

丁酸钠对 IPEC-J2 细胞抗菌肽 PR-39 mRNA 表达的影响

孙 健

北京农业职业学院牧医系,北京 102442

摘要 选用不同浓度的丁酸钠对体外培养的 IPEC-J2 进行刺激试验,利用实时荧光定量 PCR 从 mRNA 水平研究不同浓度丁酸钠对仔猪空肠上皮细胞后 PR-39 基因表达的影响,以期研究丁酸钠对仔猪空肠上皮细胞(IPEC-J2)PR39 表达的调控作用。试验结果表明,丁酸钠对 PR-39 基因具有调控作用,随着丁酸钠浓度的增加,PR-39 mRNA 的表达呈现先上升后下降的趋势。

关键词 丁酸钠;PR-39;IPEC-J2 细胞;细胞抗菌肽;表达

抗菌肽又名宿主防御肽,具有抗菌活性强、抗菌谱广、不易产生耐药性等特点,是动物先天免疫系统的重要组成部分,是机体抵抗外来致病因素侵袭的重要屏障,在机体对抗感染及炎症的过程中发挥了重要作用^[1-2]。哺乳动物内源性抗菌肽大致可以分为 Cathelicidins 和 Defensins 两大类。Cathelicidins 家族是目前在动物体内发现的一个最大的抗菌肽家族,PR-39 是 Cathelicidins 家族中富含脯氨酸的小分子肽,具有广谱抗菌活性,可通过抑制细胞内 DNA 和蛋白质的合成来杀灭细菌。能明显抑制大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等 G⁻菌,对巨大芽孢杆菌和化脓性链球菌等 G⁺菌也有较好的抑菌效果。PR-39 在动物机体免疫和组织损伤修复中也发挥了重要的作用^[3]。

抗菌肽的研究为解决抗生素过度使用导致细菌耐药、兽药残留及环境污染等问题带来了希望。但抗菌肽分子小,体内提取纯化存在一定的困难,化学合成法对技术和成本要求比较高,基因工程方法尚不成熟,导致其应用受到限制。有文献报道,多种外源性物质可以不同程度促进内源性抗菌肽的表达^[4],如细菌脂多糖、维生素 A 的代谢产物视黄酸

可以诱导猪 PR-39 的表达^[5];断奶仔猪日粮添加硫酸锌、氧化锌、纳米氧化锌均能诱导 PR-39 mRNA 的表达^[6-7];断奶仔猪日粮添加谷氨酰胺能显著促进骨髓及空肠黏膜 PR-39 mRNA 表达^[8];动物试验表明白术微粉、黄芪杂多糖可显著上调仔猪骨髓中 PR-39 mRNA 表达。以上研究表明通过外源性途径可以有效促进内源性抗菌肽 PR-39 的表达。丁酸钠作为一种新型的饲料添加剂,在结肠细胞分化和增殖、维持动物肠道健康、提高生产性能方面发挥了重要作用,但关于丁酸钠影响抗菌肽 PR-39 的表达的研究相对较少,本研究通过体外细胞试验探讨了丁酸钠对抗菌肽 PR-39 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材 料

1)试验细胞株。猪小肠上皮细胞 IPEC-J2,农业部饲料工业中心惠赠。

2)试验所用主要试剂见表 1。

3)试验所用主要设备见表 2。

1.2 方 法

1)IPEC-J2 细胞培养与丁酸钠添加。①细胞培

收稿日期:2020-08-02

基金项目:北京市教委科技一般项目资助(KM201912448003)

