

# L-精氨酸对 IPEC-J2 细胞 $\beta$ -防御素和 PR39 基因表达的影响

孙 健<sup>1</sup> 高 敏<sup>2</sup> 李 璟<sup>1</sup> 郑 宇<sup>3</sup>

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; 3. 北京市房山区新农村建设服务中心, 北京 102440

**摘要** 本试验分别采用高、中、低 3 个浓度精氨酸(高质量浓度 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中质量浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、低质量浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理体外培养的 IPEC-J2 细胞 24 h 后, 利用荧光定量 PCR 技术分别检测精氨酸对猪小肠上皮细胞  $\beta$ -防御素(*pBD1*、*pBD2*、*pBD3*)基因和 PR39 基因表达水平的影响。试验结果显示: 不同浓度精氨酸均能不同程度上调  $\beta$ -防御素的表达, 调控作用与剂量有一定的相关性, 而在本试验中精氨酸对 PR39 mRNA 表达的调控作用不明显。

**关键词** 精氨酸;  $\beta$ -防御素 3; IPEC-J2 细胞

抗生素在防治仔猪断奶应激及消化系统疾病方面发挥了重要作用, 但抗生素的不当使用和滥用也引起了病原菌耐药、兽药残留和环境污染等问题。为了消除抗生素滥用带来的系列问题, 国家实施了饲料端“禁抗”、养殖端“限抗”的政策, 因此, 在生产实践中寻找抗生素替代品已变得极为迫切。

抗菌肽, 又称为宿主防御肽, 可保护肠道免受外来病原体的侵袭, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤作用, 由于其具有抗菌谱广、不易产生耐药性等特点, 被认为是“替抗”或“减抗”的希望<sup>[1]</sup>。但由于生产成本及技术方面的原因, 抗菌肽尚不能大规模生产。精氨酸作为一种半必需氨基酸, 在维持肠道物理屏障功能、缓解氧化应激损伤和增强免疫

方面具有重要作用<sup>[2]</sup>。有研究<sup>[3-4]</sup>表明, 氨基酸、益生菌、维生素和多糖类等日粮中的营养成分可不同程度诱导抗菌肽的表达, 但精氨酸作为抗菌肽诱导剂诱导猪肠道抗菌肽表达的研究尚不多见。因此, 本试验拟通过细胞试验验证精氨酸对抗菌肽表达的诱导作用, 研究精氨酸对抗菌肽  $\beta$ -防御素-1(*pBD1*)、 $\beta$ -防御素-2(*pBD2*)和  $\beta$ -防御素-3(*pBD3*)和 PR39 基因表达的影响, 旨在为抗菌肽进一步用于生产实践提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1) 主要试剂。IPEC-J2 细胞由农业农村部饲料

收稿日期: 2021-02-24

基金项目: 北京农业职业学院科技创新项目(XY-YF-20-03)

孙 健, 男, 1980 年生, 博士, 副教授。

[5] 齐超. 基于大学生就业竞争力的就业文化建设研究[J]. 锦州医科大学学报(社会科学版), 2017, 15(4): 92-94

[6] 张志宇. 大学生就业文化的结构要素与建设路径[J]. 教育理论与实践, 2015, 35(30): 14-16.

[7] 李少华. 乡村振兴战略视野下大学生乡村就业创业引导基金建设研究[J]. 农业经济, 2020, 398(6): 110-112.

[8] 孙琴. 乡村振兴战略下农业类高职院校资助育人与创业就

业教育融合创新的探索[J]. 现代农机, 2020, 156(4): 32-33.

[9] 杨敏. 思想政治教育在新时代农科类大学生就业中的作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.

[10] 曾晨. 乡村振兴背景下农职业院校毕业生农村基层就业引导机制构建研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2019, 21(6): 43-46.

