制,同时CD44表达量减少。对胞内缺少CD44的细胞,用CD44转染后,志贺菌与细胞的结合增强。而鸡CD44与人的不同,对于空肠、直肠中CD44的表达在志贺菌侵袭雏鸡的过程中发挥的作用与志贺感染人的过程是否一样,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 许兰菊,王川庆,胡功政,等. 鸡志贺菌病在我国的发现及其病原性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(4): 281-286.
- [2] 许兰菊,王川庆,马水锋,等. 鸡志贺菌感染的血清流行病学调查[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 594-596.
- [3] 杨霞,陈陆,许兰菊,等. 鸡源鲍氏志贺菌hn03株的分子鉴定与演化分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(3): 402-408.
- [4] Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, et al. CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2000, 2(1): 19-33.
- [5] Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, et al. Initial steps of shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction[J]. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4449-4457.
- [6] Corbel C, Lehmann A, Davison F. Expression of CD44 during early development of the chick embryo [J]. *Mech Dev*, 2000, 96(1): 111-114.

(下转 63 页)

- [2] Madsen L W, Svensmark B, Elvestad K, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs; new diagnostic and pathogenetic aspects [J]. J Comp Pathol, 2002, 126(1): 57-65.
- [3] Beineke A, Bennecke K, Neis C, et al. Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers [J]. Vet Microbiol, 2008, 128(3/4): 423-430.
- [4] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*; Unresolved questions [J]. Vet Microbiol, 2000, 76(3): 259-272.
- [5] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22 [J]. J Vet Diagn Invest, 1991, 3(1): 60-65.
- [6] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis* [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2590-2594.
- [7] Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, et al. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis* [J]. J Vet Diagn Invest, 1995, 7(3): 405-406.
- [8] Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis* [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8): 2192-2194.
- [9] Vecht U, Wisselink H J, Anakotta J, et al. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Vet Microbiol, 1993, 34(1): 71-82.
- [10] 欧瑜, 陆承平. 检测猪链球菌 2 型毒力相关蛋白的 ELISA 法的建立 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 94-97.
- [11] 孙焕, 杨宏军, 胡桂学等. 金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取及其多糖含量的测定 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(6): 1-4.
- [12] Jansen E J, Van Dorssen C A. Meningoencephalitis bij varkens door *Streptococcus* [J]. Tijdschr Diergeneesk, 1951, 76: 815-832.
- [13] Field H I, Buntain D, Done J T. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis [J]. Vet Rec, 1954, 66: 453-455.
- [14] Koldkjaer O, Nielsen G. Haemolytic *Streptococcus* group R infection [J]. Br Med J, 1972, 3(5829): 765.
- [15] Clifton-Hadley F A, Alexander T J. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type 2 in pigs [J]. Vet Rec, 1980, 107(2): 40-41.
- [16] Clifton-Hadley F A, Alexander T J, Enright M R, et al. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs [J]. Vete Rec, 1984, 115(22): 562-564.
- [17] Breton J, Mitchell W R, Rosendal S. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers [J]. Can J Vet Res, 1986, 50(3): 338-341.

(上接 58 页)

- [7] Lee J Y, Lim J M, Kim D K, et al. Identification and gene expression profiling of the Pum1 and Pum2 members of the Pumilio family in the chicken [J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75: 184-190.
- [8] 盛亚琳. 细胞黏附分子 CD44 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(7): 926-928.
- [9] Carre W, Wang X, Porter T E, et al. Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index [J]. Physiol Genomics, 2006, 25(3): 514-524.
- [10] Wang Yong, Wang Zhenggang, Li Juan, et al. Database for chicken full-length cDNAs [J]. Physiol Genomics, 2007, 28(2): 141-145.
- [11] 李淑玲, 田鹤, 郭敏. 小鼠肾发育中整合素  $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  及  $\alpha 5$  的表达 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(5): 660-662.
- [12] 郭睿, 李喜霞, 王惠珍. 小鼠睾丸特异基因在生精细胞中阶段性表达的定量分析 [J]. 动物学杂志, 2009, 44(1): 39-46.
- [13] 马力群, 窦科峰. 黏附分子 CD44 的研究进展与肝外胆管癌 [J]. 宁夏医学杂志, 2001, 23(1): 60-62.