

雏鸭肝炎病毒感染后鸭 $CD8\alpha$ 基因及其通路 相关基因表达变化

徐 琪¹, 陈 阳¹, 黄正洋¹, 童一字¹, 荣光辉¹, 赵文明¹, 张 扬¹, 李 秀¹,
段修军², 陈国宏^{1*}

(1. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009; 2. 国家水禽种质资源基因库, 泰州 225300)

摘 要: 本研究旨在了解雏鸭肝炎病毒感染后鸭 $CD8\alpha$ 基因及其通路相关基因表达变化。通过对 3 日龄无母源抗体的金定鸭雏鸭感染雏鸭肝炎病毒(DHV), 构建雏鸭肝炎感染实验动物模型, 对雏鸭肝炎病毒发病组、未发病组 and 对照组的胸腺、肝脏、脾脏、肺、肾脏、大脑、小脑等组织 $CD8\alpha$ 基因及其信号通路上 MHC I、MHC II、TNF- α 等基因进行 RT-qPCR 检测。结果表明: 在攻毒组(发病组和未发病组)扩增出 DHV 3D 基因的保守区域特异性条带, 表明成功构建了雏鸭肝炎感染模型 $CD8\alpha$ 基因, RT-qPCR 结果显示, $CD8\alpha$ 、MHC I 和 MHC II 基因在发病组各组织表现为不同程度的下调, 在未发病组表现为不同程度的上调; 而 TNF α 在发病组和非发病组的肝、脾、肺和肾等组织中表现为不同程度的上调。研究揭示了雏鸭肝炎病毒感染后 $CD8\alpha$ 基因及其通路相关基因表达变化, 其结果有助于更好地了解 $CD8\alpha$ 基因在细胞免疫中表达调控作用。

关键词: 鸭; $CD8\alpha$ 基因; 雏鸭肝炎病毒; 基因表达

中图分类号: S858.325.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)01-0102-06

Gene Expression Analysis of $CD8\alpha$ and Its Signaling Pathway Related Genes Treated with DHV in Duckling

XU Qi¹, CHEN Yang¹, HUANG Zheng-yang¹, TONG Yi-yu¹, RONG Guang-hui¹,
ZHAO Wen-ming¹, ZHANG Yang¹, LI Xiu¹, DUAN Xiu-jun², CHEN Guo-hong^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics & Breeding and Molecular Design, Yangzhou
225009, China; 2. National Waterfowl Germplasm Resorurse, Taizhou 225300, China)

Abstract: This experiment was conducted to explore gene expression of $CD8\alpha$ and its signaling pathway related genes after virus infection. The experimental animal model of infected duck hepatitis virus (DHV) was constructed by using DHV to infect 3-day-old JinDing ducklings without maternal antibody. Then the gene expressions of $CD8\alpha$, MHC I, MHC II and TNF α in some tissue of different groups of DHV were detected by RT-qPCR. The specific band of conservative regions in the DHV 3D gene was amplified in morbid group and non-morbid group. This outcome showed that the infected duck hepatitis virus animal model of $CD8\alpha$ gene was constructed successfully. The results of RT-qPCR demonstrated that the $CD8\alpha$, MHC I, MHC II genes were up-regulated in non-morbid group and down-regulated in morbid group of all tissue in different degrees, while the TNF- α gene were up-regulated in morbid group of Liver, spleen, lung, and kidney. The research showed that the expression of the $CD8\alpha$ gene and related gene of its pathway was altered after duck hepatitis virus infection. The results contribute to a better understanding

收稿日期: 2012-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101704); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-43-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发【2011】137号)

作者简介: 徐 琪(1978-), 男, 江苏如东人, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: xuqi@yzu.edu.cn

* 通信作者: 陈国宏(1963-), 男, 江苏扬州人, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

of the duck CD8 α gene regulatory role in cellular immunity.

