

# 马立克病病毒对鸡 *NRAMP1* 和 *TNFSF13B* 基因转录水平的影响

杨玲, 张娇, 刘宁, 董忠典, 王慧\*

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘要:** 旨在探究马立克病病毒(MDV)感染后,不同鸡体内 *NRAMP1* 和 *TNFSF13B* 基因的转录差异;比较不同鸡种对 MDV 的抗病性差异。选取山东省优良地方鸡种济宁百日鸡、汶上芦花鸡、寿光鸡作为研究对象,以 SPF 白来航鸡为对照。随机抽取 100 枚受精卵,在同一孵化箱内同时进行孵化、育雏和马立克病毒的人工攻毒,攻毒后 7~90 d,选取染病且存活的鸡,采集肝、脾等组织,进行荧光定量 PCR 检测。结果表明:在 7 日龄攻毒后 90 d 的脾组织中,汶上芦花鸡与寿光鸡和 SPF 鸡 *NRAMP1* 基因的 mRNA 转录量差异显著( $P < 0.05$ );在 7 日龄攻毒的肝组织中,济宁百日鸡的 *TNFSF13B* 基因 mRNA 的转录量显著高于其余 3 个鸡种( $P < 0.05$ )。结果提示:*NRAMP1* 作为家禽抗马立克病的候选基因,在感染了马立克病毒 90 d 后,转录量显著上调,可能是其增强鸡对 MDV 的抵抗力的重要因素;*TNFSF13B* 作为肿瘤相关抑制基因,在济宁百日鸡中的转录量最高,济宁百日鸡作为肿瘤发生率最高的鸡种,在最后存活的抗性鸡中转录量高。

**关键词:** 抗病性;马立克病毒;*NRAMP1* 基因;*TNFSF13B* 基因

中图分类号:S858.315.3

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2014)10-1679-05

## The Effect of Marek's Disease Virus on Transcription Levels of *NRAMP1* and *TNFSF13B* in Chickens

YANG Ling, ZHANG Jiao, LIU Ning, DONG Zhong-dian, WANG Hui\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** This experiment was designed to study the transcription of *NRAMP1* and *TNFSF13B* genes in chickens infected with Marek's disease virus (MDV), and reveal the disease resistance mechanism of different breeds. The excellent local breeds, Jining Bairi chicken, Wenshang Luhua chicken and Shouguang chicken in Shandong province were selected as the materials, at the same time, the SPF White Leghorns were selected as control. One hundred chicken embryos were randomly selected, hatched, brood. Artificially MDV inoculation was conducted at the age of 7 days. Then the liver and spleen of the survivors were picked up after raised for 90 days for quantitative PCR detection. At the spleen tissues, the mRNA transcription of *NRAMP1* gene of Wenshang Luhua chicken was significantly higher than that of Shouguang chicken and SPF chicken ( $P < 0.05$ ); at the liver tissues, mRNA transcription of *TNFSF13B* gene of Jining Bai'ri chicken was significantly higher than that of the other three breeds ( $P < 0.05$ ). These results indicated that *NRAMP1*, the resistance candidate gene, was significantly transcribed at 90 days post MDV challenge, and can be the important factor for enhancing resistance; *TNFSF13B*, as the tumor sup-

收稿日期:2014-03-13

基金项目:山东省农业良种工程(2011LZ015-4);地方优良家禽新品种选育(2012LZ017-4)

作者简介:杨玲(1990-),女,辽宁绥中人,硕士,主要从事家禽遗传育种及抗病性研究, E-mail: yanglingdongyi@163.com; 张娇(1988-),女,吉林松原人,硕士,主要从事家禽遗传育种及抗病性研究, E-mail: 404845571@qq.com。二人并列第一作者

\*通信作者:王慧,教授, E-mail: wanghui2328@sdau.edu.cn

pressor gene, was significantly transcribed in Jining Bai'ri chicken which was the most capability tumor incidence breed and showed the highest level of *TNFSF13B* in the survivors.

