

禽网状内皮组织增生症病毒感染肉鸡中 鸡白细胞介素 18 的定量检测

孔 斌¹, 陈雪锋¹, 唐德宏², 胡敬东^{1*}

(1. 山东农业大学动物医学院 山东省动物生物技术与疫病防治重点实验室, 泰安 271018;

2. 泰安市动物疫病预防控制中心, 泰安 271000)

摘 要: 建立并利用鸡白细胞介素 18 (Chicken interleukin-18, ChIL-18) 荧光定量 RT-PCR 方法, 对禽网状内皮组织增生症病毒 (Reticuloendotheliosis virus, REV) 感染肉鸡后主要免疫器官的 IL-18 mRNA 转录水平进行了初步研究。结果表明, 与对照组相比, 处理组脾脏、胸腺和法氏囊中 IL-18 的分泌水平在感染后 7 和 14 d 均显著升高 ($P < 0.05$), 在感染 21、28、35 和 42 d 表达差异均有显著变化 ($P < 0.05$)。本研究为探讨 REV 感染的免疫抑制机理奠定了一定基础。

关键词: 肉鸡; 禽网状内皮组织增生症病毒; 白细胞介素 18; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-0963-04

Quantitative Detection of Chicken IL-18 in Broiler Chickens Infected with Reticuloendotheliosis Virus

KONG Bin¹, CHEN Xue-feng¹, TANG De-hong², HU Jing-dong^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Animal Disease Prevention and Control Center of Tai'an, Tai'an 271000, China)

Abstract: In this study, a real-time reverse-transcription PCR was developed for quantitative analysis of chicken IL-18 mRNA. Then the expression levels of IL-18 mRNA in the primary immune organs of broiler chickens infected with reticuloendotheliosis virus (REV) were investigated by using this method. The results were as follows: IL-18 gene expression levels were significantly higher at day 7, 14 ($P < 0.05$) and were significantly changed at day 21, 28, 35 and 42 ($P < 0.05$) in the spleen, thymus and bursa of Fabricius in broilers chickens from treatment group than those in the control group. Our study laid the foundation for investigating the mechanism of immune suppression of REV infection.

Key words: broiler; reticuloendotheliosis virus; interleukin-18; real-time fluorescent quantitative RT-PCR

白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18), 又称为 IFN- γ 诱导因子 (Interferon-gamma-inducing factor, IGIF), 1995 年由日本学者 Okamura 等^[1] 首先报道, 它是一种具有多向和多层次免疫调节功能的细胞因子, 主要由活化的单核巨噬细胞系统的细胞

产生^[2-3]。

当前, 禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 造成的免疫抑制给我国集约化养鸡业带来了很大危害^[4-5], 了解其免疫抑制机理并制定提高鸡的免疫应答策略正日益受到重视。国内外研究报道^[6-7], REV 感染鸡的 IFN- γ 表达水平会明显升高, 而作为

收稿日期: 2010-12-25

基金项目: 山东省自然科学基金项目资助 (Y2008D12)

作者简介: 孔 斌 (1985-), 男, 山东邹城市人, 硕士生, 主要从事动物传染病诊断与防制研究, E-mail: kongbin.001@163.com

* 通讯作者: 胡敬东, E-mail: hjd1968@163.com

IFN- γ 的诱导因子——IL-18,在其体内的基因表达水平是否也会升高,两者之间又存在何种联系?鉴于此,作者进行了相关研究。

检测细胞因子较常用的方法是 ELISA^[8],但是这种方法难以及时、准确地检测到感染机体细胞因子的表达^[9-11]。实时荧光定量 RT-PCR 是近年来新兴的一种分子生物学检测技术,具有及时、准确、快速、高效、高灵敏度和特异等优点。本研究在建立鸡 IL-18 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的基础上,探讨了其 mRNA 表达水平与 REV 感染之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物、病毒与质粒

