

# 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡组织白细胞介素 2 和白细胞介素 18 基因相对表达量的影响

李思明 唐艳强 谷德平 肖海红 韦启鹏 欧阳玲花\*  
(江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 南昌 330200)

**摘要:** 本试验旨在研究维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡组织白细胞介素 2 (*IL-2*) 和白细胞介素 18 (*IL-18*) 基因相对表达量的影响。试验选用 120 只丝毛乌鸡, 随机分为 5 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 6 只鸡。对照处理饲喂基础饲料, 各试验处理分别饲喂在基础饲料中添加 800、1 600、3 200 和 6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 的试验饲料。常规笼养 6 周。采集胸腺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和法氏囊, 检测 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量。结果表明: 6 400 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> 上调了 *IL-2* 基因在十二指肠、法氏囊和盲肠组织中的相对表达量, 而未见其在胸腺、空肠和回肠组织中的相对表达量上调; 6 400 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> 上调了 *IL-18* 基因在丝毛乌鸡胸腺、回肠、盲肠和法氏囊组织中的相对表达量。结果提示, 饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平与丝毛乌鸡体内 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量相关, 但作用存在组织差异。

**关键词:** 丝毛乌鸡; 维生素 D<sub>3</sub>; 白细胞介素

**中图分类号:** S816.7; S831

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2014)01-0197-06

维生素 D<sub>3</sub> 经肝脏、肾脏代谢后的主要活性形式为 1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], 有重要生理活性<sup>[1]</sup>。研究表明, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 不仅参与钙、磷代谢和骨质钙化, 还参与调节细胞的生长分化等过程, 对机体的非钙调效应十分广泛, 如调节免疫<sup>[2-4]</sup>。研究显示, 抗原呈递细胞 (APCs) 和激活的淋巴细胞均能合成维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过 VDR 的介导, 作用于树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和 T 细胞, 抑制致病性效应 T 细胞, 诱导调节性 T 细胞和细胞因子产生, 从而调控机体的免疫反应<sup>[2,5]</sup>。近年来, 维生素 D<sub>3</sub> 调控免疫功能的作用已成为国外低分子药物研究的热点之一, 但其研究多集中于体外试验, 且国内对维生素 D<sub>3</sub> 的研究报道甚少<sup>[4,6-7]</sup>。为此, 本试验旨在考察维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡组织细胞因子白细胞介素 2 (*IL-2*) 和白细

胞介素 18 (*IL-18*) 基因相对表达量的影响, 以期在生产应用积累资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物与试验设计<sup>[6]</sup>

试验选用 120 只丝毛乌鸡, 随机分为 5 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 6 只鸡。对照处理饲喂基础饲料, 各试验处理分别饲喂在基础饲料中添加 0、800、1 600、3 200 和 6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 的试验饲料。常规笼养 6 周。每个处理选择接近该处理平均体重、健康的乌鸡 4 只, 脱白致死, 剖腹, 采集胸腺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和法氏囊各 1~2 g, 用剪刀剪成 50~100 mg 大小的组织块, 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水配制成的生理盐水洗去表面血液, 放入 2 mL 冻存管, 标记, 液氮速冻, -70 °C 冰箱保存。从杀鸡到组织样品投入

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (31160500); 江西省青年科学家培养计划项目资助 (20112BCB23030)

作者简介: 李思明 (1976—), 男, 江西永新人, 博士, 副研究员, 主要从事动物营养与饲料研究。E-mail: lisiming16@163.com

\* 通讯作者: 欧阳玲花, 副研究员, E-mail: 466095865@qq.com

液氮速冻,整个过程在 20 min 内完成。

## 1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中鸡的  $\beta$ -肌动蛋白(内参基因)、*IL-2* 和 *IL-18* 基因序列,利用 Primer Premier

5.0 软件设计引物,引物序列及参数见表 1,通过 NCBI 中 Blast 功能,初步检测引物的特异性。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Genes	序列 Sequences (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.	产物大小 Product size/bp
$\beta$ -肌动蛋白 $\beta$ -actin	上游 Forward: TCACCAACTGGGATGATATGGA 下游 Reverse: TTGGCTTTGGGGTTCAGG	NM_205518	118
白细胞介素 2 <i>IL-2</i>	上游 Forward: ACACCGGAAGTGAATGCAAG 下游 Reverse: CAAAGTTGGTCAGTTCATGGAGA	NM_204153	81
白细胞介素 18 <i>IL-18</i>	上游 Forward: TCAGCGTCCAGGTAGAAGATAAGA 下游 Reverse: CACCAGGAATGTCTTTGGGAAC	NM_204608	108