孙 健,男,1980 年生,博士,副教授。

表 1 试验主要试剂

| 试剂名称 | 供应商 |
|------------------------------|---------------------------|
| DEM/F12 培养基 | 美国 Gibco 公司,(41400045) |
| epidermal growth factor | 美国 Peprotech 公司(315-09) |
| HEPES 缓冲液 | 美国 Sigma 公司(H3375) |
| insulin-transferrin-selenium | 美国 Sigma 公司(I3146) |
| 胎牛血清 | 美国 Gibco 公司 |
| Phosphate Buffered Saline 1X | 美国 Hyclone 公司(SH30256.01) |
| 丁酸钠 | 美国 Sigma 公司(303410) |
| 胰酶溶液 | 美国 Gibco 公司 |
| 二甲基亚砜 | 美国 Sigma 公司(D2650) |
| RNA 提取试剂盒 | 北京天根生物科技有限公司 |
| 反转录试剂盒 | 美国 Peprotech 公司 |
| 荧光定量试剂盒 | 北京康为世纪科技有限公司(CW0957M) |

表 2 试验所用主要设备

| 设备名称 | 供应商 |
|-------------|-------------------------|
| 二氧化碳培养箱 | 美国 Thermo(FORMA3110) |
| 超净工作台 | 江苏安泰空气技术有限公司(SW-CJ-1FD) |
| 倒置显微镜 | 日本 Nikon 公司(TS2) |
| PCR 仪 | 美国 BIO-RAD 公司, |
| 荧光定量 PCR 仪 | 美国罗氏公司(Roche LC96) |
| 10 cm 细胞培养皿 | 美国 Corning 公司 |
| 12 孔细胞培养板 | 美国 Corning 公司 |
| 0.22 μm 滤器 | 美国 Corning 公司 |

培养基组成:DMEM/F12+10%FBS+1% insulin-transferrin-selenium+16 mmol/L HEPES+5ng/mL epidermal growth factor。②丁酸钠添加方法:取相同数目细胞接种于六孔板中,5% CO₂ 培养箱中 37 °C 静置培养,至细胞铺满底层 80%时用于试验,吸弃培养液,PBS 洗 2~3 次,加入用无菌去离子水配制的丁酸钠溶液,使试验组培养基内丁酸钠的终浓度分别为(1、2、4、8、16、32 mmol/L),细胞培养 24 h 后,添加含有丁酸钠的培养基,对照组不添加丁酸钠,继续培养 24 h,收集细胞,提取 RNA,定量,反转录得到 cDNA,Q-PCR 进行检测。

2) 丁酸钠刺激后细胞总 RNA 的提取和反转录。RNA 提取按照试剂盒说明书操作。提取的样品

用 1%琼脂糖电泳观察所提 RNA 的质量,用 Nano Drop 测 A_{260 nm} 和 A_{280 nm} 吸光度,以测定 RNA 纯度和浓度。将对照组与丁酸钠处理组提取的总 RNA,根据反转录试剂盒说明书进行反转录,得到 cDNA。以提取的 total RNA 为模板,反转录合成 cDNA 的体系为 20 μL,反应条件为 50 °C 15 min,85 °C 5 s。cDNA 于-20 °C 保存备用。

3)PCR 引物设计与合成。参照 GenBank 中所提供的基因序列设计特异性引物,内参为 GAPDH。目的基因及内参基因引物由北京三博远志生物技术股份有限公司设计合成(表 3)。

4)实时荧光定量 PCR 检测 PR-39 基因 mRNA 表达水平。用荧光定量 PCR 仪检测在不同浓度丁酸

表 3 目的基因及内参基因引物序列

| 基因 | 前端引物 | 后端引物 | 大小/bp |
|-------|----------------------|----------------------|-------|
| GAPDH | CCCCTTCATTGACCTCCACT | TGGAAGATGGTGATGGCCTT | 129 |
| PR39 | CAAGGAGAACGGCGGAGTG | CTTGGTGGAAAAACGGAGGT | 159 |

钠处理后 PR-39 其 mRNA 表达水平, 对每个样品 cDNA 进行目的基因和内参基因荧光定量 PCR 反应。10 μL 反应体系: Mix (2x) 5 μL, Primer-F 0.3 μL, Primer-R 0.3 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 22.4 μL。反应条件: 进行 PCR 扩增, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增反应结束, 根据扩增曲线的 CT 值计算定量结果, 并对数据进行统计学分析。目的基因及内参基因在同一条件下不同管内扩增, 每个样品设 3 个重复。