**Key words:** disease resistance; Marek's virus; *NRAMP1* gene; *TNFSF13B* gene

鸡马立克病(Marek's disease, MD)是由马立克病毒(Marek's disease virus, MDV)引起的具有传染性的淋巴细胞增生性肿瘤疾病,是家禽养殖业的重要传染病之一,与鸡新城疫、鸡传染性法氏囊病被称为鸡养殖业的三大主要疾病。MD在全世界范围内的养禽国家及地区均有流行,每年给家禽养殖业造成10亿~20亿美元的经济损失<sup>[1]</sup>。该病虽有疫苗控制,但随着强毒力毒株的出现,其流行及危害呈逐年上升的趋势。

天然抗性相关巨噬细胞蛋白(natural resistance associated macrophage protein 1, *NRAMP1*),也可称为溶质转运 11 成员 1(solute carrier family 11 member 1, *SLC11A1*)是目前发现的一个重要的抗病候选基因<sup>[2]</sup>。这一基因在人、小鼠及畜禽的综合抗病性方面都有研究报道,它主要影响动物的固有免疫,也与多种胞内病原菌的易感性或抗性有关<sup>[3-4]</sup>。*NRAMP1* 基因主要在网状内皮组织(脾、肝、肺和胸腺)的吞噬细胞中表达<sup>[5-6]</sup>,如巨噬细胞和嗜中性粒细胞及外周血细胞。有研究发现,通过鼠伤寒沙门菌感染侵染易感性小鼠,该基因功能丧失的小鼠在感染早期免疫力低下,但在感染后期的免疫功能正常<sup>[7]</sup>。表明 *NRAMP1* 基因在早期巨噬细胞与病菌互作时可能发挥重要作用。

肿瘤坏死因子 *SF13B*(tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B, *TNFSF13B*)是 TNF 超家族中的一员,能够强烈抑制一些肿瘤细胞系的生长。*TNFSF13B* 可以通过凋亡诱导抑制诸如前列腺癌、乳腺癌和胚胎肾细胞等的生长<sup>[8-9]</sup>;同时作为一种重要的 B 淋巴细胞刺激因子,*TNFSF13B* 的正常表达对 B 淋巴细胞活化和增殖非常重要。通过 *TNFSF13B* 缺陷的小鼠模型试验发现,在脾组织边缘区及滤泡中的 B 细胞显著减少,血清免疫球蛋白水平急剧下降,*TNFSF13B* 缺乏会导致体液免疫能力显著下降<sup>[10]</sup>。

许多地方家禽品种因具有较强的抗病力使得其在抗病性研究上具有重要的价值与意义。济宁百日鸡、汶上芦花鸡和寿光鸡作为山东省的优良地方鸡品种,因具有优良的肉质和蛋品质性状,使其具有较高的经济价值和遗传育种研究意义。为研究 3 个地

方鸡种对 MDV 的抗病性,以 SPF-白来航鸡作为对照,选取抗病候选基因 *NRAMP1* 和 *TNFSF13B*,检测在 MDV7 日龄攻毒后 90 d 时,2 个基因在 4 个鸡种肝、脾中转录量的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

由山东济宁百日鸡、汶上芦花鸡、寿光鸡种鸡养殖场提供经检测合格的济宁百日鸡、汶上芦花鸡、寿光鸡种蛋各 150 枚,SPF 鸡种蛋 88 枚来自山东省家禽研究所。孵化器恒温孵化后,选取得到 3 种地方鸡雏各 80 只,SPF 鸡雏 60 只。

### 1.2 攻毒及样品采集

同时对 4 个鸡种在 7 日龄进行 MDV 人工攻毒,腹腔注射  $1\ 500\ \text{PFU} \cdot \text{只}^{-1}$  的 Md5 毒株。人工饲养 90 d 后选取染病但存活的鸡,每组各 3 只,取其肝、脾组织,对照组鸡以相同方式处理。所有的组织采集后立即置于液氮中保存,并尽快进行总 RNA 提取。

### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

取 50 mg 左右的肝与脾组织分别在液氮中迅速研磨成粉末,然后转移到预先加有 1 mL Trizol 的 1.5 mL 离心管中,充分摇晃混匀后,参照 In-vitrogen Trizol 推荐的方法提取总 RNA。利用分光光度计检测总 RNA 的含量,提取得到的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后,得到清晰条带,可用于反转录。

稀释经过检测的总 RNA,使其质量浓度为  $1\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,用 PrimeScript<sup>RT</sup> reagent Kit (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司产品)进行 RNA 反转录。反转录体系: $5 \times$  Prime Script Buffer  $2\ \mu\text{L}$ , Primer Script RT Enzyme Mix  $0.5\ \mu\text{L}$ , OligodT Primer ( $50\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.5\ \mu\text{L}$ , Random 6 mers ( $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.5\ \mu\text{L}$ , Total RNA  $1\ \mu\text{L}$ , Rnase Free dH<sub>2</sub>O  $5.5\ \mu\text{L}$ 。反应条件: $37\ ^\circ\text{C}$  15 min,  $85\ ^\circ\text{C}$  5 s,反转录酶的失活反应,即得到 cDNA。模板反应结束后将 cDNA 保存于  $-20\ ^\circ\text{C}$  备用。