## 1.3 cDNA 的获得、荧光定量 PCR

采集的组织样品 cDNA 的获得、*IL-2* 和 *IL-18* 基因的荧光定量 PCR 均采用文献[6]的方法进行。

## 1.4 数据处理

数据处理亦采用文献[6]的方法进行。基因相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法表示。

## 2 结果

### 2.1 胸腺组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量

由图 1 可见,随着饲料维生素  $D_3$  添加水平的提高,*IL-2* 基因的相对表达量先升高,在 1 600 IU/kg 时达峰值,随后有所下降,6 400 IU/kg 再略有升高。随着饲料维生素  $D_3$  添加水平的提高,*IL-18* 基因的相对表达量的变化幅度较大,在 6 400 IU/kg 时达峰值。

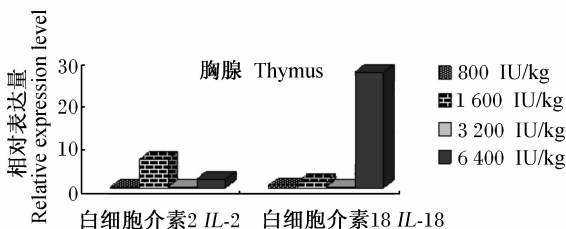


图 1 维生素  $D_3$  对丝毛乌鸡胸腺的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of vitamin  $D_3$  on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in thymic tissue of Silky fowls

### 2.2 肠道组织中 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量

由图 2 可见,随着饲料维生素  $D_3$  添加水平的提高,*IL-2* 和 *IL-18* 基因在丝毛乌鸡十二指肠组织中的相对表达量均呈现在 800 ~ 3 200 IU/kg 时逐渐下降,在 6 400 IU/kg 再次升高,但是达峰值的饲料维生素  $D_3$  添加水平不同,*IL-2* 基因相对表达量出现在 6 400 IU/kg,*IL-18* 基因相对表达量出现在 3 200 IU/kg。

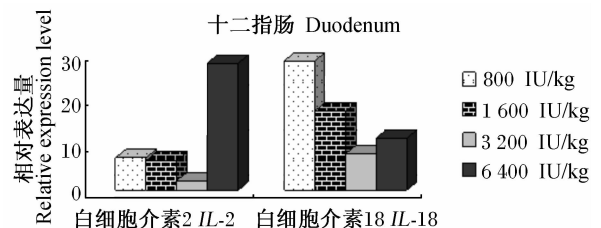


图 2 维生素  $D_3$  对丝毛乌鸡十二指肠的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of vitamin  $D_3$  on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in duodenal tissue of Silky fowls

由图 3 可见,随着饲料维生素  $D_3$  添加水平的提高,*IL-2* 基因在丝毛乌鸡空肠组织中的相对表达量先升高后降低,*IL-18* 基因在丝毛乌鸡空肠组织中的相对表达量则呈现非添加量依赖性的波动。*IL-2* 和 *IL-18* 基因在空肠组织的相对表达量较低,6 400 IU/kg 的维生素  $D_3$  对 *IL-2* 和 *IL-18* 基因在空肠中的相对表达量均不存在上调作用。

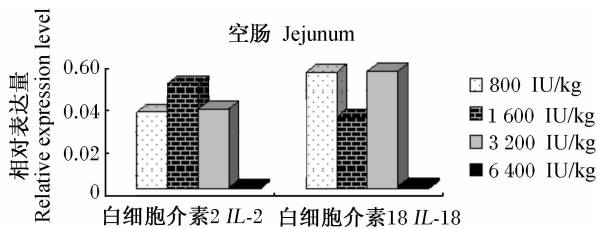


图 3 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡空肠的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in jejunal tissue of Silky fowls

由图 4 可见,随着饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平的提高,*IL-2* 基因在丝毛乌鸡回肠组织中的相对表达量逐渐降低,整体数值均较低。随着饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平的提高,*IL-18* 基因相对表达量呈快速下降趋势,但 6 400 IU/kg 时呈高表达态势。

