

鸡 MD 肾组织肿瘤病变与 HSP60 表达的相关性研究

李娟¹, 李玉保^{1,2}, 吴晓东³, 刘雨田³, 赵永刚³, 张永强³, 任炜杰³, 韩秀琚³,
王志亮^{3*}, 刘思当^{1*}

(1. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018; 2. 聊城大学农学院, 聊城 252029;
3. 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032)

摘要: 研究在鸡马立克氏病毒(MDV)感染及引发肿瘤的发生、发展过程中肾组织的病变、热休克蛋白 60 (HSP60)mRNA 转录、表达水平的动态变化及 HSP60 组织细胞内定位, 探讨其相关性。通过人工感染建立 MD 肿瘤模型, 利用实时荧光定量 RT-PCR, 结合病理组织学和免疫组织化学等方法, 检测试验鸡肾脏的病理变化, HSP60 的组织细胞内定位、蛋白表达量及 mRNA 转录水平的变化。在注射 MDV 21 d 后肾组织出现明显病理变化; HSP60 在肿瘤病灶内的瘤细胞及附近间质巨噬细胞的胞质中呈强阳性表达, 在瘤灶外肾小管上皮细胞的胞质内有少量表达; HSP60 的表达量, 攻毒组始终高于对照组, 28~86 日龄间差异达极显著水平 ($P < 0.01$), 28 日龄时攻毒组 HSP60 的表达量分别为空白对照组和疫苗对照组的 8.608 和 12.752 倍; 7~42 日龄间, 攻毒组 HSP60 mRNA 转录水平随病程发展呈开口向下的抛物线样变化, 前期(7~21 d)转录水平处于上升阶段, 后逐渐降低, 21 d 时达转录峰值, 分别为空白组和疫苗组的 1.222 和 1.179 倍, 整个周期内攻毒组 HSP60 mRNA 转录水平均高于空白组, 14~28 日龄间差异极显著 ($P < 0.01$)。MDV 引发肿瘤发生发展过程中肿瘤病灶及周围组织内 HSP60 表达水平升高, HSP60 mRNA 转录水平相应增加; HSP60 表达量同其 mRNA 转录水平的变化趋势基本相符, 但并非完全一致的线性关系, 两者与肿瘤的发生、发展密切相关, 有望作为鸡 MD 诊断及发病过程的重要判定指标。

关键词: 鸡马立克氏病; 热休克蛋白 60; 免疫组织化学; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S858.315.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0610-07

Relationship between Expression of HSP60 and Tumor Lesion of Chickens Kidney in Progress of MD

LI Juan¹, LI Yu-bao^{1,2}, WU Xiao-dong³, LIU Yu-tian³, ZHAO Yong-gang³, ZHANG Yong-qiang³,
REN Wei-jie³, HAN Xiu-ju³, WANG Zhi-liang^{3*}, LIU Si-dang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018,
China; 2. College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252029, China; 3. China
Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: The objective of this study is to investigate the relationship between pathological lesion and transcription, expression and distribution of heat shock protein 60 (HSP60) in kidney of chickens infected by Marek's disease virus (MDV). Tumor animal model was successfully established by infecting 1 day old chickens with MDV. Real-time RT-PCR, histopathological, immunohistochemical methods were used to detect the pathological lesion, transcription level, expression level and distribution of HSP60 in the kidney. After 21 days post-infection (PI), obvi-

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(31101787); 山东省自然科学基金(ZR2010CM035)

作者简介: 李娟(1988-), 女, 汉族, 山东泰安人, 硕士生, 主要从事动物临床病理学研究, E-mail: li198820062011@163.com。李玉保(1978-), 男, 汉族, 山东阳谷人, 博士, 主要从事动物病理学研究, E-mail: liyubao@lcu.edu.cn。李娟、李玉保对本文有相同贡献, 并列第一作者