禽网状内皮组织增生症病毒(REV)由崔治中教授惠赠;含鸡 IL-18 成熟蛋白基因重组质粒由笔者所在实验室保存;1日龄普通商品肉鸡购于山东泰安大宝有限公司。

1.2 试剂和仪器

SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒、DNA Marker DL500 等,购自大连宝生物工程有限公司;荧光定量 PCR 仪 7500 型,购自美国 ABI 公司;八联管,购自美国 Axygen 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 上登录的鸡白细胞介素 18 (ChIL-18)基因和内参核糖体蛋白亚基 4(RPL4)基因序列,应用 DNASTar 软件设计了 2 对特异性引物,经 BLAST 分析后,送上海生工生物工程有限公司进行合成。ChIL-18 引物如下,P1(上游引物):5'-TTTCGAAACGTCAATAGCCA-3',P2(下游引物):5'-GCCAGATTCACCTCCTGAT-3',预期扩增片段为 93 bp;RPL4 引物如下,P3(上游引物):5'-TCTGCATTTGGACTGAAAGC-3',P4(下游引物):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 \cdot μ L⁻¹ 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 Water 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-18 和 RPL4 基因片段的扩增与鉴定

采用 25 μ L 体系进行 PCR 扩增,取 cDNA 各 5 μ L,分别加入 10 μ mol \cdot L⁻¹ P1、P2 和 P3、P4 引物 2.5 μ L,25 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L,2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,25 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺ 3 μ L 和 0.2 μ L rTaq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,56 $^{\circ}$ C 45 s(ChIL-18)/60 $^{\circ}$ C 45 s(RPL4),72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 4 μ L 扩增产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳,然后经胶回收、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质粒,经 PCR 初步鉴定正确后,将重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序,按文献方法^[12]计算重组质粒的拷贝数,重组质粒即为本研究的阳性标准品。

1.6 IL-18 SYBR Green I 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 II (50 \times)0.4 μ L,上、下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 0.4 μ L,质粒模板 2.0 μ L,灭菌蒸馏水 6.8 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,扩增 40 个循环。为了分析 SYBR Green I PCR 扩增特异性,应对扩增产物制作熔解曲线,反应条件: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(去离子水代替引物及模板)。反应结束后,对获得的信号、数据进行处理,并利用配机软件进行分析,建立标准曲线和熔解曲线。

1.7 动物试验

130 只 1 日龄肉鸡随机分为 2 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 65 只,饲养方式相同,每组分别于 7、14、21、28、35、42 d 随机取 8 只剖杀(每个时间点每组随机取 8 只鸡),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-18 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 3 次,用建立的最优方法进行检测。

1.9 数据处理与分析

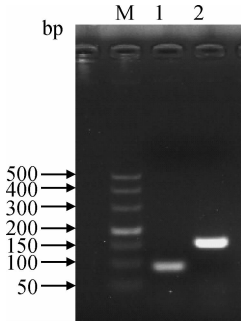
根据比较阈值法^[12]计算出目的基因的相对含量,目的基因的相对含量 = 2 ^{$\Delta\Delta$ Ct}。注释: $\Delta\Delta$ Ct =

$[C_{t_T}-C_{t_{HK}}]_X-[C_{t_T}-C_{t_{HK}}]_0$, 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, 2 组试验结果采用 *t* 检验法进行分析。

2 结果

2.1 IL-18 和内参 RPL4 基因片段的 PCR 扩增

IL-18 和 RPL4 基因片段的 PCR 产物 4 μ L, 于 4% 琼脂糖凝胶上电泳, 结果分别出现 1 条 93、154 bp 左右的 DNA 带(图 1), 与预期大小一致。



M, DL500 Marker; 1, IL-18 基因 PCR 扩增产物; 2, RPL4 基因 PCR 扩增产物

M, DL500 Marker; 1, PCR product of IL-18 gene; 2, PCR product of RPL4 gene

图 1 IL-18 和 RPL4 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 PCR amplification result of IL-18 and RPL4 gene