Key words: duck; CD8 α gene; DHV; gene expression

目前许多 T 细胞标记已经在禽类中被大量识别, 包括 CD3^[1], CD4^[2-3], TCR α 、 β 、 γ 、 δ 链^[4] 等, 然而禽类 CD8 功能知之甚少。CD8 基因位点是由 2 个不同的、紧密相连的基因组成 (CD8 α 和 CD8 β), 而许多 CD8 分子的功能主要体现在 α 链^[5], CD8 β 主要是协助 CD8 α 发挥生物学功能^[6]。

CD8 α 主要在胸腺细胞和外周 T 淋巴细胞中表达, 主要参与胸腺分化以及 T 细胞活化的信号传导^[7-8]。也有试验证明 CD8 α 基因的表达与特定病毒细胞介导的细胞毒性作用密切相关^[9]。研究已经证实, CD8 α 基因信号通路包含多个免疫相关基因^[10], 而在病毒感染后, CD8 α 基因及其通路相关基因是如何表达变化的, 目前尚未见有报道。本研究通过构建雏鸭肝炎病毒诱导动物模型, 比较各组织 CD8 α 基因及其通路相关基因表达变化情况, 以便更好地了解 duCD8 α 基因在细胞免疫中表达调控作用。

1 材料与方 法

1.1 实验模型构建

本研究选用同批金定雏鸭 30 只 (无母源抗体), 由国家级水禽种质资源基因库 (泰州) 提供, 3 日龄时选取体重相当, 精神状态好的雏鸭 20 只, 随机分为 2 组, 即试验组和对照组各 10 只。试验组通过腿部注射 400 μ L I 型肝炎病毒, 对照组注射等量生理盐水。隔离饲养, 观察攻毒组发病情况, 出现典型症状后, 立即采集组织样 (发病组), 于液氮中速冻, -70 $^{\circ}$ C 冻存。待 72 h 后, 采集攻毒组未出现病症反应的雏鸭组织 (未发病组); 同时采集对照组雏鸭组织 (对照组), -70 $^{\circ}$ C 冻存。I 型鸭肝炎病毒由扬州大学兽医学院彭大新教授馈赠。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库中 CD8 α 、MHC I、MHC II、TNF- α 和内参基因 (GAPDH) mRNA 序列, 利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计 RT-qPCR 引物。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成, 相关引物信息见表 1。

表 1 RT-qPCR 相关引物

Table 1 Sequence of the oligonucleotide primers of RT-qPCR

引物名称 Primer	登录号 GenBank Accession	产物位置 Position	引物序列 (5'→3') Sequences (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
CD8 α -F	AF378373	388—561	GAAGTCCTTCAAGGCAGAG	60
CD8 α -R			AGACGTCCCTCTTGGTGAC	
MHC I -F	AY294418	904—1020	GGAGCCACAGTCCAACCTGA	60
MHC I -R			TTCCCTTTCTTCCCCTGCTT	
MHC II -F	AF390589	100—291	GTGGCACTGGTGGTGCTGGGA	60
MHC II -R			CGTGTCAGCCACAAAATG	
TNF α -F	AY765397	269—390	CAGATGGGAAGGGAATGAACC	60
TNF α -R			AACTGGGCGGTCATAGAACA	
GAPDH-F	AY436595	241—427	TGCTAAGCGTGTCATCATCT	60
GAPDH-R			AGTGGTCATAAGACCCTCCA	

1.3 总 RNA 抽提与 cDNA 合成

采用 Trizol Reagent 提取试验组和对照组鸭胸腺、肝脏、脾脏、肺、肾脏等组织总 RNA, 取 5 μ g 总 RNA, 根据反转录试剂盒说明以 Oligo dT 为引物合成 cDNA 第一链。

1.4 实验动物模型的验证

根据 GenBank 中多株 DHV- I 的基因组序列, 在 3D 基因保守区设计 1 对引物, F: 5'-ACAAT-GACCCAGCCTTAG-3', R: 5'-CCACTGTATCT-TCCCTTC-3'。PCR 扩增采用 20 μ L 反应体系, 其

中 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , $10 \times$ PCR Buffer 5 μL , dNTPs 1 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , cDNA 模板 2 μL , 其余用 DEPC 水补足 20 μL 。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 荧光定量 PCR