* 通信作者: 刘思当, E-mail: liusid@sdau.edu.cn; 王志亮, E-mail: zlwang111@yahoo.com.cn

ous pathological damage appeared in the kidneys of chickens infected by MDV. HSP60 was mainly distributed in the cytoplasm of the oncoocyte and interstitial macrophages in the tumor regions. Within the course of MD, the contents of HSP60 of effected group were always higher than blank control group and vaccine control group, which was significantly higher after 28 days, and the mostly was about 8.608 and 12.752 times at the age of 28 days. The tendency changes looked like a downward parabola, during 7 to 21-day-old, the level of HSP60 mRNA transcription of effected group was in the rising stage, and then gradually dropped. When 21-day-old the maximum was came on, which was about 1.222 and 1.179 times of two control groups. Throughout all stages the level of transcription was higher than blank control group, and during 14 to 28-day-old was significantly higher ($P < 0.01$). The MDV infection caused resistance to infection and antitumor response in the progress of MD, the stress related kidney damage resulted in the over-expression of HSP60 in tumor lesions and surrounding tissues. A corresponding increase came to the mRNA transcription level of it in kidney tissues. The rapid expression changes of HSP60 was basic consistent with its mRNA transportation level, but not completely linear. And they were closely related with the onset and progression of tumors, which might be hallmarks to diagnose and determine the process of tumor caused by MDV.

Key words: Marek's disease; heat shock protein60; immunohistochemistry; FQ RT-PCR

目前诸如口腔癌、食道癌等恶性肿瘤性疾病正成为严重危害人类健康和生活水平的常见病和多发病, J. Kaur 等^[1]从热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)的角度研究此类肿瘤疾病的发病特点和机制,力图将其作为新的诊断指标判定肿瘤分化程度,为治疗和预后提供理论依据。MD 是家禽常见肿瘤性疾病的典型代表,笔者试图把以上思路运用于该病研究,通过检测 MD 发生发展过程中主要内脏器官——肾脏的肿瘤病变与 HSPs 在组织内的定位、表达和 mRNA 转录水平的动态变化,分析两者之间的相关性,探讨 HSPs 在该病发生、发展过程中的表现及其作用,为动物肿瘤病的诊断和新型治疗药物的研发提供新思路。HSPs 是组织细胞在应激因素刺激下所产生的多组不同分子量大小的高度保守性蛋白质的统称,常分为 small HSPs、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 及 HSP110 六大家族^[2]。正常条件下,HSPs 于原核和真核生物内均有微量表达,主要以分子伴侣的角色参与细胞正常生命活动;当机体受到应激刺激时,引发机体非特异性抗损伤反应,组织内的 HSPs 含量会发生急剧变化,以维持细胞内环境的稳定,保护细胞抵御应激引起的损伤^[3]。目前,HSPs 在肿瘤性疾病的表达及其作用已成为研究热点^[4]。M. A. Lambot 等^[5]的研究表明,HSPs 蛋白在大部分肿瘤组织中表达异常,可与癌基因、抑癌基因产物结合,参与肿瘤细胞的周期调

控、增殖、凋亡、分化、耐药及肿瘤免疫过程,与肿瘤的发生发展密切相关。作为家族重要代表成员之一的 HSP60,对其在该方面的研究则相对较少^[6],尤其是在禽肿瘤性疾病中的研究国内未见报道。基于以上背景,笔者选用 MD 为肿瘤病模型,进行肾组织病变与 HSP60 在组织内定位、表达及其 mRNA 转录水平的动态观察与定量检测,探讨在动物肿瘤疾病发生发展过程中 HSP60 在核酸及蛋白水平上的变化规律,为进一步研究其在抗肿瘤机制中的作用奠定基础。本试验通过构建 MD 动物肿瘤模型,观察肾组织病变与 HSP60 在肾组织内的分布、表达;结合 ELISA 测定肾内 HSP60 含量的变化,利用建立的 FQ RT-PCR 技术平台实时检测其 mRNA 的转录水平变化,分析两者的内在联系,探讨 HSP60 在动物肿瘤发病学中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 140 只 SPF 鸡,由青岛易邦生物制品有限公司提供,于中国动物卫生与流行病学中心实验动物饲养中心,不同分组置于各自独立的隔离器中,在完全净化的条件下饲养。

