

Real-Time PCR 和组织原位杂交法检测 enJSRV 在绵羊胎儿免疫器官及肺脏中的表达

吴晓莉, 齐景伟*, 刘淑英, 徐萌杰

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究旨在揭示感染 JSRV 病羊体内检测不到循环抗体的免疫学机理。用地高辛(DIG)标记制备 enJSRV-env 探针, 原位杂交法检测妊娠 70 d 的绵羊胎儿(免疫器官初步形成期)、妊娠 130 d 胎儿(即将出生的)和出生 7 日龄羔羊的胸腺、脾脏、肠淋巴结和肺脏内 *enJSRV* mRNA 表达情况。并利用 Real-Time PCR 法, 对 *enJSRV* mRNA 在以上组织中的表达进行定量分析。结果表明, 在所检测组织内均有阳性信号出现, 而阴性对照组均没有阳性信号; *enJSRV* mRNA 在胎儿和初生羔羊各免疫器官高水平表达, 特别是在妊娠 130 d 胎儿和初生 7 日龄羔羊的胸腺和脾脏中表达水平比较高, 而在各时期的肺脏组织中都检测到低水平表达。本试验结果为机体对 exJSRV 的感染产生免疫耐受这一假说提供了有力的证据。

关键词: 绵羊; enJSRV; 表达; 原位杂交; Real-Time PCR

中图分类号: S852.4; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)08-1018-06

Expression of enJSRV in Immune Organs and Lung of the Fetus by In Situ Hybridization and Real-Time PCR

WU Xiao-li, QI Jing-wei*, LIU Shu-ying, XU Meng-jie

(College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: To study the immunology mechanism of circulating antibody detected in sheep infected JSRV. Preparing the enJSRV-env probes, and we analysed the expression of *enJSRV* mRNA in immune organs (including thymus, spleen, gut lymph node) and lung of gestation 70 d fetal lambs, gestation 130 d fetal lambs and 7 d newborn lambs by In Situ Hybridization. The expression level of each target mRNA was analyzed in total RNA obtained from the above tissues by Real-Time PCR. The results revealed that *enJSRV* mRNA expressed in all collected tissues of different periods, while there were no positive signals in negative control. The results of Real-Time PCR showed that the level of *enJSRV* mRNA was much higher in immune organs than that in lung, especially in thymus and spleen of gestation 130 d fetal lambs and 7 d newborn lambs. This study will unravel the pathogenesis that sheep are tolerized towards infection by the exJSRV.

Key words: sheep; enJSRV; expression; In Situ Hybridization; Real-Time PCR

绵羊肺腺瘤病 (sheep pulmonary adenomatosis, SPA) 是由外源性绵羊肺腺瘤病毒 (exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus, exJSRV) 引起的一种

慢性、进行性、接触传染性的肺脏肿瘤性疾病^[1]。以病羊咳嗽、呼吸困难、消瘦、大量浆液性鼻液、II 型肺泡上皮细胞和无纤毛细支气管上皮细胞肿瘤性增生

收稿日期: 2009-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760178; 30960271)

作者简介: 吴晓莉(1985-), 女, 陕西大荔人, 硕士生, 主要从事动物生理学和病理学研究, E-mail: wxl-123321@163.com

* 通讯作者: 齐景伟, E-mail: qijingwei_66@126.com

为主要特征^[2-3]。但是,很多研究表明绵羊基因组中含有至少 2 拷贝的与 exJSRV 相似的内源性逆转录病毒序列(endogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus, enJSRV),内源性反转录病毒(Endogenous Retrovirus, ERVs)来自于古老的外源性病毒在进化过程中整合进宿主基因组中,再以孟德尔遗传方式进行遗传,并且 enJSRV 和 exJSRV 在结构和序列上具有很高的同源性^[4]。很多研究表明,enJSRV 和 exJSRV 在所编码的氨基酸水平上具有 90%~98%的同源性,这可能会导致在外周血液中检测不到循环抗体。其可能的原因是 enJSRV 抗原的存在以及在胚胎期发育表达所产生的病毒蛋白,会使绵羊产生免疫耐受,从而对后天感染的 exJSRV 不产生免疫应答^[5-6]。目前,我国关于该病免疫耐受这方面的研究甚少,且该病发生的免疫学机理仍不清楚,这严重阻碍着对 SPA 的研究。