### 1.4 引物设计合成及实时荧光定量 PCR

Primer5.0 及 DNAMAN 设计持家基因  *$\beta$ actin*

及 *NRAMP1* (GGU40598) 基因引物, 其序列见表 1, *TNFSF13B* (NM\_204327. 2) 基因引物参考孙红艳报道设计<sup>[11]</sup>。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。将合成好的引物扩增并产物测

序, 对提取的 RNA 质量和反转录结果进行检测。使用 SYBR Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量反应。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence	目的基因长度/bp The length	退火温度/°C Anneal temperature
<i>NRAMP1</i>	F: CTGGGTGTGGTGACAGGGAA R: TGAGCCGATGATGGCGATTT	120	60
<i>TNFSF13B</i>	F: AATGCTCCTGTCCTCTTGTCTTG R: GACACGGGTGGCTGCTCTAG	135	60
<i>β-actin</i>	F: TGCTGTGTTCCCATCTATCG R: TTGGTGACAATACCGTGTTC	120	60

经浓度梯度试验, 获得最佳反应浓度, 用 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪检测转录量的差异。荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> (2 ×) 12.5 μL, PCR Forward Primer (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, ROX Reference Dye II (50 ×) \* 3 0.5 μL, cDNA 模板 (cDNA) 2.0 μL, dH<sub>2</sub>O 9.0 μL。反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 40 个 PCR 循环 (95 °C 5 s, 60 °C 30 s)。每个样品重复 3 次。通过对扩增结果进行分析, 荧光定量 PCR 过程中所获得的荧光信号, 均来自特异性扩增产物, 无非特异性扩增及引物二聚体。结果数据用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法来计算目的基因的相

对转录量<sup>[12]</sup>。

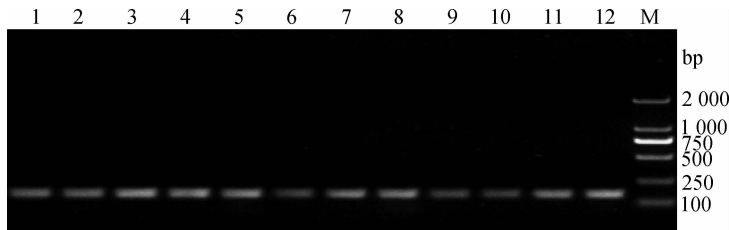
### 1.5 统计分析

试验数据采用 SPSS 13.0 软件的单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较法进行统计分析, 显著性水平 *P* 采用 0.05, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 扩增持家基因检测 RNA 质量

将反转录后得到的 cDNA 模板, 通过持家基因 *β-actin* 引物进行扩增, 得到一条长度为 120 bp 的目的条带, 说明所获得的 cDNA 片段完整, 可用于后续试验。



1~3. 汶上芦花鸡; 4~6. SPF 白来航鸡; 7~9. 济宁百日鸡; 10~12. 寿光鸡; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准  
1-3. Wenshang Luhua chicken; 4-6. SPF White Leghorn; 7-9. Jining Bairy chicken; 10-12. Shouguang chicken; M. DL2000 DNA marker

图 1 4 个鸡群 cDNA 的 *β-actin* 扩增结果

Fig. 1 PCR results of *β-actin* in four breeds of chickens

### 2.2 *NRAMP1* 基因的转录差异

饲养 90 d 后, 统计 7 d 攻毒组的死亡率统计分别如下: 汶上芦花鸡 48%; 济宁百日鸡 67%; 寿光鸡 86%; SPF 鸡 91%。*NRAMP1* 基因在攻毒 90 d 后的鸡肝、脾均有转录。在攻毒组脾中, 汶上芦花鸡与

寿光鸡和 SPF 鸡转录量差异均达到了显著水平 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。在这一组中, *NRAMP1* 基因 mRNA 转录量在汶上芦花鸡中最高, SPF 鸡最低。4 个鸡种 *NRAMP1* 基因的 mRNA 转录量, 在肝组织的差异皆不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 2 MDV 攻毒 90 d 后 *NRAMP1* 基因在不同鸡种肝、脾中的转录量Table 2 Transcription of *NRAMP1* in livers and spleens of different chicken breeds at 90 days post MDV challenge