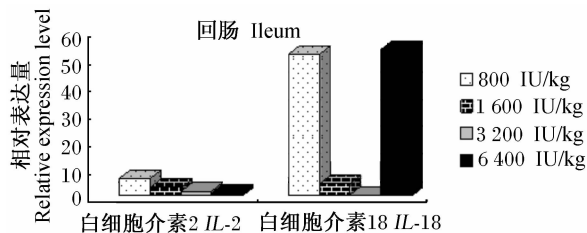


图 4 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡回肠的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in iliac tissue of Silky fowls

由图 5 可见,*IL-2* 和 *IL-18* 基因在丝毛乌鸡盲肠组织中的相对表达量随着饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平的提高呈逐渐上升态势。6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 能够上调 *IL-2* 基因在盲肠组织中的相对表达量;3 200 和 6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 均能使 *IL-18* 基因在盲肠组织中的相对表达量大幅度上调。

### 2.3 法氏囊组织中 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量

由图 6 可见,随着饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平的提高,*IL-2* 基因在丝毛乌鸡法氏囊组织中的相对表达量在 3 200 IU/kg 时大幅上调,在 6 400 IU/kg 时略有降低;*IL-18* 基因的相对表达量呈逐渐升高的趋势。3 200 和 6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 能使 *IL-2* 基因在法氏囊组织中的相对表达量大幅度上调;

6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 能使 *IL-18* 基因在法氏囊组织中的相对表达量上调。

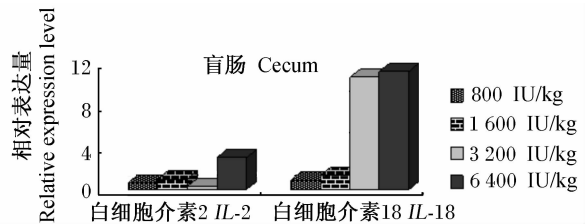


图 5 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡盲肠的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 5 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in cecal tissue of Silky fowls

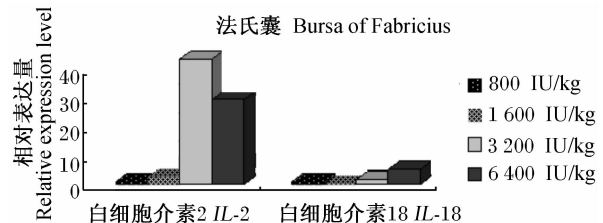


图 6 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡法氏囊的组织 *IL-2* 和 *IL-18* 基因相对表达量的影响

Fig. 6 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in bursa of Fabricius tissue of Silky fowls

## 3 讨论

*IL-18* 主要由单核巨噬细胞系的细胞分泌,具有多种生物学功能<sup>[8]</sup>,除能够诱导辅助性 T 细胞 1 (Th1)、自然杀伤细胞(NK)、自然杀伤 T 细胞(NKT)产生干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 外,还可诱导诸如 *IL-2*、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等其他多种细胞因子的产生。另外,鸡 *IL-18* 可增强 NK 的活性,上调细胞毒作用,促进 T 细胞增殖,在诱导 Th1 的分化成熟过程和 Th1 为主的细胞免疫反应中具有促进和调节作用。本试验结果表明,维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡体内细胞因子 *IL-2* 和 *IL-18* 基因具有调节作用,但在不同组织中的作用不同;6 400 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 有助于 *IL-18* 基因在丝毛乌鸡胸腺、回肠、盲肠和法氏囊组织中的相对表达量的上调。

据报道,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 可抑制自身反应性 T 细胞的增殖和活化;减少 T 细胞分泌 *IL-18*、IFN- $\gamma$  等细胞因子;抑制巨噬细胞产生白细胞介素 1