本课题主要运用组织原位杂交法和 Real-Time PCR 法来研究 enJSRV mRNA 在绵羊进化过程特别是免疫器官发育过程中的表达情况与表达水平。从而揭示 SPA 病羊体内检测不到循环抗体的免疫学机理和 enJSRV 在绵羊发育进化过程中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

选临床检查健康的妊娠 70 d(其免疫器官初步形成期)绵羊胎儿、130 d 绵羊胎儿(免疫器官完全形成期,即将出生)和同一羊场的出生 7 日龄的羔羊各 3 只,分别扑杀后,取其胸腺、脾脏、肠淋巴结和肺脏样本各 2 份,一份放在无 RNase 冻存管中,-70℃保存,另一份放入无酶水配制的多聚甲醛固定液中,石蜡包埋备用。

总 RNA 提取试剂盒,反转录 PCR 试剂盒,胶回收试剂盒,均为大连 TaKaRa 公司产品。DIG(地高辛)DNA 标记及检测试剂盒,德国 Roche 公司产品。

1.2 原位杂交所需探针的制备

1.2.1 总 RNA 的提取 按照总 RNA 提取试剂盒的说明,分别提取以上组织的总 RNA,并用微量紫外分光光度计(型号:ND-1000NanoDrop,美国生产)和 1.0%变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的纯度及完整性,之后-80℃保存,备用。

1.2.2 RT-PCR 扩增 根据 GenBank 登载的

enJSRV 全基因序列和内参 β -actin 的基因序列设计引物并由大连 TaKaRa 公司合成如下:

enJSRV (92 bp)上游引物 5'-TGGCGAAG-TATAATTGCTATGGG-3',下游引物 5'-TCTT-TAACAATGCTACGAATAAGGC-3'; β actin (111 bp)上游引物 5'-CTCAAACATGATCTGGGT-CATCTTC-3',下游引物 5'-CACGGCATTGT-CACCAACTG-3'。

反应体系如下:PrimeScriptRTase(for 1 Step) 0.5 μ L, RNase Inhibitor (40 U \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, TaKaRa Ex Taq HS (5 U \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, dNTP Mixture(10 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, 10 \times One Step RT-PCR Buffer 5 μ L, One Step Enhancer Solution 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (20 mmol \cdot L⁻¹),提取的总 RNA 约 600 ng,最后加无酶水至 50 μ L。RT-PCR 反应条件为:50℃反转录 30 min,94℃预变性 2 min 后进行 45 次循环(94℃30 s,退火温度 enJSRV 为 58℃, β actin 为 60℃,退火时间为 30 s,72℃1 min),降温至 4℃,停止反应,-20℃保存。

分别取 enJSRV 和 β -actin 的 RT-PCR 产物各 5 μ L,在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 15 min 左右。结束后,在凝胶成像仪上观察并拍照。经电泳检测的 RT-PCR 产物送大连 TaKaRa 公司进行双向测序,测得的序列用 DNASTar 软件进行分析。

1.2.3 DNA 凝胶回收 用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒分别回收经序列测定的 PCR 产物。

1.2.4 探针标记及检测 按照 Roche 公司地高辛标记及检测试剂盒说明书,将回收的 DNA 进行探针标记及检测。地高辛标记产物和 control DNA 用 DNA Dilution Buffer 稀释成 10、3、1、0.3 和 0.1 μ g \cdot μ L⁻¹ 的浓度梯度。取不同浓度的标记产物和标准 DNA 各 1 μ L 点至尼龙膜上。120℃烘焙 30 min。将膜加入 20 mL 马来酸 Buffer,25℃摇床反应 2 min。用 10 mL Blocking 溶液孵育 30 min,用 10 mL 抗体溶液孵育 30 min,再用 10 mL 洗涤 Buffer 洗涤 2 次,每次 15 min,然后用 10 mL 探测 Buffer 平衡 2~5 min。将膜转移到另一容器中,加入 2 mL 现配 NBT/BCIP 显色液于黑暗中显色,用 50 mL 灭菌双蒸水终止显色反应。