1.1.2 种毒 病毒为 MDV-RB1B 株,由山东农业大学崔治中教授惠赠,液氮保存。

1.1.3 疫苗 NDV IV 系弱毒疫苗购自济南齐

鲁动物保健品厂;NDV+H9 灭活苗购自洛阳普莱柯生物工程公司;HVT 马立克氏病冷冻苗购自南京乾元浩生物股份有限公司。

1.1.4 主要试剂和仪器 HSP60 单克隆抗体 (SPA-806,批号:105422)购自加拿大 Stressgen 生物技术公司;Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse 试剂盒 (批号:K5003)购自丹麦 Dako 公司;Chicken heat shock protein 60 (HSP-60) (NO. CBS-E06855Ch) ELISA kit 购自河南 CUSABIO 生物制品公司;High Pure Viral RNA Kit (NO. 11858882001)购自 Roche 公司;Dream Taq™ Green PCR Master Mix 购自 Fermentas 公司;Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (DRR055A)、One Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit (Perfect Real Time)II (DRR086A)均购自宝生物工程 (大连)有限公司;Gel Extraction Kit (NO. 28706)、QIAprep Spin Miniprep Kit (NO. 27106)购自 QIAGEN 公司;pGEM-T 载体系统试剂盒 (A1360)、体外转录系统试剂盒 (P1440)购自 Promega 公司;SYBR Green I 染料购自北京 Solarbio 科技有限公司。

1.2 试验设计

将 150 只 1 日龄 SPF 雏鸡随机分成空白对照组 (45 只)、疫苗对照组 (45 只)和攻毒组 (60 只),攻毒组试验鸡 1 日龄攻毒。将种毒用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灭菌 PBS 稀释,每只鸡腹腔接种 0.2 mL,相当于 $1000 \text{ PFU} \cdot \text{只}^{-1}$ 。空白对照组注射 0.2 mL 生理盐水,疫苗对照组注射 HVT 马立克氏病冷冻疫苗。各组均于 2 日龄注射 NDV+H9 AIV 灭活苗, $0.25 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$,7 日龄 NDV IV 系弱毒苗饮水免疫。于 7、14、21、28、35、42、86 日龄随机剖杀部分鸡,每次 2 对照组各 3 只,攻毒组 5 只,取 1 份肾组织于 10% 中性福尔马林液固定,2 份于液氮速冻后存于 -80°C 冰柜中。

1.3 试验方法

1.3.1 免疫组化检测 取充分固定的各组肾组织制作常规石蜡切片。常规方法利用 HSP60 单克隆抗体进行免疫组化染色^[7]。用 PBS 代替 HSP60 单克隆抗体作为阴性对照,每份标本同时做 1 张 HE 染色切片,以便对比观察。结果判断:光镜下在阴性对照为正确染色结果的条件下,组织内出现棕红色颗粒或区域着色者为阳性信号。

1.3.2 竞争 ELISA 检测 将 1 份冻存肾组织用

液氮研磨,按 Chicken heat shock protein 60 (HSP-60) ELISA 试剂盒提供说明书方法进行标准曲线制作和样品检测。

1.3.3 引物设计 利用 Primer premier 5.0 引物设计软件,根据 NCBI 公布的鸡 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, GAPDH)^[8] 和 HSP60 (登录号:NM_001012916.1)的全基因序列设计引物,通过 NCBI 中 Blast 功能,初步检测其特异性。GAPDH 上游引物:5'-TGAAAGTCGGAGTCAACGGAT-3',下游引物:5'-ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT-3';HSP60 上游引物:5'-TACAGCCAAAGGGCAGAAA-TG-3',下游引物:5'-ACAGCAACAACCTGAAGAC-CAAC-3',设计产物长度分别为 230 和 210 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,为冻干品,使用浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3.4 一步法实时荧光定量 RT-PCR 检测 取冻存肾组织用液氮研磨后,以 RNA 提取试剂盒获得样品中总 RNA, -80°C 保存备用。利用提取的部分 RNA 为模板,进行常规 RT-PCR 反转录扩增目的基因序列^[8],提取并鉴定阳性质粒,经体外转录获得标准品。每个标准品需至少做 3 个重复,通过一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法,得到标准曲线和标准方程。

以各分组提取样品总 RNA 为模板,按同上优化的体系和条件进行荧光定量 RT-PCR 检测,反应结束后确认扩增曲线和融解曲线,然后根据荧光曲线 C_t 值与标准曲线一起进行结果分析。每一样品分别检测 HSP60 和 GAPDH 的 mRNA 转录水平,样品做 2 个重复。