2.2 IL-18 和 RPL4 基因片段重组质粒的鉴定

对提取的重组质粒进行测序鉴定, 结果 2 基因片段都与 GenBank 上已发表的序列完全一致。

2.3 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 熔解曲线的建立

熔解曲线(图 2)分析表明, 该方法扩增的目的基因(IL-18)和内参基因(RPL4)均具有特异性, 只出现各自的单一峰, 无引物二聚体或其他非特异性产物生成。

2.4 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

该方法具有较高的灵敏度, IL-18 的检测下限为 100 copies \cdot μ L⁻¹, 建立的标准曲线斜率分别为 -3.16(IL-18)和 -3.15(RPL4), 2 基因的扩增效率均在 107% 左右, 其相关系数也均在 0.99 以上, 符合比较阈值法相对定量分析的前提, 检测所得 Ct 值可按比较阈值法分析。

2.5 IL-18 基因荧光定量的表达水平

本试验将对对照组 7 d 时 IL-18 基因的表达量作

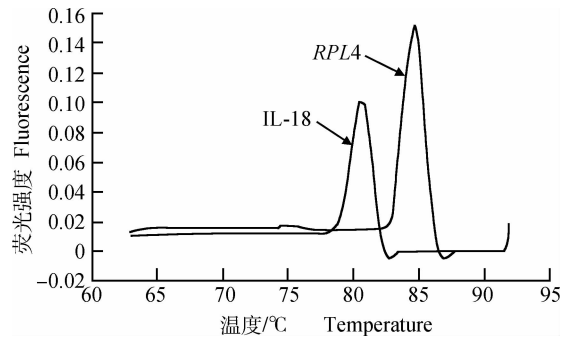


图 2 IL-18 和 RPL4 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 2 Real-time quantitative PCR melting curve of IL-18 and RPL4

为参照因子, 处理组及其他时期 IL-18 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-18 基因进行均一化处理, 鸡免疫器官 IL-18 基因的相对表达情况见图 3。

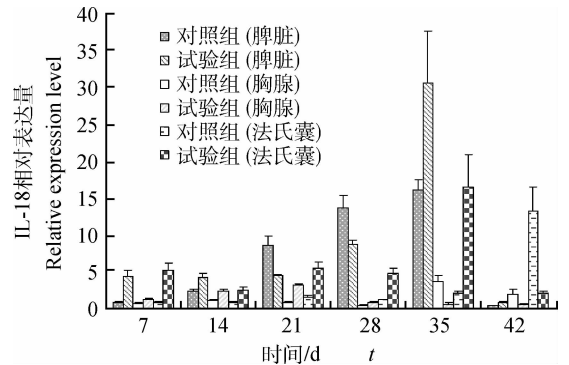


图 3 主要免疫器官 IL-18 基因在不同时间点的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of IL-18 in the primary immune organs at different time points

图 3 显示, 处理组与对照组相比, 在 7 d 和 14 d 时, 3 个免疫器官的 IL-18 基因表达量显著升高 ($P < 0.05$); 在 21 d 和 28 d 时, 脾脏中 IL-18 基因表达显著降低 ($P < 0.05$), 而胸腺和法氏囊中却显著升高 ($P < 0.05$); 在 35 d 和 42 d 时, 脾脏中 IL-18 表达量水平显著升高 ($P < 0.05$), 胸腺中又显著下降 ($P < 0.05$), 而法氏囊中分别是显著性升高和下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

有研究表明^[9-10, 13], 一些病原引起的免疫抑制与细胞因子分泌水平和表达异常有关。REV 转化细胞系可分泌较高水平的 IFN- γ , 在这些细胞系里存在一种 *v-rel* 可上调基因的表达。然而, REV-SNV 株缺乏

v-rel 基因,CS株也缺乏此基因。因此,一定还存在另一种 IFN- γ 的诱生机制。不仅如此,REV感染鸡的 IFN- γ mRNA 水平也会明显升高。Markowski-Grimsrud 和 Schat^[6]用 RT-PCR 方法对 REV(REV-CS 株)感染鸡的 IFN- γ mRNA 水平进行了检测,发现 9~10 日龄或 30 日龄鸡产生的 IFN- γ mRNA 水平与对照鸡的相比增长了 10 倍。国内李广兴等^[14]曾就 REV 感染对 IL-2 及 IFN 的诱生活性做了检测。作为 IFN- γ 诱生因子的 IL-18,很可能与 REV 感染过程中对 IFN- γ 的强诱导有一定关系。