采用 SYBR Green I 试剂盒 (TaKaRa) 进行荧光定量 PCR, 反应体系为: SYBR Premix Ex *Taq*TM II ($2 \times$) 10 μL , *CD8 α* , MHC I、MHC II、TNF- α F/R 各 0.8 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ROX Reference Dye II ($50 \times$) 0.4 μL , cDNA 2 μL , RNase-free dH₂O 6 μL 。以上步骤均在冰上进行, 每个样品设 3 个重复。实时荧光定量 PCR 反应程序如图 1。

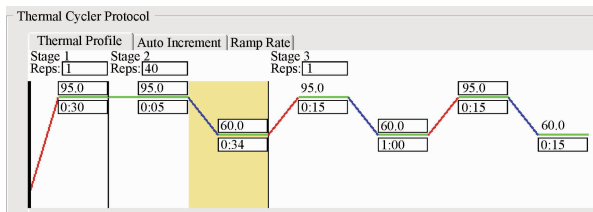


图 1 鸭 *CD8 α* 基因及其通路相关基因 RT-qPCR 扩增条件
Fig. 1 RT-qPCR condition of duck *CD8 α* and its signaling pathway related genes

1.6 数据处理与统计分析

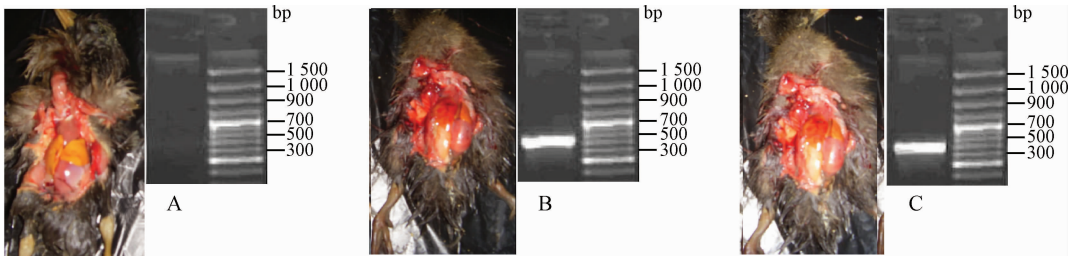
RT-qPCR 数据采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪

相应的软件进行处理, Excel 整理数据。以 *GAPDH* 表达量为内参, 采用比较循环阈值法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)^[11] 分析试验组不同组织中 *CD8 α* 、MHC I、MHC II、TNF- α 的相对表达量。具体计算方法: 以对照组各基因表达量设为 1, 分别将试验组 (test) 与对照组 (control) 作比较, 得倍数 N ($N = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), 其中 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{test}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{test}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}}$ (Ct 表示循环次数)。荧光定量试验数据分析采用 SPSS16.0 单因素方差分析法进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著 (*), $P < 0.01$ 为差异极显著 (**).

2 结果

2.1 实验动物模型构建

通过临床观察发现, 试验期内对照组饮食饮水正常, 精神状况良好, 解剖后各器官未见异常。试验组攻毒后 12~48 h 内, 绝大部分雏鸭精神状态不佳, 运动量减少, 摇头、点头、背脖, 接着出现全身痉挛性抽搐、两腿伸直、角弓反张状态, 36 h 后陆续出现死亡; 另有少部分精神状况良好。解剖后发现, 肝脏肿大, 外观呈土黄色或黄褐色, 较对照组质地松软易碎, 表面出现血点或血斑; 肾脏充血、肿胀; 脾脏肿大且外观呈花斑样; 胆囊胀大。同时利用 RT-PCR 法, 在试验组中扩增出 DHV 3D 基因的保守区域 (约 440 bp, 与目的片段相符), 结果见图 2, 说明成功地构建了雏鸭肝炎感染实验动物模型。



A. 对照组; B. 攻毒发病组; C. 攻毒未发病组
A. Control group; B. Morbid group; C. Non-morbid group

图 2 雏鸭肝炎感染实验动物模型构建与验证

Fig. 2 DHV model establishment and verification infected with DHV

2.2 雏鸭肝炎病毒对 *CD8 α* 基因及其信号通路中部分基因表达影响

分别采用 RT-qPCR 对雏鸭肝炎病毒发病组、未发病组和对照组的胸腺、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑和小脑 *CD8 α* 基因及其信号通路上 MHC I、MHC II 和 TNF- α 等基因表达情况进行检测。由