1.3.5 统计分析 根据标准曲线计算样品组织中蛋白含量和 mRNA 转录水平,并用 SPSS11.5 软件的 One way ANOVA 功能对数据进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 MD 模型建立

MDV 攻毒组,SPF 鸡胚孵化成活率达 100%,1~21 日龄间 4 只雏鸡死亡,21 日龄后陆续发病,零星死亡,病鸡出现精神沉郁,冠苍白发育不良,采食量减少,日渐消瘦;自 21 日龄开始,剖杀的鸡肾脏不同程度肿大,表面可见凸出的栗粒至蚕豆样大小不等黄白色结节,切面亦见白色肿瘤病灶。两对照组

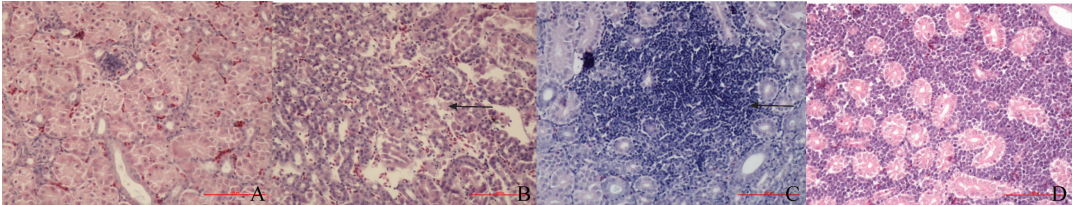
在整个过程中未见异常临床表现,剖检未见肿瘤病灶。这表明已成功构建了鸡内脏型 MD 动物模型,肾组织可以作为后期研究材料。

2.2 肾组织病变与 HSP60 在组织中的定位

2.2.1 肾组织的病理变化 7 次剖杀取样中两对照组肾组织均未见明显的病理变化(图 1A、1B)。攻毒组 21 日龄时在肾组织内出现局灶性的淋巴样瘤细胞浸润(图 1C),灶内肾组织被瘤细胞取代;28 日龄时肾小管间可见弥漫性多形态淋巴样瘤细胞浸润(图 1D),瘤细胞多见核分裂相;在之后的 35、42、

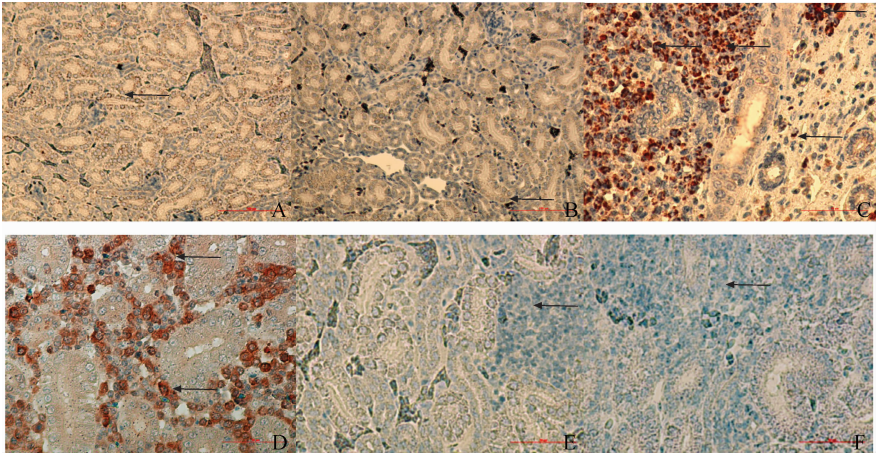
86 日龄时攻毒组鸡肾组织肿瘤病变逐渐加重,局部肾脏组织被肿瘤组织取代。

2.2.2 HSP60 在肾组织内的定位 两对照组只见在局部肾小管的部分上皮细胞的胞质内有少量 HSP60 的阳性表达(图 2A、2B);攻毒组 HSP60 主要位于肿瘤灶内瘤细胞的胞质,在肿瘤灶外肾小管间的巨噬细胞胞质内也有部分表达(图 2C、2D);在肿瘤附近及距离肿瘤较远处的肾小管上皮细胞内仅有少量表达,阴性染色切片中均未见阳性信号(图 2E、2F)。



