

IL6 基因内含子 3 多态性与仔猪腹泻、生长和公猪繁殖性状的关联分析

查安东¹, 邢桂玲¹, 高晓雯¹, 张 龙², 狄生伟¹, 王希彪¹, 牛步月^{1*}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 华中农业大学动物科学技术学院/动物医学院, 武汉 430070)

摘 要: 旨在研究猪 *IL6* 基因的多态性及其与猪经济性状相关的关联性, 寻找与仔猪腹泻、生长和公猪繁殖性状相关的分子标记。利用 PCR 扩增在 *IL6* 基因的内含子 3, 检测到 1 个 SNP 位点 g. 1704674C>T, 该 SNP 可引起 *Hpa* II 酶切位点的改变。通过 PCR-RFLP 检测 281 头民猪仔猪、182 头长白仔猪、215 头杜洛克公猪以及 69 头大白公猪 *IL6* 基因的多态性, 分析多态位点与仔猪腹泻、生长和公猪繁殖性状的关联性; 利用 Real-time PCR 技术分析 *IL6* 基因在 LPS 刺激民猪外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)后的表达模式。结果表明, 在民猪仔猪中, CC 型个体的腹泻指数显著高于 TT 型个体 ($P < 0.05$), CC 型个体的 14、21、28、35 日龄体重及日增重均显著低于 TC 型个体 ($P < 0.05$), 且 CC 型个体的 21 日龄体重也显著低于 TT 型个体 ($P < 0.05$); 在长白仔猪中, TT 型个体的出生重显著高于 CC 型个体 ($P < 0.05$), 7 日龄体重显著高于 TC 型个体 ($P < 0.05$); 在杜洛克公猪中, TT 和 TC 基因型个体射精量显著大于 CC 基因型个体 ($P < 0.05$); 在大白公猪中, CC 基因型个体精子密度显著大于 TC 基因型个体 ($P < 0.05$)。PBMC 受 LPS 刺激 12 和 24 h 后, *IL6* 基因表达量均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。综上所述, *IL6* 基因 g. 1704674C>T 位点对仔猪腹泻、生长以及公猪繁殖都有一定的影响, 可作为猪育种过程中一个潜在的分子标记。

关键词: *IL6*; SNP; 仔猪腹泻; 生长; 公猪繁殖

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1674-09

Association Analysis between *IL6* Gene Intron 3 Polymorphism and Piglet Diarrhea, Growth and Boar Reproduction Traits

ZHA An-dong¹, XING Gui-ling¹, GAO Xiao-wen¹, ZHANG Long², DI Sheng-wei¹,
WANG Xi-biao¹, NIU Bu-yue^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medicine,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to discover new molecular marker related to piglet diarrhea, growth and boar reproduction traits, the polymorphism of porcine *IL6* gene was investigated and the association analysis was performed in different pig breeds. The DNA fragment of *IL6* gene was amplified and sequenced. A SNP (g. 1704674C>T), which could alter the recognition site of *Hpa* II, was detected in intron 3 of *IL6*. The SNP was genotyped by PCR-RFLP in 281 Min piglets, 182 Landrace piglets, 215 Duroc boars and 69 Yorkshire boars. Its association with piglet diarrhea, growth and boar reproduction traits was analyzed. The expression of *IL6* was detected in PBMC

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(31301935)

作者简介: 查安东(1997-), 男, 安徽枞阳人, 本科生, 主要从事动物科学研究, E-mail: anton1223@163.com

* 通信作者: 牛步月, 副教授, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: niubuyue@neau.edu.cn

stimulated with LPS by real-time PCR. The results showed that Min piglets with CC genotype had significantly higher diarrhea index than TT genotype piglets ($P < 0.05$). The 14, 21, 28, 35-day body weight and ADG of Min piglets with CC genotype were significantly lower than that of TC genotype ($P < 0.05$), and the 21-day body weight of Min piglets was also significantly lower than that of piglets with TT genotype ($P < 0.05$). In Landrace piglets, birth weight of piglets with TT genotype was significantly higher than that of piglets with CC genotype ($P < 0.05$), and the 7-day body weight was significantly higher than that of individuals with TC genotype ($P < 0.05$). In Duroc boars, the ejaculate volume of boars with TT and TC genotype was significantly higher than that of boars with CC genotype ($P < 0.05$). In Yorkshire boar, the sperm density of boars with CC genotype was significantly higher than that of boars with TC genotype ($P < 0.05$). At 12 and 24 h after LPS stimulation, the expression of *IL6* gene was significantly increased in PBMC ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Therefore, it can be concluded *IL6* g. 1704674C > T had effect on piglet diarrhea, growth and boar reproduction traits, and which may be a potential molecular marker in pig breeding.