(IL-1)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等<sup>[8-10]</sup>。CD4<sup>+</sup> T 细胞中 Th1 及其分泌的细胞因子 IL-2、肿瘤坏死因子  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) 和 IFN- $\gamma$  参与细胞免疫为主的自身免疫性疾病, T 辅助细胞 2 (Th2) 和其分泌的细胞因子白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5)、白细胞介素 10 (IL-10) 和白细胞介素 13 (IL-13) 在以抗体形成为主的体液免疫中起重要作用<sup>[10]</sup>。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 在体内和体外对 Th1 和 Th2 的细胞因子分泌的作用不同, 能抑制单核细胞和 B 细胞分泌 IL-12, 而 IL-12 对 Th1 的活动和分化有重要作用。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 还能降低 IL-2、IL-1 和 TNF- $\alpha$  的分泌, 并诱导产生 IL-10 和 IL-5。与影响其他免疫细胞和免疫产物一样, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对细胞因子的影响有剂量依赖性。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 影响细胞因子分泌的最佳浓度为 10<sup>-7</sup> ~ 10<sup>-9</sup> mol/L<sup>[11]</sup>。维生素 D<sub>3</sub> 能调节不同免疫细胞的细胞因子表达, 且对不同细胞因子的调控不尽一致。本试验结果表明, 维生素 D<sub>3</sub> 对 IL-2 基因的调控与 IL-18 基因不同; 高剂量维生素 D<sub>3</sub> 有助于 IL-2 基因在十二指肠、法氏囊和盲肠的相对表达量的上调, 但对其在胸腺、空肠和回肠中的表达无上调作用; 维生素 D<sub>3</sub> 对 IL-2 和 IL-18 基因的调控与其添加水平相关, 且对不同组织存在诱导差异。

研究证实, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过细胞因子基因下游的转录调控该细胞因子, 活化 T 细胞核因子及核因子  $\kappa$ B 在其中具有重要作用<sup>[11]</sup>。IL-2、白细胞介素 3 (IL-3)、IL-4、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等细胞因子基因下游的启动子都具有活化 T 细胞核因子 (NFAT) 元件, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 与 VDR 结合, 影响启动子复合物的稳定性, 从而抑制基因的转录<sup>[12]</sup>。本试验中维生素 D<sub>3</sub> 对细胞因子的诱导, 可能也通过相似的调控途径, 具体途径有待进一步验证。

据报道, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 及其类似物能抑制 DC 的成熟, 使其处于未成熟状态, 且对促使其成熟的刺激反应钝化, 因此不能激活初始 T 细胞, 使免疫反应不能继续<sup>[13]</sup>。在免疫应答和产生的免疫效应中, DC 的成熟起关键作用。研究证实, 将低浓度 (10<sup>-12</sup> ~ 10<sup>-8</sup> mol/L) 的 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 和小鼠骨髓共同孵育, 显著抑制了 DC 表达 CD40 等表面标志因子基因, 并减少白细胞介素分泌, 但不影响 DC 数量; 较高浓度下, 显著抑制 DC 产生<sup>[14-15]</sup>。体内研究中, 在 VDR 基因敲除的小鼠中, 可见小鼠的皮下淋巴结明显增生, 结内成熟

DC 显著增多, 可以认为生理水平的 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 DC 成熟; 阻断 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 和 VDR 的结合, 可促进 DC 成熟。本试验中维生素 D<sub>3</sub> 对细胞因子基因相对表达量的影响可能也与 DC 细胞的成熟度相关。

## 4 结 论

① 6 400 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> 上调了 IL-2 基因在十二指肠、法氏囊和盲肠组织中的相对表达量, 未见其在胸腺、空肠和回肠组织中的相对表达量上调。

② 6 400 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> 上调了 IL-18 基因在丝毛乌鸡胸腺、回肠、盲肠和法氏囊组织中的相对表达量。