A. 空白对照组; B. 疫苗对照组; C. 21 日龄攻毒组局灶性肿瘤; D. 28 日龄攻毒组组织内弥漫性肿瘤
A. Blank control group; B. Vaccinated control group; C. Focal tumor focus through kidney tissue of infected group when 21-day-old; D. Diffuse tumor focus through kidney tissue of infected group when 28-day-old

图 1 肾脏病理组织学病变 (HE, 20×)
Fig. 1 Histopathology assay of kidney tissues (HE,20×)



A. 空白对照组(20×); B. 疫苗对照组(20×); C. 21 日龄攻毒组局灶性肿瘤(40×); D. 28 日龄攻毒组组织内弥漫性肿瘤(40×); E、F. 阴性对照(40×)
A. Blank control group (20×); B. Vaccinated control group (20×); C. Focal tumor focus through kidney tissue of infected group when 21-day-old (40×); D. Diffuse tumor focus through kidney tissue of infected group when 28-day-old (40×); E, F. Negative control (40×)

图 2 肾脏免疫组织化学检测 (IHC)
Fig. 2 Immunohistochemistry assay of kidney tissues (IHC)

2.3 肾脏 HSP60 含量的动态变化

通过 ELISA 检测,获得 HSP60 标准品的 OD 值,并以此为 Y 轴,以标准品浓度为 X 轴作标准曲线,以标准品浓度的对数值为 X 轴作趋势线,获得

方程为 $y = -0.056\ 3x + 1.011\ 0$ 。据此计算样品组织中蛋白含量,并进行 t 检验,数据见表 1,在 7~86 日龄的试验过程中,攻毒组肾组织的蛋白含量始终高于两对照组,各检测日龄差异均显著($P < 0.05$),

除 7 和 21 日龄外其他日龄时差异极显著 ($P < 0.01$), 28 日龄时最明显, 分别为两对照组的 8.608 和 12.752 倍, 两对照组间差异不显著。

表 1 各组动物肾组织 HSP60 表达量的动态变化

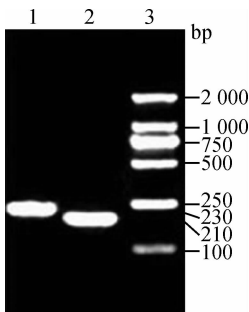
Table 1 Dynamic changes of HSP60 expression quantity in kidney tissue of different group

日龄 Age	空白对照组 Blank Control Group	疫苗对照组 Vaccinated Control Group	攻毒组 Effected Group
7 日龄 7-day-old	7.710±0.339 ^{Aab}	6.856±5.245 ^{An}	26.416±10.297 ^{Bb}
14 日龄 14-day-old	3.086±0.294 ^{An}	3.663±0.369 ^{An}	24.155±4.748 ^{Bb}
21 日龄 21-day-old	6.379±0.513 ^{An}	7.467±0.576 ^{Aab}	31.384±8.038 ^{Bb}
28 日龄 28-day-old	4.425±0.501 ^{An}	2.987±0.763 ^{An}	38.090±17.766 ^{Bb}
35 日龄 35-day-old	3.147±0.203 ^{An}	2.074±0.478 ^{An}	27.542±4.363 ^{Bb}
42 日龄 42-day-old	3.440±0.357 ^{An}	3.318±0.444 ^{An}	22.838±4.152 ^{Bb}
86 日龄 86-day-old	5.396±1.383 ^{An}	7.589±0.352 ^{An}	33.877±16.812 ^{Bb}

* 同行中, 小写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$), 大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 大小写字母相同表示差异不显著, 下表同
The different capital and small letters in the same column stand for significance at 0.05 and 0.01 level, and the same capital and small letters stand for no significance. The same as below