1.3 组织原位杂交

1.3.1 杂交前预处理 将烘烤后的切片(5 μ m)经二甲苯脱蜡,梯度酒精下行至无酶水,空气干燥后用蛋白酶 K/0.1 mol \cdot L⁻¹ PBS(pH 7.4)消化 1~2

min,经甘氨酸处理终止蛋白酶反应后用 PBS 清洗 2 次,于 4% 多聚甲醛/0.1 mol·L⁻¹ PBS 固定 1 min 后,再用 PBS 清洗 2 次。

1.3.2 预杂交 在每张切片上滴加 20 μL 预杂交液(5×SSC,5×Denhardt,50%去离子甲酰胺,1% SDS,200 μg·mL⁻¹ 鲑鱼精 DNA)于湿盒内 42℃ 恒温箱中,预杂交 1 h,

1.3.3 杂交 滴加 20 μL 杂交液(5×SSC,5×Denhardt,50%去离子甲酰胺,1% SDS,250 μg·mL⁻¹ 鲑鱼精 DNA,10% 硫酸葡聚糖,探针),于湿盒内 42℃ 恒温箱中,杂交 18 h。

1.3.4 杂交后漂洗及显色 杂交后经 SSC、封闭液、抗地高辛 AP 液、马来酸缓冲液、显色缓冲液进行漂洗。再经 NBT/BCIP 显色液、无酶水、伊红复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明后封片照相。对照试验组中不加探针,而其余步骤均相同,作为阴性对照。

1.4 Real-Time PCR

1.4.1 探针设计与合成 Real-Time PCR 所用的引物与 RT-PCR 扩增所用的相同,TaqMan 探针序列为: enJSRV 5' (FAM)-TGATAAGCA-CAACTGTCAGAACCGC (Eclipse)-3'; β-actin 5' (FAM)-TGGCACCACACCTTCTACAACGAGC (Eclipse)-3',均由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4.2 Real-Time PCR 反应 反应体系如下:2 μL cDNA,12.5 μL SYBR Premix Ex Taq,上下游引物各 0.5 μL(2 μmol·L⁻¹),2 μL TaqMan 探针(0.2 μmol·L⁻¹),8.5 μL 无酶水。反应条件为 95℃ 预变性 30 s 后,45 次循环(95℃ 10 s,60℃ 退火 30 s),Real-Time PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳,在紫外灯下观察,可看到与目的片段大小一致的电泳条带。

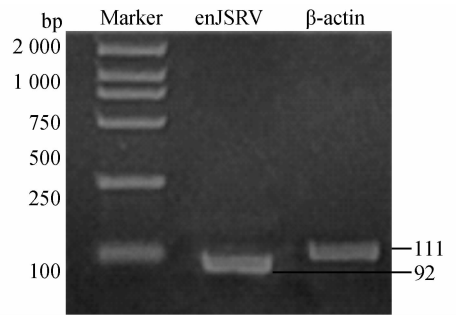
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 扩增结果表明, enJSRV mRNA 在各检测组织中均有表达,从图 1 中可以看到目的条带。序列测定结果表明, enJSRV 和 β-actin 的 RT-PCR 产物序列与 GenBank 中已登录序列的同源性都较高,分别在 95.9% 和 98% 以上,说明以上组织中所表达的基因片段均是其序列中的一段。

2.2 探针灵敏度检测结果

探针的检测结果如图 2 所示,从上到下依次为



目的条带分别为 92、111 bp

Band of target was 92 and 111 bp

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of RT-PCR amplification

阳性对照、地高辛标记的 enJSRV 探针所形成的斑点。图中 control DNA 浓度从 1 到 5 依次表示 10、3、1、0.3 和 0.1 pg·μL⁻¹。通过比对计算得出 enJSRV 探针浓度为 95 pg·μL⁻¹。

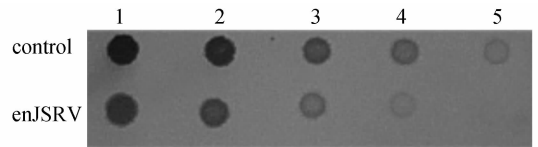


图 2 探针灵敏度检测结果

Fig. 2 Result of probe sensitivity test

2.3 原位杂交结果

原位杂交结果表明,在所有被检组织中均有阳性信号出现。图 3~5 分别为 enJSRV mRNA 在胎儿和羔羊免疫器官中的表达定位情况(由于妊娠 70 d 胎儿没有取到独立的肠淋巴结,故无肠淋巴结杂交结果)。从图中蓝紫色阳性信号分布情况可见: enJSRV mRNA 特异性的表达在胸腺小叶中,特别是在胸腺的皮髓交界处和髓质中,在淋巴结的各种淋巴细胞和脾脏的白髓检测到 enJSRV mRNA 的表达,并且在肺脏的支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞也检测到阳性信号。在所有的阴性对照中,均没有阳性信号出现,这进一步证实了探针的特异性。

