

丁酸钠对 IPEC-J2 细胞 β -防御素表达的调节作用

孙 健¹ 高 敏²

1.北京农业职业学院牧医系,北京 102442;2.中国农业大学动物医学院,北京 100083

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 水平分别研究不同浓度丁酸钠刺激猪小肠上皮细胞后 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 基因表达水平的差异,以期研究丁酸钠对猪小肠上皮细胞(IPEC-J2) β -防御素(*pBD*)表达的调节作用。试验结果表明,丁酸钠对 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 基因调控作用存在差异,丁酸钠对 *pBD3* 基因调控最为显著,不同浓度丁酸钠均能上调 *pBD3* mRNA 的表达,并呈现一定的剂量依赖性。

关键词 丁酸钠; β -防御素; IPEC-J2 细胞

抗生素在防治仔猪早期断奶综合征、消化道疾病,保障动物健康方面发挥了重要作用^[1-2],但抗生素的不当使用破坏了动物肠道的微生态平衡,造成了病原菌耐药和畜产品的兽药残留等问题,严重影响畜产品的品质和人类的健康^[3]。尤其是近年来“限抗令”的颁布,寻找新的防治消化道疾病的方案已迫在眉睫。抗菌肽作为动物机体天然免疫系统的重要组成部分,具有抗菌活性强、抗菌谱广、无耐药性、无残留和毒性小等优点^[4-5],在机体对抗感染及炎症的过程中发挥了重要作用。防御素是抗菌肽家族的重要成员^[6], β 防御素是猪体内一类重要的内源性抗菌肽,是抵御病原微生物侵袭的一道重要防线^[7],在天然免疫中起着重要作用。最近研究发现所有防御素中 β 防御素的分布区域最广,大多数猪源 β -防御素(*porcine β -defensin, pBD*)是良好的抗生素替代品,在猪消化系统、生殖系统、呼吸系统等组织黏膜和上皮细胞中大量表达^[8],*pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 是 β -防御素家族中最为常见的 3 种。

丁酸钠(丁酸)在维持动物肠道健康、提高动物生产性能方面发挥了重要作用,2003 年丁酸钠被农

业农村部列入《饲料添加剂品种目录》,具有良好的应用前景。猪空肠上皮细胞(IPEC-J2)具有典型的猪小肠上皮细胞特性^[7]。因此,本研究以猪空肠上皮细胞 IPEC-J2 为模型,进行不同浓度的丁酸钠对体外培养的 IPEC-J2 的剂量依赖性刺激试验,利用实时荧光定量 PCR 从 mRNA 水平分别研究不同浓度丁酸钠刺激猪小肠上皮细胞后 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 基因表达水平的差异。

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)主要试剂。DEM/F12 培养基,购自美国 Gibco 公司;epidermal growth factor, 购自美国 Peptrotech 公司;HEPES 缓冲液,购自美国 sigma 公司;胎牛血清,购自美国 Gibco 公司;Phosphate Buffered Saline 1X, 购自美国 Hyclone 公司;胰酶溶液,购自美国 GIBCO 公司;二甲基亚砜,购自美国 Sigma 公司;丁酸钠,购自 sigma 公司;RNA 提取试剂盒,购自北京

收稿日期:2020-05-01

基金项目:北京市教委科技一般项目(KM201912448003)

孙 健,男,1980 年生,博士,副教授。

天根生物科技公司;反转录试剂盒,购自 Proteintech 公司;荧光定量试剂盒购自北京康为世纪科技有限公司。

3)主要设备。二氧化碳培养箱(FORMA3110,美国 Thermo);超净工作台(SW-CJ-1FD,江苏安泰空气技术有限公司);倒置显微镜(TS2,日本 Nikon 公司);PCR 仪(美国 BIO-RAD);荧光定量 PCR 仪(Roche LC96,美国罗氏公司);10 cm 细胞培养皿、12 孔培养板、0.22 μm 滤膜,均购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1)IPEC-J2 细胞培养与丁酸钠添加。细胞培养基组成:DMEM/F12+10% FBS+1% insulin-transferin-selenium+16 mmol/L HEPES+5 ng/mL epidermal growth factor。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丁酸钠溶液,使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后继续培养 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。以提取的总 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 Gen-Bank 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生工生物工程(北京)股份有限公司设计合成(表 1)。

4)实时荧光定量 PCR 检测 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 基因 mRNA 表达水平。用荧光定量 PCR 仪检测在不

同浓度丁酸钠处理后 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* 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。20 μL 反应体系:Mix(2X) 10 μL,Primer-F 1 μL,Primer-R 1 μL,cDNA 4 μL,ddH₂O 4 μL。反应条件:进行 PCR 扩增,95 °C 预变性;95 °C 10 min,58 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环。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 2 个重复。

1.3 数据处理

目的基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCT} 法计算:ΔCT(目的基因)=CT(目的基因)-CT(内参基因);ΔΔCT=ΔCT(丁酸钠刺激组)-ΔCT(对照组)目的基因的相对表达水平=2^{-ΔΔCT}。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 分析作图,采用 SPSS 15.0 的单因素 ANOVA 过程进行方差分析,以 P<0.05 为显著性标准。

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 nm}/A_{280 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 IPEC-J2 细胞 *pBD1* 表达的影响

分别用不同浓度的丁酸钠刺激猪小肠上皮细胞,24 h 后收集细胞,提取总 RNA,反转录后 Q-PCR 检测 *pBD1*、*pBD2*、*pBD3* mRNA 的表达。不同浓度丁酸钠对 *pBD1* 表达的影响结果如图 1,可见 1、2、4 mmol/L 丁酸钠处理组,*pBD1* 表达与对照组没有显著性差异。