CD8 α 、MHC I、MHC II、TNF- α 和 *GAPDH* 基因的相对标准曲线, 发现它们的扩增效率均在 95%~115% 之间, Ct 值可不作矫正, 直接采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *CD8 α* 等基因在各组织表达情况, 结果见图 3~6。

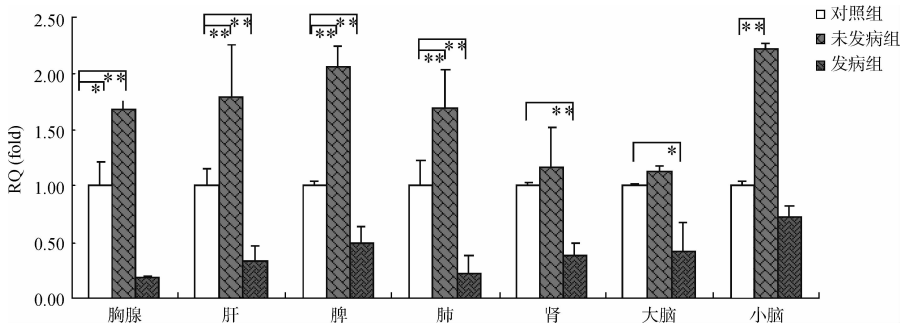
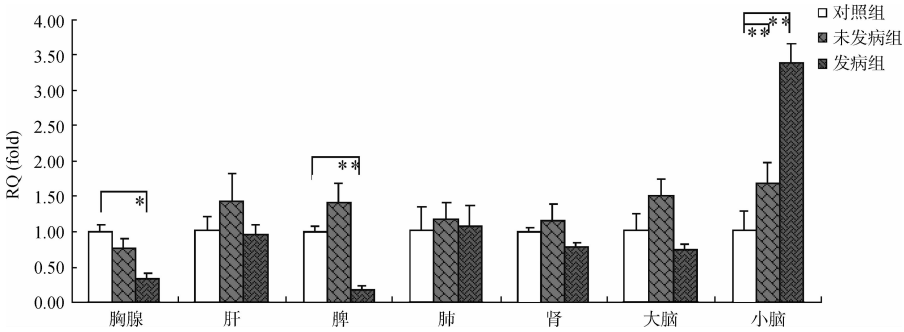
图 3 雏鸭肝炎病毒感染后 $CD8\alpha$ 基因在各组织的表达情况Fig. 3 $CD8\alpha$ gene expression in duckling tissue treated with DHV

图 4 雏鸭肝炎病毒感染后 MHC I 基因在各组织的表达情况

Fig. 4 MHC I gene expression in duckling tissue treated with DHV

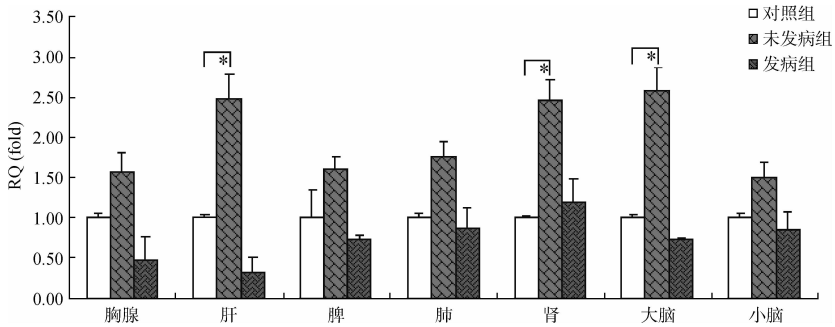
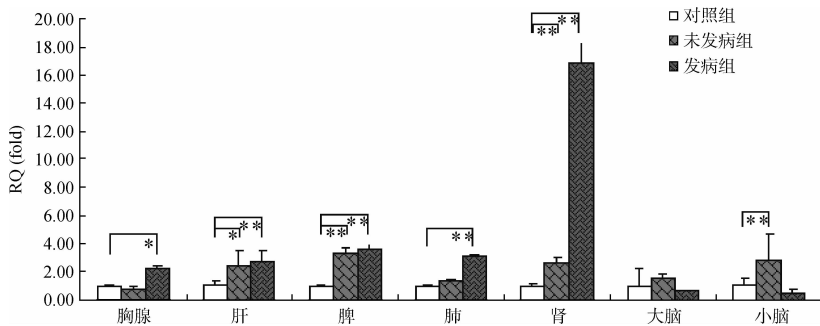