1.3 数据处理

目的基因的相对表达量采用 $\Delta\Delta CT$ 法计算: $\Delta CT(\text{目的基因}) = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因})$; $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{丁酸钠刺激组}) - \Delta CT(\text{对照组})$ 目的基因的相对表达水平 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。实时荧光定量 PCR 结果均用“平均值 ± 标准误 (Means ± SE)”表示, 其中各基因的表达量所示结果均经内参基因表达量的校正。采用 GraphPad Prism 8 分析做图。

2 结果与分析

2.1 猪小肠上皮细胞总 RNA 的检测

所提取的 Total RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, RNA 样品电泳条带清晰。紫外分光光度计检测样品 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$, 比值在 1.8~2.0, 表明无 DNA 残留, 无蛋白污染, 可以满足试验要求。

2.2 不同浓度丁酸钠对 PR39 表达的影响

不同浓度的丁酸钠对 PR39 表达的影响结果如图 1, 可见 1、2、4、8、16、32 mmol/L 丁酸钠处理组 PR-39 表达均高于对照组, 8 mmol/L 丁酸钠处理组 PR-39 表达最高, 丁酸钠浓度与 IPEC-J2 细胞 PR-39 表达呈现先上升后下降的趋势。

3 讨论

丁酸是一种短链脂肪酸, 诸多研究表明其在调整胃肠道微生态平衡、预防肠道感染以及减轻胃肠道炎症反应等方面发挥了重要作用, 近年来发现丁酸钠还可诱导肠道多种抗菌肽的表达^[9]。从本次试

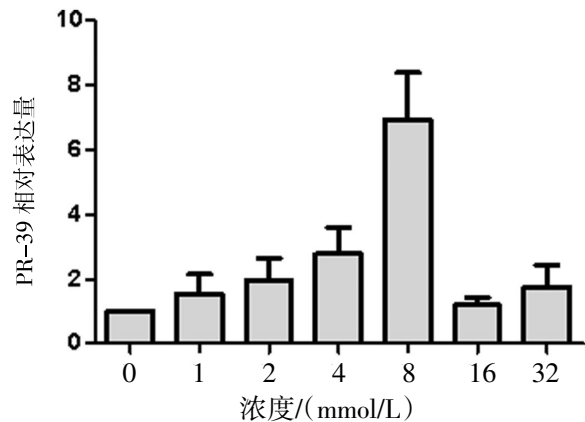


图 1 不同浓度的丁酸钠对 PR-39 表达的影响结果

验结果来看, 丁酸钠可影响抗菌肽 Cathelicidins 家族的重要组成部分——PR-39 的表达, 这与 Hase、Markus 等人报道的丁酸盐能诱导 Cathelicidins 家族抗菌肽表达的结论一致^[10-11]。

丁酸钠对 PR-39 基因表达的调控作用与丁酸钠的浓度有密切关系。在一定浓度范围内, PR-39 基因表达与丁酸钠的浓度呈正相关, 但随着丁酸钠浓度 (16、32 mmol/L) 的进一步升高, PR-39 基因的表达量逐步降低。有研究表明, 丁酸盐通过提高核激素受体 VDR、p38MAPK、ERK1/2 等活性, 上调 cathelicidins 家族抗菌肽基因的表达^[11-12]。PR-39 作为 cathelicidins 家族的重要成员, 丁酸钠对其调控的机理可能与上述机理相同, 但随着丁酸钠浓度的上升, PR-39 基因表达呈现先上升后下降的趋势尚待进一步研究。

另有研究表明, 细菌脂多糖能诱导猪骨髓细胞抗菌肽 PR-39 基因的表达, 3 h 时 PR-39 基因转录水平提高, 6 h 时达到最大值, 12 h 以后转录水平下降^[5]。但由于本试验只在 IPEC-J2 细胞丁酸钠处理 24 h 后进行检测, 未进行时间依赖性试验, 故未能做出结论。

参考文献

[1] 汪以真. 动物源抗菌肽的研究现状和展望 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 2934-2941.