2.3 不同浓度丁酸钠对 *pBD2* 表达的影响

不同浓度丁酸钠对 *pBD2* 表达的影响结果如

表 1 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
<i>GAPDH</i>	CCCCTTCATTGACCTCCACT	TGGAAGATGCTGATGGCCTT	129
<i>pBD1</i>	TTCCTCCTCATGGTCTCTGTT	AGGTGCCGATCTGTTTCATC	130
<i>pBD2</i>	TGTCTGCCTCCTCTCTTCC	AACAGGTCCCTTCAATCCTG	149
<i>pBD3</i>	CCTTCTCTTTGCCTTGCTCTT	GCCACTCACAGAACAGCTACC	163

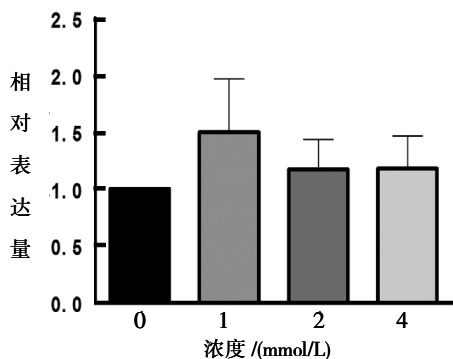


图 1 不同浓度丁酸钠对 pBD1 表达的影响

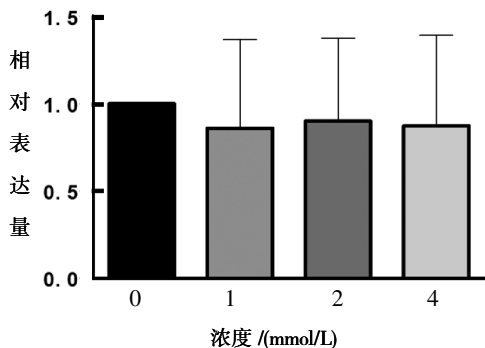


图 2 不同浓度丁酸钠对 pBD2 表达的影响

图 2。可见 1、2、4 mmol/L 丁酸钠处理组, pBD2 表达与对照组没有显著性差异。

2.4 不同浓度丁酸钠对 pBD3 表达的影响

不同浓度的丁酸钠对 pBD3 表达的影响结果如图 3。可见 1、2、4 mmol/L 丁酸钠处理组, pBD3 表达均显著高于对照组, 4 mmol/L 丁酸钠处理组 pBD3 表达最高, 丁酸钠浓度与 IPEC-J2 细胞 pBD3 表达呈现正相关。

3 讨论

丁酸钠制剂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, 丁酸钠作为肠道免疫调节剂和黏膜免疫佐剂, 已广泛用于畜禽饲料中以提高动物生产性能。从本次试验结果来看, 丁酸钠对常见的 pBD1、pBD2、pBD3 3 种猪源 β 防御素的调控作用并不一致, 丁酸钠对 pBD1、pBD2 调控作用不明显。研究还表明丁酸钠对 IPEC-J2 细胞 pBD3 的表达有调控作用, 可以诱导防御素 pBD3 的表达, 而且调控作用与丁酸钠的浓度有密切关系, 在本试验丁酸钠设定的浓度范围内呈正相关, 这与 Zeng 等^[9]报道一致。另有研究表明, 丁酸盐能够短时间内显著提高 A549

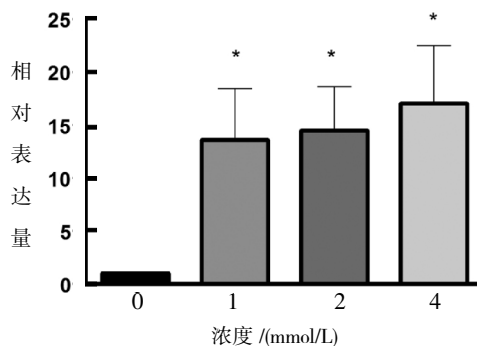


图 3 不同浓度丁酸钠对 pBD3 表达的影响

细胞抗菌肽 hBD-1 的表达^[10], 且 hBD-1 的表达量在丁酸盐处理后的 36~48 h 最高, 但由于本试验只进行了 IPEC-J2 细胞丁酸钠处理 24 h 后检测, 未进行时间依赖性试验, 故不能给出结论。

参 考 文 献

- [1] 寇莎莎, 王诏升, 徐德旺. 日粮中添加不同水平丁酸钠对断奶仔猪生长性能、腹泻率及血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(7): 1841-1848.
- [2] 潘加红, 彭艳, 谢飞. 丁酸钠在养猪生产中的应用效果及作用机理研究进展[J]. 饲料广角, 2017(2): 48-51.
- [3] RAMANATHAN B, WU H, ROSS C R, et al. PR-39, a porcine antimicrobial peptide, inhibits apoptosis: involvement of caspase-3 [J]. Developmental & comparative immunology, 2004, 28(2): 163-169.
- [4] 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.
- [5] 罗洽华, 周洪波, 苏向东, 等. 抗菌肽饲料添加剂对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 当代畜牧, 2009(7): 23-24.
- [6] KIM C, KAUFMANN S H E. Defensin: a multifunctional molecule lives up to its versatile name [J]. Trends in microbiology, 2006, 14(10): 428-431.
- [7] SELSTED M E, OUELLETTE A J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response [J]. Nature immunology, 2005, 6(6): 551-557.
- [8] 梁钰, 张坤, 王梦云, 等. 猪 β 防御素研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(8): 2346-2353.
- [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] YIN L, CHUNG W. Epigenetic regulation of human β-defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria [J]. Mucosal immunol, 2011, 4(4): 409-419.