2.4 肾组织 HSP60 mRNA 转录水平的动态变化

2.4.1 标准品的 RT-PCR 鉴定 用设计的 GAPDH、HSP60 引物对样品中提取的 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 将产物进行纯化、转化感受态细胞、连接 pGEM-T 载体, 得到的阳性质粒经 PCR 鉴定, 分别得到 230、210 bp 的扩增条带(图 3)。测序结果也显示, 其序列与 NCBI 上公布序列的相似性为 100%, 体外转录得到的 RNA 标准品片段, 经凝胶电泳检测其扩增条带与阳性质粒相符。



1~2. 分别是 GAPDH(230 bp)和 HSP60(210 bp)阳性质粒 PCR 鉴定结果; 3. DL2000 DNA 相对分子质量标准
1-2. Identification of GAPDH (230 bp) and HSP60 (210 bp) positive plasmids by PCR; 3. DL2000 DNA marker
图 3 阳性质粒 PCR 鉴定
Fig. 3 Identification of the positive plasmids by PCR

2.4.2 荧光定量标准曲线 GAPDH 的标准曲线: $Y = -3.315X + 47.809$, 一致系数为 0.996; HSP60 的标准曲线: $Y = -3.394X + 49.479$, 一致系数为 0.997; 其中 Y 代表临界循环数 (Threshold cycle, Ct 值), X 代表模板量的对数值。

结果显示 2 条标准曲线的斜率都接近理想值 -3.322, 一致系数也接近 1.000, 同时从熔解曲线可以看出, 扩增产物特异性非常好, 荧光曲线可实时反映目的产物的扩增数(图 4)。

2.4.3 HSP60 mRNA 转录水平的变化 不同日龄肾组织 HSP60 mRNA 相对于内参基因 GAPDH 的转录水平见表 2。表中数据显示, 14~28 日龄间攻毒组鸡只 HSP60 mRNA 的转录水平均极显著高于两对照组 ($P < 0.01$), 而两对照组间差异不显著, 其他日龄时 3 组间差异不显著。

两对照组基本保持稳定的变化趋势, 攻毒组 7~42 日龄间 HSP60 mRNA 的转录水平呈开口向下的抛物线式变化, 21 日龄时达到最高水平, 分别为两对照组的 1.222 和 1.179 倍, 7 日龄时为最低水平, 与空白对照组相同, 为疫苗对照组的 1.013 倍。

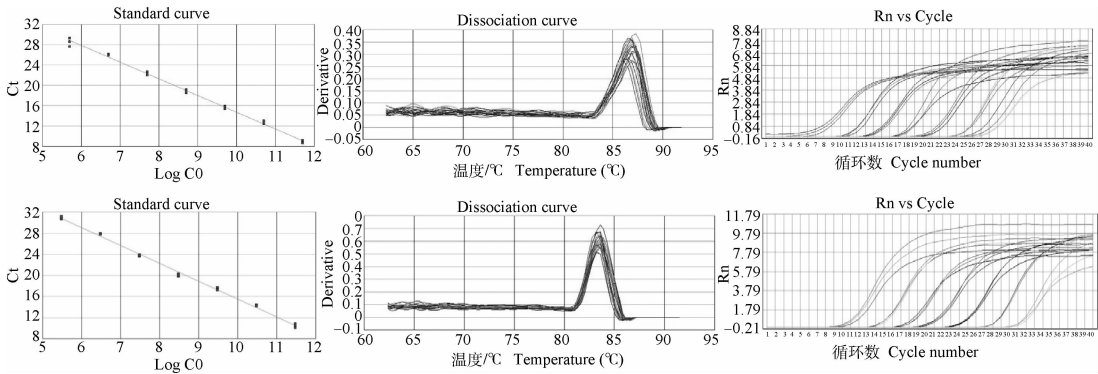


图 4 GAPDH(上)和 HSP60(下)的标准曲线、溶解曲线和扩增曲线(由左向右)
Fig. 4 Standard curve graph, melt curve graph and PCR Amp/Cycle graph (from left to right) of GAPDH (previous line) and HSP60 (next line)