组织 Tissue	汶上芦花鸡 Wenshang Luhua chicken	济宁百日鸡 Jining Bairi chicken	寿光鸡 Shouguang chicken	SPF 鸡 SPF White Leghorn
肝 Liver	0.09±0.02	0.18±0.02	1.82±0.45	1.10±0.32
脾 Spleen	4.67±0.64 <sup>a</sup>	2.39±0.89 <sup>ab</sup>	1.14±0.35 <sup>b</sup>	0.48±0.03 <sup>b</sup>

同行数据肩标不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同或无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。以下同

In the same row, values with different letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below

### 2.3 *TNFSF13B* 基因的转录差异

检测 4 个鸡种的 *TNFSF13B* 基因 mRNA 转录量, 在肝, 该基因在济宁百日鸡的转录量均显著高于其余 3 个鸡种 ( $P < 0.05$ ), 济宁百日鸡的 *TN-*

*FSF13B* 基因 mRNA 转录量最高, SPF 鸡最低 (表 3)。4 个鸡种的 *TNFSF13B* 基因 mRNA 转录量, 在脾中差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 3 MDV 攻毒 90 d 后 *TNFSF13B* 基因在不同鸡种肝、脾中的转录量Table 3 Transcription of *TNFSF13B* in livers and spleens of different chicken breeds at 90 days post MDV challenge

组织 Tissue	汶上芦花鸡 Wenshang Luhua chicken	济宁百日鸡 Jining Bairi chicken	寿光鸡 Shouguang chicken	SPF 鸡 SPF White Leghorn
肝 Liver	0.50±0.08 <sup>b</sup>	2.90±0.64 <sup>a</sup>	1.04±0.12 <sup>b</sup>	0.27±0.05 <sup>b</sup>
脾 Spleen	0.93±0.06	1.35±0.51	1.00±0.23	0.47±0.02

## 3 讨论

### 3.1 *NRAMP1* 基因在肝、脾中 mRNA 转录分析

*NRAMP1* 是一个重要的抗病候选基因, 该基因与各种疾病之间的易感性与抗病性的研究主要集中在结核杆菌、利什曼原虫等胞内病原的易感性或抗性上<sup>[7,13]</sup>。在家禽方面, 则主要集中在对沙门菌的研究中, 对 MDV 的易感性及抗病性研究较少。在攻毒(7 日龄)90 d 的脾组织的定量检测结果中, 汶上芦花鸡与 SPF 鸡、寿光鸡的 *NRAMP1* 基因 mRNA 转录量均差异显著 ( $P < 0.05$ ), 汶上芦花鸡转录量最高, SPF 鸡的转录量最低。对比本研究中各鸡种 7 日龄攻毒 90 d 后的死亡率, 芦花鸡的死亡率最低, SPF 鸡的死亡率最高, 从而表明 *NRAMP1* 基因高转录鸡对 MDV 的抗病性较强。结合相关研究结果, 可初步认为: 在马立克病毒感染鸡的后期, 即淋巴组织增生期, 病毒的基因组会整合到宿主的基因组中, 淋巴增生性变化会在这一阶段发展为肿瘤。这主要是由于在潜伏感染期被活化的 T 细胞发生了相关的转化, 主要由 T 淋巴细胞组成, 但同

时也有各类 B 淋巴细胞及巨噬细胞, 而 *NRAMP1* 基因决定了巨噬细胞通过转运金属离子从而使动物抵抗病菌感染<sup>[14]</sup>, 故 *NRAMP1* 基因的高表达会使动物对病菌的易感性降低。

### 3.2 *TNFSF13B* 基因在肝、脾中 mRNA 转录分析

已有研究表明, *TNFSF13B* 可抑制人淋巴瘤 U937 细胞的生长, 但具有剂量依赖性; 并可以活化胱天蛋白酶-3, 从而引起 PARP 的降解, 这是肿瘤细胞凋亡的标志<sup>[8]</sup>。在 7 日龄攻毒的肝中, 济宁百日鸡 *TNFSF13B* 基因 mRNA 的转录量与其余 3 种鸡的差异转录都达到了显著水平 ( $P < 0.05$ ), 其中, 济宁百日鸡最高, SPF 鸡的转录量最低。这是由于百日鸡肿瘤的发生率高于另外 3 个鸡种。MDV 在人工感染鸡后, 可在 1~3 个月内诱发各种内脏及组织的 T-淋巴细胞瘤。*TNFSF13B* 作为肿瘤相关抑制基因, 故在最后存活的抗性鸡中转录量高。从而表明, 在对 MDV 抗性较强的鸡种中, *TNFSF13B* 的表达量高。