【责任编辑: 刘少雷】

工业中心惠赠;DEM/F12培养基、胎牛血清、L-精氨酸、胰酶溶液,购自美国Gibco公司;RNA提取试剂盒、反转录试剂盒购自北京天根生物科技公司;荧光定量试剂盒,购自北京康为世纪科技有限公司(CW0957M)。

2)主要设备。二氧化碳培养箱,购自美国Thermo公司;超净工作台,购自江苏安泰空气技术有限公司;倒置显微镜,购自日本Nikon公司;PCR仪,购自美国BIO-RAD公司;荧光定量PCR仪,购自美国罗氏公司。

### 1.2 方法

1)IPEC-J2细胞培养与精氨酸添加。IPEC-J2细胞铺满6孔板底层80%时用于试验,分为试验组和对照组,对照组细胞不做任何处理,试验组细胞培养至细胞铺满底层80%时更换培养基,添加精氨酸,使培养基内L-精氨酸的终质量浓度分别为200、100、50 μg/mL,每个浓度设3个重复孔,继续培养24 h,收集细胞。

2)细胞总RNA的提取与反转录。严格按总RNA提取试剂盒说明书操作,用Nano Drop测定RNA纯度和浓度,样品A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub>比值为1.8~2.0,保存备用。用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。电泳条带清晰者,按照反转录试剂盒说明书进行反转录,得到cDNA,-20℃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,目的基因与内参基因引物由公司合成(表1)。

4)荧光定量PCR检测*pBD1*、*pBD2*、*pBD3*和*PR39*基因mRNA表达水平。用荧光定量PCR仪检测对照组和试验组*pBD1*、*pBD2*、*pBD3*和*PR39*基因表达水平,采用20 μL体系(表2),反应条件:95℃预变性10 min,58℃30 s,72℃30 s,40个循环,每个样品设3个重复。

5)数据处理。按照基因的相对表达水平=2<sup>-ΔΔCT</sup>,计算对照组与试验组相对表达水平,采用GraphPad Prism 8分析做图。

表1 目的基因与内参基因引物序列

基因	前端引物	后端引物	大小/bp
<i>GAPDH</i>	CCCCTTCATGACCTCCACT	TGGAAGATGGTGATGGCCCTT	129
<i>pBD1</i>	TTCCTCCTCATGGTCTCTGTT	AGGTGCCGATCTGTTCATC	130
<i>pBD2</i>	TGTCTGCCTCCTCTCTTCC	AACAGGTCCCTTCAATCCTG	149
<i>pBD3</i>	CCTTCTCTTTGCCTTGCTCTT	GCCACTCACAGAACAGCTACC	163
<i>PR39</i>	CAAGGAGAACGGGCGAGTG	CTTGGTGGGAAAAACGGAGGT	159