本研究利用所建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法初步检测了 REV 感染普通商品肉鸡 3 种主要免疫器官在不同时期的 IL-18 基因转录水平。结果发现,同一日龄处理组与正常对照组相比确实存在显著差异,7 d 和 14 d 的 REV 感染鸡 3 种免疫器官 IL-18 mRNA 水平明显升高;21 日龄、28 日龄时则在脾脏中显著下降,在胸腺和法氏囊中却显著升高;在 35 和 42 日龄时,脾脏中 IL-18 表达量水平显著升高,胸腺中又显著下降,而法氏囊中分别是显著性升高和下降。初步分析,IL-18 在 7 日龄和 14 日龄时表达量升高可能是由于接种的 REV 短时间内诱导 3 种免疫器官 T 细胞被激活,引起细胞因子 IL-18 基因表达上调来加强机体免疫功能;而在后期的 4 个时间点,3 种免疫器官 IL-18 表达量则呈现升高或下降。

据郑玉姝等^[7]报道,用 REV 接种 5 日龄 SPF 鸡,从感染后 7~28 d,脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的表达水平明显升高,而在本研究中,REV 感染 7 日龄到 28 日龄鸡胸腺和法氏囊的 IL-18 转录水平也明显升高,7 日龄和 14 日龄时脾脏 IL-18 同样显著性增加,尽管鸡 28 日龄脾脏的结果不符合预期,我们仍然有理由相信 IL-18 与 IFN- γ 之间在 REV 感染过程中确实存在一定的正相关性。

Kaiser 等^[15]研究发现,IFN- γ mRNA 的表达是和 MDV 增殖相一致的,同时 IL-6 和 IL-18 均有很高的转录水平。Quere 等^[16]的研究结论为干扰素的产生与肿瘤的发生有密切关系。因此,可以推断 IL-18 基因转录水平的升高与 REV 感染致瘤造成的免疫抑制同样有着紧密的联系。

参考文献:

- [1] OKAMURA H, TSUTSUI H, KOMATSU T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells[J]. *Nature*, 1995, 378(11): 88-91.
- [2] 刘文强. 白细胞介素 18 研究进展[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(4): 83-86.
- [3] GIANSAANTI F, Giardi M F, BOTTI D. Avian cytokines-an overview [J]. *Current Pharmaceutical De-*
- [4] 崔治中. 免疫抑制性病毒多重感染在鸡群疫病发生和流行中的作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(5): 417-421.
- [5] 贺 帅. 网状内皮组织增殖病研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2010, (4): 19-20.
- [6] MARKOWSKI-GRIMSRUD C J, SCHAT K A. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. *Immunology*, 2003, 109(2): 283-294.
- [7] 郑玉姝, 赵宏坤, 崔治中. 禽网状内皮组织增生病病毒感染 SPF 鸡对脾细胞中产生 IFN- γ 的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(1): 112-114.
- [8] GARBA M L, FLELINGER J A. Intracellular cytokine staining for TGF- β [J]. *Immunol Methods*, 2001, 258(1/2): 193-198.
- [9] 郑玉姝, 赵 朴, 赵宏坤, 等. 细胞因子的检测及其在鸡免疫抑制病中的应用[J]. *中国家禽*, 2006, 28(20): 96-98.
- [10] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCHX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386-401.
- [11] PAYAN R R, MEDINA M A, PARRA S E, et al. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(5): 439-445.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] ZHENG Y S, CUI Z Z, ZHAO H K. Effects of reticuloendotheliosis virus infection and co-infection on IFN-gamma production in SPF chickens [J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69(2): 213-216.
- [14] 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.
- [15] KAISER P, UNDERWOOD G, DAVISON F. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease [J]. *Virology*, 2003, 77(1): 762-768.
- [16] QUERE P, RIVAS C, ESTER K, et al. Abundance of IFN-alpha and IFN-gamma mRNA in blood of resistant and susceptible chickens infected with Marek's disease virus (MDV) or vaccinated with turkey herpesvirus; and MDV inhibition of subsequent induction of IFN gene transcription [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(3): 507-519.