2.4 Real-Time PCR 反应结果

Real-Time PCR 试验结果表明,不同组织间 enJSRV mRNA 的表达差异很大,以 enJSRV 在妊娠 70 d 胎儿肺脏组织中的表达为对照,在妊娠 130 d 脾脏组织的表达约为对照的 27 倍,在出生 7 日龄羔羊胸腺的表达约为对照的 22 倍,在妊娠 130 d 胸腺和肠淋巴结的表达约为对照的 10 倍,并均存在着

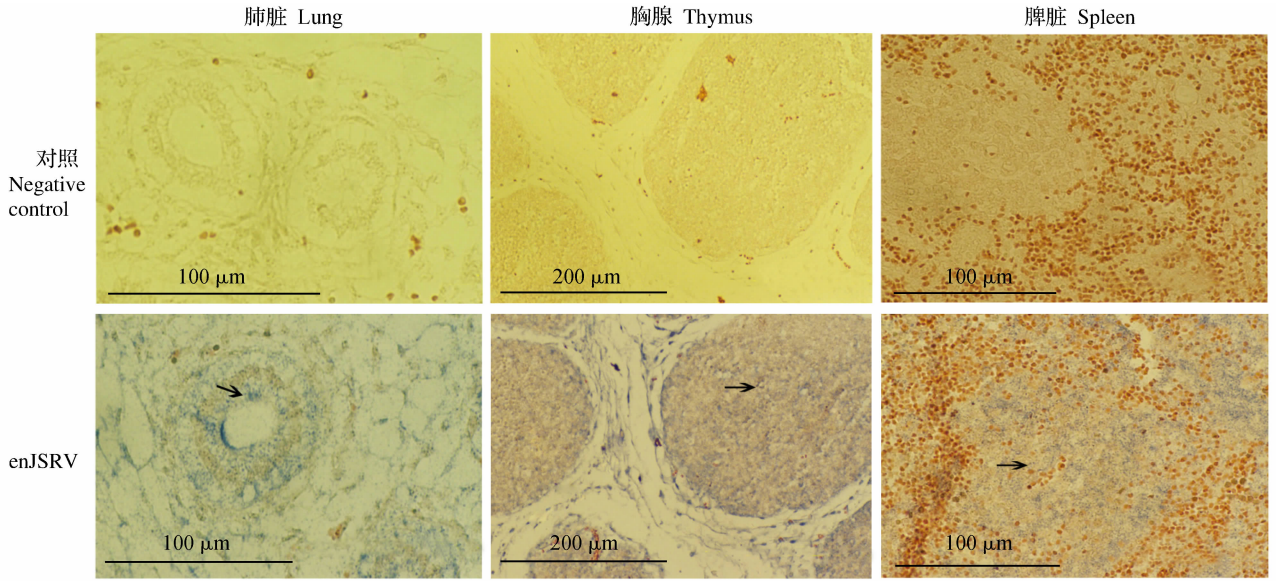


图 3 妊娠 70 d 胎儿组织原位杂交结果

Fig. 3 Expression of *enJSRV* mRNA in the tissues of 70 d fetal by In Situ Hybridization