表 2 各组肿瘤应激受试鸡肾脏中 HSP60 mRNA 转录水平的动态变化			
Table 2 Dynamic changes of HSP60 mRNA transcriptional level in kidney tumors stimulated chickens of different group			
日龄 Age	空白对照组 Blank Control Group	疫苗对照组 Vaccinated Control Group	攻毒组 Effected Group
7 日龄 7-day-old	1.000±0.002 ^{An}	0.987±0.057 ^{An}	1.000±0.007 ^{An}
14 日龄 14-day-old	1.020±0.011 ^{An}	0.981±0.022 ^{An}	1.167±0.029 ^{Bb}
21 日龄 21-day-old	0.997±0.022 ^{An}	1.033±0.005 ^{An}	1.218±0.036 ^{Bb}
28 日龄 28-day-old	1.002±0.007 ^{An}	0.989±0.012 ^{An}	1.157±0.001 ^{Bb}
35 日龄 35-day-old	0.994±0.051 ^{An}	1.012±0.016 ^{An}	1.081±0.056 ^{An}
42 日龄 42-day-old	0.995±0.071 ^{An}	0.989±0.045 ^{An}	1.053±0.038 ^{An}
86 日龄 86-day-old	1.013±0.037 ^{An}	1.032±0.021 ^{An}	1.065±0.058 ^{An}

3 讨论

3.1 本试验构建的一步法 RT-PCR 实时荧光定量检测鸡 HSPs mRNA 转录水平的方法, 相比 Northern blot 杂交的传统方法, 避免了 RNA 易降解及敏感性低的缺点, 不需构建 cDNA 文库, 快速、简捷^[9]。选定较为稳定的持家基因 GAPDH 作为内参, 在试验中同时检测了每个样品中 GAPDH 的相对含量, 然后通过对比同一样品的 HSP60 测定结果, 用 GAPDH 进行目的基因的归一化处理, 尽可能减小组织差异(误差), 使结果更贴近实际情况, 更具可信性。

3.2 本试验成功构建了内脏型 MD 肿瘤模型, 眼观 21 日龄后鸡肾组织可见表面凸起的灰白色肿瘤结节, 病理组织学检查组织内形成灶状或弥漫性生长的淋巴样肿瘤组织; IHC 结果显示, HSP60 在肿瘤灶内的瘤细胞和间质巨噬细胞的胞质均有阳性表达, 瘤细胞过表达可能与机体抗癌作用有关, 或其固

有的生物学特性; 间质内巨噬细胞均发现有 HSP60 阳性信号, 在肿瘤灶附近肾小管上皮细胞仅有少量表达, 且表达量与病灶距离的远近关系不大, 与对照组差异不明显, 说明肾组织对 HSP60 的表达与瘤细胞浸润及由此引起组织损伤的应激相关性较小, 可初步猜想肾脏中的 HSP60 不同于 HSP27、HSP70 等家族成员, 在组织细胞自身保护方面只发挥有限的作用。

在该病发展过程中, 体内持续存在的 MDV 感染、瘤细胞累积增多及浸润性生长造成的组织损伤, 并伴发的机体抗肿瘤反应, 多种持续强烈的应激反应必然会诱导 HSP60 的表达。以肾组织为材料进行间接 ELISA 检测结果显示, 在整个试验过程(7~86 日龄)中, 攻毒组肾组织内的 HSP60 蛋白含量始终高于两对照组, 进一步证明了 MD 发病过程中引起肿瘤组织及肾组织对该蛋白过表达的现象。

FQ RT-PCR 检测结果显示, 在整个试验过程(7~86 日龄)中, 攻毒组鸡只 HSP60 mRNA 的转录水平持续性高于两对照组 ($P < 0.01$), 这与

ELISA 检测得到的结论相同,说明 MD 发病过程中促进了 HSP60 mRNA 转录,使蛋白表达量增加。自 21 日龄后,攻毒组 HSP60 mRNA 的转录水平不再表现出继续升高,反而开始逐渐减小,该病理模型 7~42 日龄间转录水平形成开口向下的抛物线式的动态变化趋势,与 HSP60 的表达量并非完全一致,推测可能与 MDV 早期全身性感染应激有关,或许还与在疾病发展过程中 HSPs 过表达消耗有关^[10]。不同于鲍恩东等^[11]检测的肉鸡高热应激及孙培明等^[8]检测的肉鸡热应激所得的结论,即 HSP mRNA 转录水平与运输或热应激时间之间简单的正或负相关关系,该检测充分显示 HSP60 转录水平的动态变化和 MD 肿瘤发生发展过程的相关性更为复杂,但也不是无规律可循。