Key words: *IL6*; SNP; piglet diarrhea; growth; boar reproduction

白细胞介素 6 (Interleukin 6, *IL6*) 是一种具有多种生物学效应的细胞因子。1980 年 J. Weissenbach 等^[1] 发现成纤维细胞经 Poly I-C 刺激后能产生一种抑制病毒复制的细胞因子, 命名为 $\beta 2$ 干扰素 (Interferon- $\beta 2$, IFN- $\beta 2$)。T. Hirano 等^[2] 发现一种具有刺激 B 细胞分化功能的因子, 称 B 细胞分化因子。后又由于其具有不同的生物学功能, 还曾被命名为 B 细胞刺激因子-2 (B cell stimulatory factor 2, BSF-2)、溶细胞性 T 细胞分化因子 (Cytolytic T cell differentiation factor, CDF)、血小板生长素 (Thrombopoietin)、T 细胞替代因子样因子 (T cell replacing factor-like factor, TRF-LF)、巨噬细胞-粒细胞诱导蛋白-2 (Macrophage-granulocyte-inducing protein-2, MGI-2) 和肝细胞刺激因子 (Hepatocyte stimulating factor, HSF) 等。后来对上述分子的 cDNA 进行克隆, 证实它们是同一种细胞因子, 1986 年统一命名为 *IL6*^[3]。

IL6 的突变可能造成疾病的发生发展。如仇小强等^[4] 研究发现与 *IL6* -572 位点 CC 基因型相比, 携带 GG 基因型个体慢性 HBV 感染风险增加。S. Bek 等^[5] 研究表明 *IL6* 多态性 rs10499563 与炎症肠疾病显著相关。M. Z. Bandy 等^[6] 研究发现, *IL6* 启动子 -174G/C 区域单核苷酸多态性与肠癌风险降低之间存在显著的联系。N. M. Maintinguer 等^[7] 研究表明, *IL6* 基因 SNP rs1800795 G 等位基因与代谢综合征发病率增加存在相关。*IL6* 和年龄、体重及繁殖等也有关系。I. Wernstedt 等^[8] 发

现 *IL6* 在人类和啮齿类动物中能通过增加脂肪的消耗而抑制体重的增加, 高体重指数人群其血清瘦素也高, 其-174 位点中纯合子 CC 比例远高于体重指数低的人。P. F. Todendi 等^[9] 研究表明, 超重或肥胖的学龄期儿童有更高的 *IL6* 水平。猪的 *IL6* 基因位于染色体 9 上, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成^[10]。但有关猪 *IL6* 的功能和多态性的研究还较少。因此, 本试验在不同猪种中对 *IL6* 的部分序列进行了 PCR 扩增, 通过测序比对发现 *IL6* 基因的多态性, 利用 PCR-RFLP 检测出内含子 3 多态位点的基因型, 分析其与仔猪生长、腹泻以及种猪繁殖性状之间的关联性, 利用 Real-time PCR 技术分析 LPS 刺激猪外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 后 *IL6* 基因的表达, 以期了解 *IL6* 基因在猪体内的作用, 为其在猪分子遗传育种中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选取 (黑龙江省兰西县民猪种猪场) 2013 年秋季同期出生的 281 头民猪哺乳仔猪和 182 头长白哺乳仔猪作为试验动物, 仔猪出生 ~ 35 日龄断奶, 每天早上和下午各观察 1 次各圈舍内仔猪的排便情况, 并逐头检查肛门有无红肿和粪便污染以及猪圈内仔猪粪便状况, 然后进行仔猪腹泻评分并记录, 评分标准^[11] 见表 1。根据腹泻评分计算腹泻指数, 腹泻指数为仔猪出生 ~ 35 日龄粪便状况评分之

和。在试验期间,同时称量仔猪的出生重、7 日龄重、14 日龄重、21 日龄重、28 日龄重和 35 日龄断奶重,并进行记录和计算日增重,日增重=(35 日龄断奶重-出生重)/35。采集仔猪耳组织并放入 75% 的酒精中,利用 Genomic DNA Kit 试剂盒(上海生

工生物工程股份有限公司)提取基因组 DNA。

本试验还另选取 215 头杜洛克猪、69 头大白猪作为公猪繁殖性能研究的试验对象,对 284 头公猪的射精量以及精子的活力、活率、密度、畸形率、直线速度、曲线速度等性状进行检测,并提取猪精液基因组 DNA。