表2 荧光量PCR反应体系

试剂	使用量/μL
Mix(2X)	10
Primer-F	1
Primer-R	1
cDNA	4
ddH <sub>2</sub> O	4

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度精氨酸对β-防御素-1表达的影响

200、100、50 μg/mL 3个质量浓度精氨酸均可促进*pBD1*的表达,并呈现先上升后下降的趋势(图1)。

### 2.2 不同浓度精氨酸对β-防御素-2表达的影响

200、100、50 μg/mL 3个质量浓度精氨酸均可促进β-防御素-2的表达,并且与培养基中添加精氨酸的浓度呈正相关(图2)。

### 2.3 不同浓度精氨酸对β-防御素3表达的影响

200、100、50 μg/mL 3个质量浓度精氨酸均可促进*pBD3*的表达,中质量浓度的精氨酸对*pBD3*的表达的诱导作用最强(图3)。

### 2.4 不同浓度精氨酸对*PR39*表达的影响

200、100、50 μg/mL 3个质量浓度的精氨酸对*PR-39*表达的调控作用不明显(图4)。

## 3 讨论

β-防御素在肠道疾病发生过程中发挥了重要作用,其水平的降低或功能障碍有可能导致炎症性肠病。

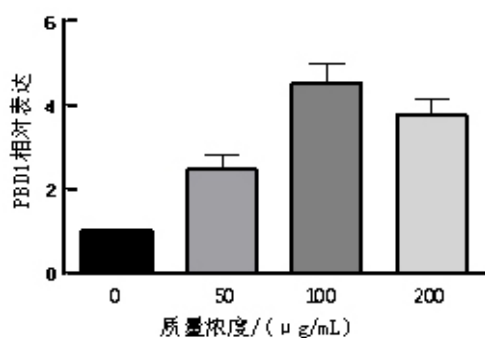


图1 不同浓度精氨酸对pBD-1表达的影响

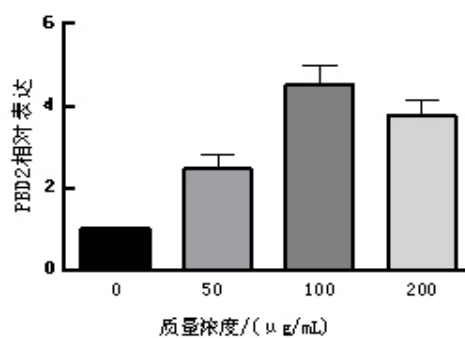


图2 不同浓度精氨酸对pBD-2表达的影响

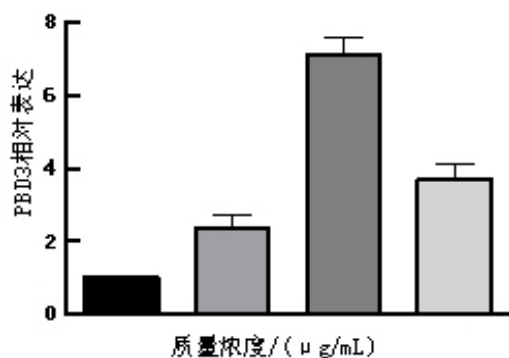


图3 不同浓度精氨酸对pBD-3表达的影响

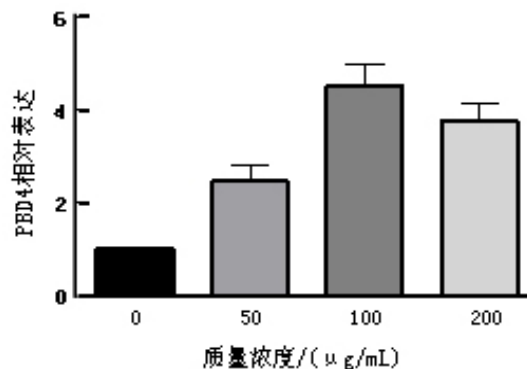


图4 不同浓度精氨酸对PR39表达的影响

从本试验结果来看, L-精氨酸对 IPEC-J2 细胞  $\beta$  防御素基因的表达具有明显诱导作用, 而且调控作用与精氨酸的浓度呈一定的相关性, 尤其是  $\beta$ -防御素-2 的表达受 L-精氨酸的调控作用更为明显。Han 等<sup>[5]</sup>研究发现, 结肠炎模型小鼠日粮中添加猪  $\beta$ -防御素-2 可降低炎症因子的产生, 提高紧密连接蛋白、黏蛋白转录水平, 减轻炎症反应。从本试验结果来看, 通过日粮营养物质可以调控内源抗菌肽的表达水平, 该方法或许是防治炎症性肠病的策略之一<sup>[6]</sup>。

精氨酸对 IPEC-J2 细胞  $\beta$  防御素基因表达的调控作用要比 PR39 明显, 这说明不同抗菌肽基因对内源性物质的调控敏感性存在差异, 其机理和作用途径也存在显著差异。Lan 等<sup>[6]</sup>研究发现, 精氨酸可通过诱导防御素的表达来缓解 LPS 诱导的炎症性肠病, 其作用途径可能与精氨酸激活 mTOR 有关<sup>[6]</sup>, 但其作用机理尚需进一步研究。

### 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.

- [2] 高楠, 窦秀静, 杨洋, 等. 氨基酸在炎症性肠病中的作用及其信号通路[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(10): 2349-2358.
- [3] WU J, MA N, JOHNSTON L J, et al. Dietary nutrients mediate intestinal host defense peptide expression[J]. *Advances in nutrition*, 2020, 11(1): 92-102.
- [4] 陈永宏, 罗芳, 陶金忠. 营养物质对动物内源性宿主防御肽表达的调节作用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(8): 1775-1783.
- [5] HAN F, ZHANG H, XIA X, et al. Porcine  $\beta$ -defensin 2 attenuates inflammation and mucosal lesions in dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. *Journal of immunology*, 2015, 194(4): 1882.
- [6] LAN J, DOU X, LI J, et al. L-Arginine ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation through inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B and MAPK pathways and stimulating  $\beta$ -defensin expression *in vivo* and *in vitro*. [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2020, 68(9): 2648-2663.

【责任编辑: 胡 敏】