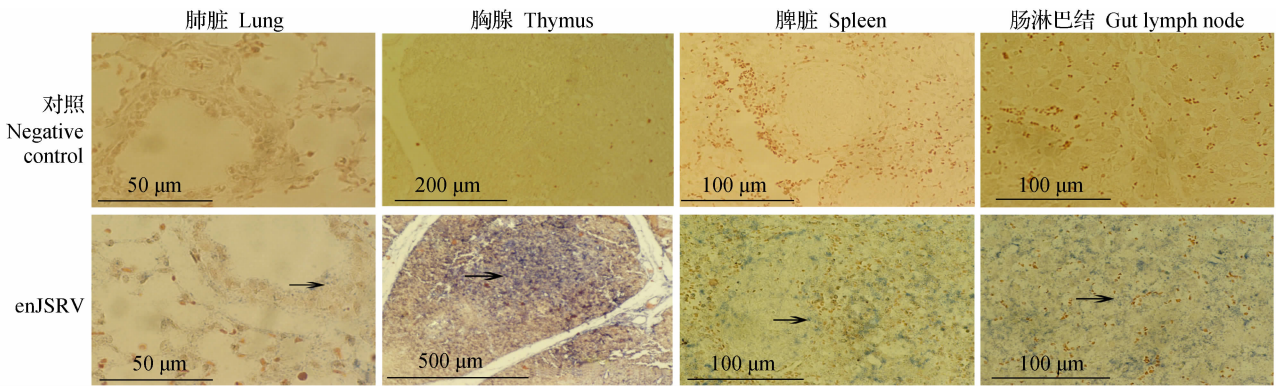


图 4 妊娠 130 d 胎儿组织原位杂交结果

Fig. 4 Expression of *enJSRV* mRNA in the tissues of 130 d fetal by In Situ Hybridization

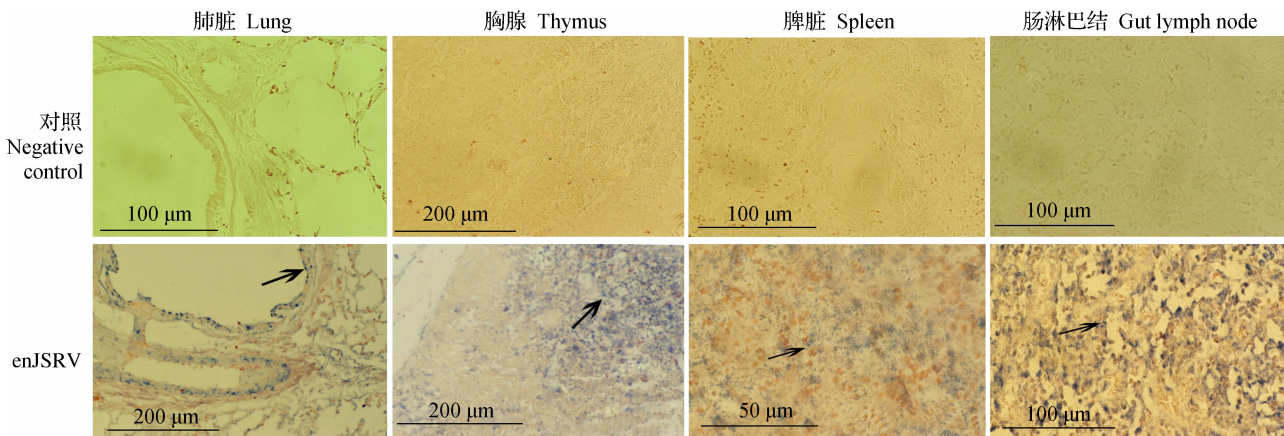
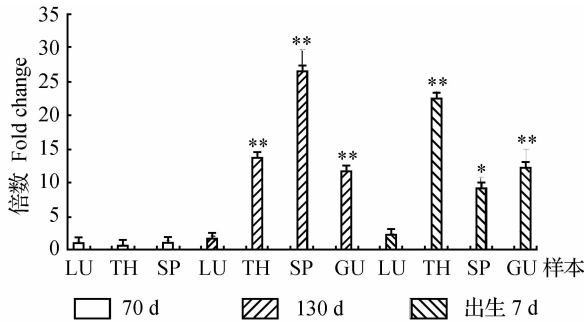


图 5 出生后 7 日龄羔羊组织原位杂交结果

Fig. 5 Expression of *enJSRV* mRNA in the tissues of 7 d newborn lambs by In Situ Hybridization

显著差异或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这表明 *enJSRV* mRNA 在免疫组织中有高水平的表达,而在肺脏中有低水平的表达。另外,在妊娠 70 d 所有组织中 *enJSRV* 的表达水平都相对较低,而妊娠 130 d 和出生 7 日龄羔羊其表达量较高(图 6)。



lung(LU), thymus(TH), spleen (SP) and gut lymph node (GU) ($n=3$) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 6 Real-Time PCR 检测 *enJSRV* mRNA 表达的结果