表 1 仔猪腹泻评分标准

Table 1 Grading criterion about piglet diarrhea

腹泻程度 Diarrhea level	粪便外观 Visual description of feces	腹泻评分 Diarrhea score
正常 The normal	条状或粒状	0
轻度腹泻 The slight diarrhea	粪便软硬,能成形	1
中度腹泻 The moderate diarrhea	稠状粪水无分离现象、稀便	2
重度腹泻 The serious diarrhea	液体、不成形、粪水分离,黏液便或脓便	3

1.2 引物设计及 PCR 扩增、测序

从 NCBI 下载猪 *IL6* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号:NM_214399.1) 和 DNA 序列 (GenBank 登录号:NC_010451.3)。以此序列为模板序列,利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 扩增引物和 Real-time PCR 引物(表 2),所有引物由生工生物工程股份有限公司合成。

PCR 反应体系:PCR Mix 12.5 μL , 上游、下游引物各 1.0 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、模板 DNA 2.0 μL , 加去离子水至 25.0 μL 。

PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

分别选取重度腹泻和健康民猪、长白猪,以其基因组 DNA 为模板分别进行 PCR 扩增,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒(生工生物工程股份有限公司)回收目的片段,回收纯化后的 PCR 产物直接送生工生物工程股份有限公司进行测序。利用 Cluster W 软件对测序结果进行多重序列比对,分析扩增片段中核苷酸的变异位点。

表 2 猪 *IL6* 基因扩增引物

Table 2 Porcine *IL6* gene amplification primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	产物/bp Product	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Tm
<i>IL6</i> -3F	TGCGAATGGGTCTCTGACT	698	57
<i>IL6</i> -3R	AATCGCTCTTCCCTCTGG		
<i>IL6</i> F	GCTACTGCCTTCCCTACC	145	60
<i>IL6</i> R	CACATCTCCTCTCTCATTGC		

1.3 PCR-RFLP 分析

PCR 产物酶切反应总体体系为 10 μL ,其中 PCR 产物 8.5 μL ,0.5 μL *Hpa* II 内切酶(10 U \cdot μL^{-1}),1 μL 10 \times Buffer。将样品混匀后离心,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切 5 h,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,在紫外灯下拍照,判定基因型。

1.4 定量 RT-PCR 检测 *IL6* 基因的表达

根据腹泻观察记录,选择 3 头 35 日龄断奶健康民猪仔猪,利用含有肝素钠的采血管,无菌采取外周血 10 mL。PBMC 的分离严格按照猪淋巴细胞分离液(天津灏洋)说明书操作,分离后的 PBMC 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 液(Hyclone)重悬,置于 6 孔板,加入 1 mg \cdot mL $^{-1}$ 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)分别刺激 0、12 和 24 h 后,收集细胞,以 0 h 为阴性对照组。利用 RNeasy Mini kit 试剂盒(QIAGEN)提取总 RNA,利用 The PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒制备 cDNA,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

以 cDNA 为模板,利用引物进行 Real-time PCR 扩增。总反应体系 20 μL :SYBR Premix Ex TaqII 染料 10 μL ,cDNA 模板 0.5 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL ,补灭菌双蒸水至 20 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,共 40 个循环。在 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 读板,进行熔解曲线分析。

1.5 数据分析

根据基因型统计分析结果计算 SNP 位点的基因型和等位基因频率,并进行遗传多态性分析。采

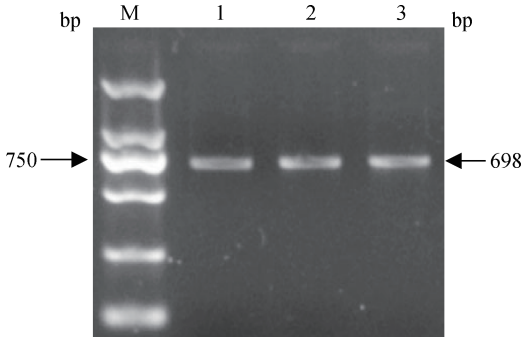
用 SAS 统计软件(SAS Institute Inc, Version 8.0) GLM 程序进行单标记方差分析。仔猪腹泻指数和生长性状的统计模型为 $Y_{ij} = \mu + G_i + F_j + e_{ij}$, 公猪繁殖性状的统计模型为 $Y_{ijkl} = \mu + G_i + F_j + S_k + A_l + e_{ijkl}$, 其中 Y_{ij} 和 Y_{ijkl} 为性状表型值, μ 为群体均值, G_i 为基因型效应, F_j 为家系效应, S_k 为季节效应, A_l 为年龄效应, e_{ij} 和 e_{ijkl} 为随机残差效应。