考虑到人工注射 MDV-RB1B 超强毒株后 7 d 即可在羽髓上皮细胞中检出 MDV,21 d 后病毒载量达到峰值^[12]。结合各项检测结果可猜测,自 1 日龄人工接种 MDV 后,由于早期感染即对机体产生较强的应激作用,使前期(7~14 日龄)攻毒组蛋白表达水平开始表现出高于空白组的趋势,14 日龄时已达极显著水平($P<0.01$),而随肿瘤的发生和浸润性生长,使肾组织蛋白表达量增多,21~28 日龄间攻毒组与两对照组差异极显著($P<0.01$),此时攻毒组肾组织出现可见病理变化,瘤细胞及间质巨噬细胞 HSP60 蛋白阳性信号增强,而此阶段 mRNA 的转录也维持在最高水平;后来随着 MDV 病毒血症的消失,抗病毒感染反应减弱,机体启动抗癌机制并持续性发挥作用,对 HSP60 的诱导调控作用开始减小或开始发挥负反馈作用^[12],组织内 HSP60 转录表达趋于稳定,但仍表现高于对照组,表达量也依旧较高,这也说明组织内 HSP60 表达量及其 mRNA 转录水平与组织肿瘤性病变更密切相关,可以作为肿瘤疾病发展过程的判定指标,而 HSP60 被诱导表达的机制、具体参与抗损伤、抗肿瘤的机制及负反馈调节机制仍有待研究。

4 结 论

所建立的 FQ-PCR 技术平台简便、准确,可用于 mRNA 转录水平的检测;鸡 MD 发病过程导致的肾组织肿瘤病变可引起 HSP60 分布、表达量及 mRNA 转录水平的变化,其中蛋白表达量与 mRNA 转录水平的相关性并非线性关系;肾组织 HSP60 表达及其 mRNA 的转录水平可反映 MDV

感染、肿瘤形成及发展过程,与肿瘤疾病的发病学密切相关,有望成为鸡肿瘤性疾病的诊断及发病进程的判定指标之一。

参考文献:

- [1] KAUR J, DAS S N, SRIVASTAVA A, et al. Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features[J]. *Oral Oncol*, 1998, 34(2): 93-98.
- [2] ZHU L, BAO E D, ZHAO R Q. Expression of heat shock protein 60 in the tissues of transported piglets [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14: 61-69.
- [3] BURDON R H. Heat shock and the heat shock proteins[J]. *Biochem J*, 1986, 240(2): 313-324.
- [4] 孙培明, 鲍恩东, 吴晓东, 等. 肉鸡 HSP70 的基因克隆、原核表达及单克隆抗体制备[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2154-2161.
- [5] LAMBOT M A, PENY M O, FAYT I, et al. Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Histopathology*, 2000, 36(4): 326-330.
- [6] 龚兴国, 于 红. 热休克蛋白 60 的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(11): 2151-2154.
- [7] BUKAU B, HORWICH A L. The HSP70 and HSP60 chaperone machines [J]. *Cell*, 1998, 92(3): 351-366.
- [8] 孙培明, 鲍恩东. 肉鸡热休克蛋白 70 mRNA 荧光定量 PCR 方法的建立和优化[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(1): 45-50.
- [9] LI Y B, PEI L Y, BAO E D, et al. Relationship between distribution, transcription level of HSPs mRNA and immunity tissue pathological lesion of transport stressed pigs[J]. *Scientia Agriculture Sinica*, 2008, 41(6): 1832-1837.
- [10] 丛 锋, 刘长军, 张艳萍, 等. 马立克氏病病毒感染鸡羽髓上皮细胞差异蛋白质组学研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 3(6): 419-422.
- [11] 鲍恩东, 龚远英, HARTUNG J, 等. 肉鸡热应激病理损伤与热应激蛋白(HSP70)的相关性研究[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(2): 301-305.
- [12] 孟凡东, 隋承光, 王晓华, 等. 肾癌 HSP70-PC 体外诱导 DC 成熟激活特异性抗肿瘤免疫的作用[J]. *中国医学工程*, 2006, 6(14): 561-563, 566.

(编辑 白永平)