③ 饲料维生素 D<sub>3</sub> 添加水平与丝毛乌鸡体内 IL-2 和 IL-18 基因相对表达量相关, 但作用存在组织差异。

## 参考文献:

- [1] BONJOUR J P, CHEVALLEY T, FARDELLONE P. Calcium intake and vitamin D metabolism and action, in healthy conditions and in prostate cancer[J]. The British Journal of Nutrition, 2007, 97(4): 611-616.
- [2] BIKLE D. Nonclassic actions of vitamin D[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009, 94(1): 26-34.
- [3] 李思明, 欧阳玲花, 韦启鹏, 等. 维生素 D<sub>3</sub> 的免疫功能及其对家禽免疫细胞和免疫因子的调节[J]. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1189-1192.
- [4] 李思明, 周定刚. 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌鸡的 3 个  $\beta$ -防御素基因在不同组织中表达的影响[J]. 营养学报, 2010, 22(1): 93-94, 96.
- [5] JONES G. Phosphorus metabolism and management in chronic kidney disease; expanding role for vitamin D in chronic kidney disease; importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[J]. Seminars in Dialysis, 2007, 20(4): 316-324.
- [6] 李思明, 周定刚. 维生素 D<sub>3</sub> 对丝毛乌骨鸡组织中  $\beta$ -防御素基因的表达调控[J]. 动物营养学报, 2009, 21(4): 573-579.
- [7] LI S M, OUYANG L H, ZHOU D G. Effects of vitamin D<sub>3</sub> on expression of defensins, Toll-like receptors, and vitamin D receptor in liver, kidney, and spleen of

- Silky fowl[J]. Czech Journal of Animal Science, 58 (1):1-7.
- [ 8 ] O' KELLY J, HISATAKE J, HISATAKE Y, et al. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2002, 109 ( 8 ): 1091-1099.
- [ 9 ] FROICU M, CANTORNA M T. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury[J]. BMC Immunology, 2007, 8:5.
- [10] KONG J, GRANDO S A, LI Y C. Regulation of IL-1 family cytokines IL-1alpha, IL-1 receptor antagonist, and IL-18 by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in primary keratinocytes[J]. Journal of Immunology, 2006, 176 (6):3780-3787.
- [11] TSE A K W, WAN C K, SHEN X L, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces biphasic NF-κB responses during HL-60 leukemia cells differentiation through protein induction and PI3K/Akt-dependent phosphorylation/degradation of IκB [J]. Experimental Cell Research, 2007, 313(8):1722-1734.
- [12] JAMES S Y, WILLIAMS M A, NEWLAND A C, et al. Leukemia cell differentiation; cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D[J]. General Pharmacology: The Vascular System, 1999, 32 ( 1 ): 143-154.
- [13] SZELES L, KERESZTES G, TOROCSIK D, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype[J]. Journal of Immunology, 2009, 182(4):2074-2083.
- [14] GRIFFIN M D, DONG X Y, KUMAR R. Vitamin D receptor-mediated suppression of RelB in antigen presenting cells; a paradigm for ligand-augmented negative transcriptional regulation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 460(2):218-226.
- [15] MATHIEU C, VAN ETTEN E, DECALLONNE B, et al. Vitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as modulators in the immune system[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 89/90 (1/2/3/4/5):449-452.

## Effects of Vitamin D<sub>3</sub> on the Relative Expression Levels of Interleukin 2 and Interleukin 18 Genes in Tissues of Silky Fowls

LI Siming TANG Yanqiang GU Deping XIAO Haihong WEI Qipeng OUYANG Linghua\*

(*Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China*)

**Abstract:** The aim of this experiment was to research the effects of vitamin D<sub>3</sub> on the relative expression levels of interleukin 2 (*IL-2*) and interleukin 18 (*IL-18*) genes in tissues of Silky fowls. One hundred and twenty Silky fowls were randomly allotted to 5 treatments with 4 replicates in each treatment and 6 fowls per replicate. Fowls in control treatment were fed a basal diet, while those in experimental treatments were fed the basal diet supplemented with 800, 1 600, 3 200 and 6 400 IU/kg vitamin D<sub>3</sub>, respectively. Fowls were fed for 6 weeks in cages. The tissues (thymus, duodenum, jejunum, ileum, cecum and bursa of Fabricius) were collected for the analysis of relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes. The results showed as follows: 6 400 IU/kg vitamin D<sub>3</sub> up-regulated the relative expression level of *IL-2* gene in tissues of duodenum, bursa of Fabricius and cecum, but no regulation was found in tissues of thymus, jejunum and ileum; 6 400 IU/kg vitamin D<sub>3</sub> up-regulated the relative expression level of *IL-18* gene in tissues of thymus, ileum, cecum and bursa of Fabricius of Silky fowls. The results indicate that dietary supplemental level of vitamin D<sub>3</sub> can affect the relative expression levels of *IL-2* and *IL-18* genes in Silky fowls, but the effects are differ in different tissues. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1):197-202]

**Key words:** Silky fowl; vitamin D<sub>3</sub>; interleukin