图 5 雏鸭肝炎病毒感染后 MHC II 基因在各组织的表达情况

Fig. 5 MHC II gene expression in duckling tissue treated with DHV

图 6 雏鸭肝炎病毒感染后 $TNF\alpha$ 基因在各组织的表达情况Fig. 6 $TNF\alpha$ gene expression in duckling tissue treated with DHV

由图 3~6 可以看出, $CD8\alpha$ 基因、MHC I 基因和 MHC II 基因在发病组表现为不同程度的下调, 在未发病组表现为不同程度的上调; 而 $TNF\alpha$ 在发病组和非发病组的肝、脾和肾均显著上调, 在发病组的肺组织中也出现了显著上调。

3 讨论

一般而言, 动物在没有接触病原的情况下, 机体的免疫功能和抗病力往往是不表现出来的, 所以需要—个免疫刺激物来触发机体发生免疫反应^[12]。本研究通过对 3 日龄无母源抗体的金定雏鸭进行雏鸭肝炎病毒感染, 感染后部分鸭出现了典型的雏鸭肝炎症状, 并采用了 RT-PCR 法, 对 DHV 3D 基因的保守区域进行了扩增, 结果在攻毒组(发病组和未发病组)扩增出特异性条带, 而在对照组无特异性条带, 同时还检测了感染后血液生化指标, 发现谷丙转氨酶含量较对照组极显著升高(结果另文发表)^[13]。说明成功地构建了雏鸭肝炎感染实验动物模型, 可用于后续的表达研究。

本研究结果发现, $CD8\alpha$ 基因及其信号通路上 MHC I、MHC II、 $TNF-\alpha$ 等基因表达在雏鸭肝炎病毒感染发病组、感染未发病组和对照组的胸腺、肝脏、脾脏、肺、肾脏、大脑、小脑等不同组织间表现为相同趋势。 $CD8\alpha$ 作为 T 淋巴细胞表面的重要标志物, 在抗病毒感染和细胞免疫体系中起着非常重要的作用^[14]。MHC I 作为 CD8 的受体, 在接受到病毒抗原后, 首先将病毒抗原递呈给 $CD8^+$ 细胞, 然后形成 CD8-MHC I-抗原肽的复合体, 共同作用于靶细胞, 最终致靶细胞凋亡^[15]。本研究中 $CD8\alpha$ 和 MHC I 在发病组中表达下调, 未发病组表达上调, 这也充分说明了高表达的 $CD8\alpha$ 和 MHC I, 有利于形成更多的 CD8-MHC I-抗原肽的复合体, 最终导致病毒靶细胞的凋亡, 从而表现为未发病。P. Sonal 等^[16]通过诺达病毒感染比目鱼后也发现感染组脾脏 $CD8\alpha$ 基因表达量极显著下调($P < 0.05$)。MHC II 作为 CD4 的受体^[17], 也表现为相同趋势。 $TNF\alpha$ 在攻毒组的肝、脾、肺和肾均发现不同程度的上调, $TNF\alpha$ 作为体内重要的细胞因子, 具有多种生物学功能^[18]。研究已发现, 肝炎病毒感染可直接刺激机体免疫活性细胞分泌大量 $TNF\alpha$ ^[19]。 $TNF\alpha$ 是急性肝坏死的重要因素, 其含量的变化与肝损伤有关^[20]。M. Nagaki 等研究了 $TNF\alpha$ 对外肝细胞的毒性作用, 证实 $TNF\alpha$ 与肝损伤的关系^[21]。本