Fig. 6 Quantitative analyses of the expression of *enJSRV* mRNA in different tissues

3 讨论

很多研究已经表明 *enJSRV* mRNA 在子宫内膜,胎盘上皮细胞,腔上皮细胞均有表达,但关于 *enJSRV* mRNA 在胎儿免疫系统的表达研究却很少。在本研究中,根据 *enJSRV* 和 *exJSRV* 的高可变区 *env* 基因编码的 TM 区,设计引物并标记探针,利用组织原位杂交技术检测了 *enJSRV* mRNA 在胎儿和初生羔羊免疫系统中的表达情况,并且利用 Real-Time PCR 法对其表达进行了相对定量的研究。目前,关于 SPA 的发病机理还未清楚,*enJSRV* 在 SPA 发病过程中的作用报道也较少。Nakagawa 等认为 *enJSRV* 在致癌中不起直接作用,但能诱导机体产生免疫耐受,保护宿主免受相应外源性病毒的感染和避免疾病的发生^[7]。研究表明用敏感 PCR 技术在肺、肾、胸腺、骨髓、脾、纵隔淋巴结都可检测到 *enJSRV* mRNA^[8]。Spencer 等用原位杂交试验证明 *enJSRV* mRNA 在正常绵羊子宫腔内膜、子宫腺上皮、肠系膜淋巴结、胎儿的胸腺均有高度表达^[9]。也有人认为,相关的 *enJSRV* 在个体发育的胚胎期表达所产生的病毒蛋白,会使绵羊产生免疫耐受,从而对后天感染的不产生免疫应答,这也许是病羊体内检测不到特异性抗体的原因,而本试验所得的结果为免疫耐受这一假说提供了很有力的证据。组织原位杂交结果表明 *enJSRV* mRNA 在胎

儿和羔羊免疫器官均有表达,特别是在胸腺小叶皮髓交界处的表达,而在阴性对照组中均未检测到阳性信号。有试验证实在胚胎发育期,不成熟的自身免疫应答细胞接触自身抗原后,会被克隆清除,形成对自身抗原的耐受。而 T 细胞成熟过程中的阴性选择过程,即 T 细胞克隆清除主要发生在皮髓交界处^[10]。由此推断,在胚胎发育期,*enJSRV* mRNA 表达在胎儿免疫系统,特别是在胸腺的表达,使得不成熟的 T 淋巴细胞与其接触,这样,机体很可能将 *enJSRV* 识别为自身抗原,从而形成对所接触抗原的免疫耐受。然而,在核苷酸水平上,Gag 区上 *enJSRV* 与 *exJSRV* 具有 94%~95% 同源性,Pro 区上 *enJSRV* 与 *exJSRV* 具有 95%~99% 同源性,Pol 区上 *enJSRV* 与 *exJSRV* 具有 98% 同源性,Env 区上 *enJSRV* 与 *exJSRV* 具有 92% 同源性。如此高的同源性使得宿主免疫系统将 *exJSRV* 也识别为自身物质,并且对其不发生免疫反应,所以,在外周循环血液中我们检测不到循环抗体。Real-Time PCR 结果也表明 *enJSRV* mRNA 高水平表达在胎儿的免疫器官,说明 *enJSRV* 与胎儿免疫组织有着非常密切的关系。最近,研究表明胸腺在胚胎后期和新生儿细胞增长速度最快,造血活性最强,与此同时,脾脏的造血功能也达到高峰,淋巴细胞数量迅速增长,这可能是 *enJSRV* mRNA 在妊娠 130 d 胎儿和新生儿胸腺和脾脏高水平表达的另一原因。另外,本次研究结果表明 *enJSRV* mRNA 在不同时期的肺脏中也均有表达并且表达水平比较低,这与 Spencer 等人的试验结果是一致的^[9]。Spencer 和 Rai 等人的试验结果表明 *exJSRV* 和 *enJSRV* 都是利用透明质酸酶-2 (Hyal-2) 作为受体^[9, 11],且 *enJSRV* 与 Hyal-2 受体结合后,可降低 *exJSRV* 利用的受体,从而妨碍 *exJSRV* 的侵入,这充分说明 *enJSRV* 可以通过受体竞争干扰 *exJSRV* 的入侵。然而,*enJSRV* mRNA 在肺脏组织的低水平表达,使得 *exJSRV* 入侵时可利用的 Hyal-2 受体增多,这可进一步解释 *exJSRV* 感染的靶细胞主要为肺脏的 II 型肺泡上皮细胞与无纤毛细支气管上皮细胞。而 *enJSRV* mRNA 在妊娠 70 d 胎儿各组织中都低水平表达,这可能是因为这个时期器官初步形成,并且各组织的发育情况不同所导致。