在本研究中, 4 个鸡种 7 日龄攻毒饲养 90 d 后, SPF 鸡的死亡率最高, 表明 SPF 鸡对 MDV 的易感性较高。分析这是由于 SPF 鸡生长在屏障系统或

隔离器中, 并且无流行的主要鸡传染病病原的污染, 体内无母源抗体。但普通鸡群生活在自然环境中, 为了预防疾病的暴发, 鸡场会对多发的传染性疾病进行多次的疫苗免疫, 这就使得种蛋内会存在较高的母源抗体, 这些特异性的抗体会对同种病毒的增殖产生抑制作用, 因而 SPF 鸡的死亡率要高于其他鸡种。

通过本试验的研究, 对 *NRAMP1* 基因和 *TNFSF13B* 基因在 MDV 感染鸡过程中的作用机制进行了一定的阐明, 对山东省地方鸡种的抗病性育种研究具有一定的指导作用。但由于抗病性的遗传机制非常复杂、病原微生物与寄主动物的相互关系也十分复杂, 这就增加了抗病育种的难度。但随着分子遗传技术的发展及研究者的努力, 抗病基因的不断揭示, 相信只要能对疾病的遗传机制研究透彻, 畜禽类的抗病育种会取得更大的进步。

#### 4 结 论

对 4 个鸡群同时进行马立克病毒的人工攻毒试验, 并检测 MDV 感染后 4 种鸡群肝、脾中 *NRAMP1* 基因和 *TNFSF13B* 基因的 mRNA 转录变化。脾中 *NRAMP1* 基因 mRNA 转录量的下调, 使得鸡对 MDV 易感性增强。济宁百日鸡与另外三种鸡(汶上芦花鸡、寿光鸡和 SPF 白来航鸡)相比, 感染 MDV 后, 肿瘤发生率较高, 在存活的抗性鸡中, 肝中 *TNFSF13B* 基因的 mRNA 转录量高。表明 *NRAMP1* 和 *TNFSF13B* 可以作为抗病候选基因进行遗传抗性机制的研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] MORGAN R W, SOFER L, ANDERSON A S, et al. Induction of host gene expression following infection of chicken embryo fibroblasts with oncogenic Marek's disease virus[J]. *J Virol*, 2001, 75(1): 533-539.
- [ 2 ] BLACKWELL J M, GOSWAMI T, EVANS C A, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance[J]. *Cell Microbiol*, 2001, 3(12): 773-784.
- [ 3 ] GRUENHEID S, CELLIER M, VIDAL S, et al. Identification and characterization of a second mouse Nrap gene[J]. *Genomics*, 1995, 25(2): 514-525.
- [ 4 ] ANDREWS N C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1(3): 208-217.
- [ 5 ] CELLIER M, GOVONI G, VIDAL S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(5): 1741-1752.
- [ 6 ] JABADO N, JANKOWSKI A, DOUGAPARSAD S, et al. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrap1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(9): 1237-1248.
- [ 7 ] VIDAL S, TREMBLAY M L, GOVONI G, et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nrap1* gene[J]. *J Exp Med*, 1995, 182(3): 655-666.
- [ 8 ] MUKHOPADHYAY A, NI J, ZHAI Y, et al. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B, and c-Jun NH2-terminal kinase[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 15978-15981.
- [ 9 ] HE B, CHADBURN A, JOU E, et al. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL[J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 3268-3279.
- [ 10 ] SCHIEMANN B, GOMMERMAN J L, VORA K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway[J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2111-2114.
- [ 11 ] 孙红艳, 连 玲, 陈燕梅, 等. 马立克氏病病毒对鸡肿瘤相关基因 *TNFSF13B* 和 *ST18* 表达水平的影响[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(10): 1400-1403.
- [ 12 ] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [ 13 ] VIDAL S M, MALO D, VOGAN K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for *Bcg*[J]. *Cell*, 1993, 73(3): 469-485.
- [ 14 ] SUPEK F, SUPEKOVA L, NELSON H, et al. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(10): 5105-5110.