张家口地区引种 22 个苜蓿品种 不同刈割期的性状表现

王文涛¹ 丁洁¹ 赵浩波¹ 杨志敏¹ 李峰¹ 刘建成¹

王运涛² 黄金山¹ 李广有¹ 通文海¹ 郭亚丽¹

1.河北省张家口市农业科学院,河北张家口 075000;2.张家口学院,河北张家口 075000

摘要 为了筛选出适合张家口地区种植的苜蓿品种,从国内苜蓿主产区引进不同休眠级别的紫花苜蓿品种进行适应性试验,研究不同品种不同刈割期茎叶比及生物学产量的变化,以期苜蓿在张家口地区的引种与生产发展提供指导。试验结果显示,在张家口地区产量表现好的是中国农业科学院草原所的敖汉、甘肃农业大学草业学院的甘农 3 号;适口性表现较好的是中国农业科学院草原所的中草 3 号、黑龙江省畜牧研究所的龙牧 803 号品种,可作为当地苜蓿品种示范推广。

关键词 苜蓿品种;不同刈割期;张家口地区;性状

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 又名苜蓿,俗称金花菜,为豆科草本植物,有着“牧草之王”美称,一般在我国华北、东北以及西北地区种植^[1-3]。据报道,紫花苜蓿不仅包含黄酮类、皂甙类等具有抗菌、抗氧

化、免疫调节、降低胆固醇等多种活性化学成分,同时营养价值很高,富含维生素 A、B₆ 等不同维生素,钙、铁等矿物质以及 300 多种植物营养素^[4-5]。苜蓿草为多年生草本植物,主根长,多分枝。茎通常直

收稿日期:2020-09-03

王文涛,女,1964 年生,研究员。

[2] WESSELY -SZPONDER J, MAJER -DZIEDZIC B, SMOLIRA A. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils [J]. Journal of microbiological methods, 2010, 83(1): 8-12.

[3] 周灿, 赵玉蓉, 贺建华, 等. 抗菌肽 PR-39 的研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2007(3): 3-6.

[4] CAMPBELL Y, FANTACONE M L, GOMBART A F. Regulation of antimicrobial peptide gene expression by nutrients and by-products of microbial metabolism [J]. European journal of nutrition, 2012, 51(8): 899-907.

[5] HUA W, GUO L Z, JERNEST M, et al. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin -6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection [J]. Infection and immunity, 2000, 8(10): 5552-5558.

[6] 汪以真, 王静华, 林文学, 等. 不同锌源对断奶仔猪抗菌肽 PR-39 mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 523-526.

[7] 赵燕飞, 汪以真, 林文学. 锌对断奶后不同阶段仔猪抗菌肽 PR-

39 mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(4): 10-13.

[8] 赵玉蓉, 王红权, 贺建华, 等. 谷氨酰胺对断奶仔猪抗菌肽 PR-39 mRNA 的表达调控[J]. 动物营养学报, 2009, 21(4): 567-572.

[9] ZENG X, SUNKARA L T, JIANG W, et al. Induction of porcine host defense peptide gene expression by short-chain fatty acids and their analogs[J]. Plos one, 2013, 8(8): e72922.

[10] HASE K, ECKMANN L, LEOPARD J D, et al. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. [J]. Infection and immunity, 2002, 70(2): 953-63.

[11] SCHWAB M, REYNDERS V, SHASTRI Y, et al. Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells [J]. Molecular immunology, 2007, 44(8): 2107-2114.

[12] 雷剑, 王敏奇, 李卫芬. 家畜内源性 Cathelicidin 抗菌肽的表达调控及其生物学作用[J]. 中国饲料, 2007(24): 25-29.

【责任编辑:胡敏】