近年来,很多试验证明内源性次要淋巴细胞刺激 (Minor lymphocyte-stimulating, MIs) 抗原是小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary umor virus,MMTV)

产生的蛋白。MMTV 是一种逆转录病毒,和 enJSRV 一样都是以前病毒(provirus)形式整合于小鼠细胞 DNA 中,小鼠可终生制造这种病毒蛋白,因之可视为一种自身超抗原^[12-13]。人类是否也有这种病毒性超抗原,目前尚不能肯定,但有人提出人类免疫缺损病毒(HIV)也是逆转录病毒,有可能是人类的病毒性超抗原。而 enJSRV 是否也是绵羊的病毒性超抗原这还有待于进一步研究。

4 结 论

enJSRV mRNA 在胎儿的不同时期的胸腺、脾脏、肠淋巴结、肺脏内均有阳性信号出现,而在阴性对照组均没有检测到阳性信号。enJSRV mRNA 在妊娠 130 d 胎儿和出生 7 日龄羔羊的胸腺和脾脏中表达水平比较高,且存在显著或极显著差异,而在肺脏中有低水平表达。这一试验结果进一步支持了机体对外源性病毒 exJSRV 的感染会产生免疫耐受这一假说。

参考文献:

- [1] PALMARINI M, FAN H. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93: 1603-1614.
- [2] PALMARINI M, DELASHERAS M, INGLIS N F, et al. Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76: 2731-2737.
- [3] PALMARINI M, DALZIEL R G, BAI J, et al. The exogenous form of Jaagsiekte retrovirus is specifically associated with a contagious lung cancer of sheep[J]. *J Virol*, 1996, 70: 1618-1623.
- [4] BAI J, BISHOP J V, CARLSON J O, et al. Sequence comparison of JSRV with endogenous proviruses: Envelope genotypes and a novel ORF with similarity to a G-protein-coupled receptor[J]. *Virology*, 1999, 258: 333-343.
- [5] ORTIN A, MINGUIJON E, DEWAR P, et al. Lack of a specific immune response against a recombinant capsid protein of jaagsiekte sheep retrovirus in sheep and goats naturally affected by enzootic nasal tumour or sheep pulmonary adenomatosis[J]. *Vet Immunol*, 1998, 61: 229-237.
- [6] SHARP J M, HERRING A J. Sheep pulmonary adenomatosis: demonstration of a protein which cross-reacts with the major core proteins of Mason-Pfizer monkey virus and mouse mammary tumour virus[J]. *J Gen Virol*, 1983, 64: 2323-2327.
- [7] NAKAGAWA K, HARRISON L C. The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity [J]. *Immunol Rev*, 1996, 152: 193-236.
- [8] PALMARINI M, HOLLAND M J, COUSENS C, et al. Jaagsiekte retrovirus establishes a disseminated infection of the lymphoid tissues of sheep affected by pulmonary adenomatosis[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2991-2998.
- [9] SPENCER T E, MURA M, GRAY C A, et al. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: Implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses[J]. *J Virol*, 2003, 77: 749-753.
- [10] JANEWAY C A. 免疫生物学[M]. 钱 旻, 马 瑞译. 北京:科学出版社, 2008:246-266.
- [11] RAI S K, DEMARTINI J C, MILLER A D. Retrovirus vector bearing jaagsiekte sheep retrovirus Env transduce human cells by using a new receptor localized to chromosome 3p21.3 [J]. *J Virol*, 2000, 74: 4698-4704.
- [12] GOLOVKINA T V, CHERVONSKY A V, DUDLEY J P, et al. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection [J]. *Cell*, 1992, 69: 637-645.
- [13] HELD H, SHAKHOV A N, IZUI S, et al. Superantigen-reactive CD₄⁺ T cells are required to stimulate B cells after infection with mouse mammary tumor virus[J]. *J Exp Med*, 1993, 177: 359-366.

(编辑 朱绯)