研究在构建雏鸭肝炎感染实验模型时, 也发现了发病组和未发病组肝脏、肾脏和脾脏等组织均有一定病变, 这可能正是引起发病组和未发病组 $TNF\alpha$ 基因在这些组织均升高的原因。研究还发现 $TNF\alpha$ 的水平高低与病情的轻重一致, $TNF\alpha$ 产生越多, 可加重原来病毒感染细胞, 从而促使病情的加重^[22]。本研究也的确发现了发病组的 $TNF\alpha$ 在肝、脾、肺和肾中表达量均高于未发病组。因此有必要进一步探讨雏鸭肝炎病毒感染后, 免疫相关基因表达与组织损伤的关系。至于 $TNF\alpha$ mRNA 在发病组肾中表现为高丰度表达, 究其具体原因还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] HU Q H, PAN Z M, DEEN S. New alleles of chicken $CD8\alpha$ and $CD3d$ found in Chinese native and western breeds[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 120(3-4): 223-233.
- [2] DAVIDSON N J, BOYD R L. Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenetically conserved and novel thymocyte subsets[J]. *Int Immunol*, 1992, (410): 1175-1182.
- [3] LUHTALA M. Chicken $CD4$, $CD8\alpha\beta$, and $CD8\beta\beta$ T cell co-receptor molecules[J]. *Poult Sci*, 1998, 77: 1858-1873.
- [4] TJOELKER L W, CARLSON L M, LEE K, et al. Evolutionary conservation of antigen recognition: The chicken T-cell receptor b chain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87: 7856-7860.
- [5] DUNCAN L G, NAIR S V, DEANE E M. The marsupial $CD8$ gene locus: Molecular cloning and expression analysis of the alpha and beta sequences in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) and the tammar wallaby(*Macropus eugenii*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 129(1): 14-27.
- [6] 唐秀山, 王磊, 廖定为, 等. 三黄鸡 $CD8\alpha/\beta$ cDNA 克隆与表达及其多克隆抗体的制备[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 5-9.
- [7] RANDELLI E, BUONOCORE F, SCAPIGLIATI G. Cell markers and determinants in fish immunology [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 326-340.
- [8] 徐胜威. 斜带石斑鱼 $CD8\alpha$ 和 $CD8\beta$ 基因克隆及表达模式分析[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [9] SOMAMOTO T, YOSHIURA Y, NAKANISHI T, et al. Molecular cloning and characterization of two

- types of CD8 α from *gimbuna crucian carp*, *Carassius auratus langsdorfii*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29: 693-702.
- [10] KANEHISA M, GOTO S, FURUMICHI M, et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 355-360.
- [11] LIVAK K J, D SCHMITTHEN T. 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.
- [12] 徐 琪. 鸭 CD8 α 基因的克隆与表达调控初步分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [13] 陈 阳, 李 秀, 黄正洋, 等. 雏鸭人工感染鸭肝炎病毒后血液生化指标的测定[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(10): 48-50.
- [14] 徐 琪, 陈 阳, 黄正洋, 等. 鸭 CD8 α 基因启动子区的克隆及荧光素酶报告基因重组体的构建[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(4): 546-552.
- [15] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [16] SONAL P, ØVERGÅRD A C, NERLAND A H. CD8 α and CD8 β in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: Cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 570-580.
- [17] 杨汉春. 动物免疫学[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [18] GU C Q, XIE C Q, HU X Y, et al. Cytokine gene expression in the livers of ducklings infected with duck hepatitis virus-1 JX strain[J]. *Poult Sci*, 2012, 91: 583-591.
- [19] LEE W J, CHANGK J, LEE C S, et al. Select depression of T-lym-phocytesubset in gastriccancer patients: An implication of im-munotherapy[J]. *J Surg Oncol*, 1994, 55(3): 165.
- [20] 赵晓娜. 鸭肝炎病毒感染樱桃谷雏鸭和中鸭后免疫病理学的动态研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [21] NAGAKI M, MUTO Y, OHNISHI H, et al. Significance of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1(IL-1) in the pathogenesis of fulminant hepatitis: possible involvement of serine protease in TNF-mediatea liver injury[J]. *Gastroenterol Jpn*, 1991, 26: 448-449.
- [22] 王九平, 连建奇, 王爱莲, 等. 慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群、sIL-2R, TNF- α , IL-6 变化及意义[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(7): 814-816.

(编辑 白永平)