利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量, 基因差异表达的显著性使用双侧 t 检验来进行统计学分析。

2 结果

2.1 猪 IL6 基因部分序列扩增

利用引物 IL6-3, 以民猪和长白猪基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增片段包括 IL6 基因的第 3 外显子和部分第 2、3 内含子等。PCR 产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶检测(图 1), 条带清晰具有特异性, 可用于 PCR 产物测序。



M. DNA 相对分子质量标准 DL 2000; 1~3. PCR 扩增产物
M. DL 2000 marker; 1-3. PCR products

图 1 PCR 扩增产物检测

Fig. 1 Detection of PCR amplification products

2.2 猪 IL6 基因部分序列比对

PCR 扩增后, 将 PCR 产物分别进行回收和纯化, 送生工生物工程股份有限公司测序。所得序列利用 Cluster W 软件进行多重序列比对分析, 发现 IL6-3 引物扩增片段上 302 bp(C/T) 处存在 1 个 SNP, 可引起限制性内切酶 *Hpa* II 酶切位点(CCGG)的改变(图 2), 根据 SNP 命名法则^[12]将其命名为 NC_010451.3: g.1704674C>T。

2.3 PCR-RFLP 检测

对不同猪群的个体进行 PCR-RFLP 检测, PCR 产物经 *Hpa* II 酶切后, 产生 TT、TC 和 CC 3 种基因型(图 3)。当 NC_010451.3: g.1704674C>T 位点为 C 时, 扩增产物能被 *Hpa* II 酶切, 酶切后将产生 2 个片段, 分别为 397 和 301 bp(C 等位基因); 当

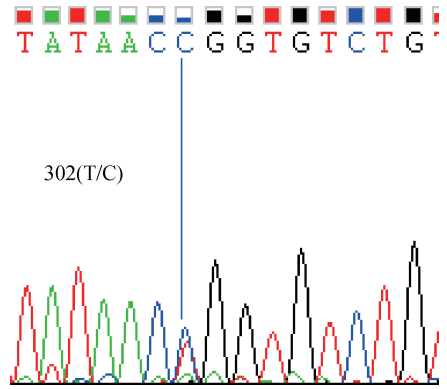
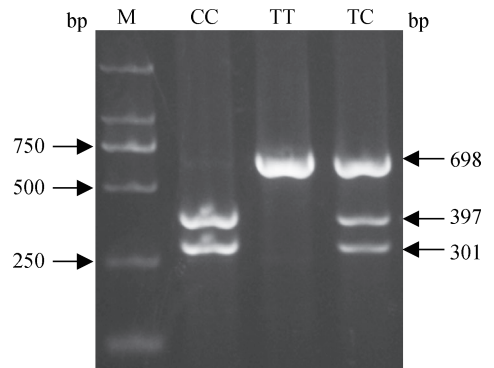


图 2 猪 IL6 基因内含子 3 中的单核苷酸变异

Fig. 2 SNP in intron 3 of porcine IL6 gene

NC_010451.3: g.1704674C>T 位点为 T 时, 由于 *Hpa* II 酶切位点消失, 扩增产物不能被 *Hpa* II 酶切, 所以仍为 698 bp(T 等位基因), 而当 NC_010451.3: g.1704674C>T 位点为杂合状态时, 即 2 种等位基因都存在, 扩增产物被 *Hpa* II 酶切后产生 3 个片段, 分别为 698、397 和 301 bp。



M. DNA 相对分子质量标准 DL 2000

M. DL 2000 marker

图 3 PCR 扩增产物 *Hpa* II 酶切分型结果

Fig. 3 The results of *Hpa* II digestion of PCR amplification products

2.4 群体遗传结构分析

在民猪、长白猪、杜洛克猪、大白猪群体中, IL6 基因 g.1704674C>T SNP 的基因型频率、等位基因频率见表 3。由表 3 可知, 在各群体中均存在 TT、TC 和 CC 3 种基因型, 长白、杜洛克、大白猪群体中以 CC 型居多, TC 型次之, TT 型最少, C 为优势等位基因; 民猪群体中以 TC 型居多, TT 型次之, CC 型最少, T 为优势等位基因。

2.5 IL6 基因的遗传多态性分析

遗传杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)、多态信息含量(PI)是评价群体遗传变异的重要指标, 不同的遗传参数体现各群体的遗传差异性。对 IL6

表 3 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 在不同猪种中的基因型和等位基因频率Table 3 Genotype and allele frequencies of SNP g. 1704674C>T of *IL6* gene in different pig breeds

群体 Breed	样本数 Sample size	基因型频率(<i>n</i>) Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		TT	TC	CC	T	C
长白 Landrace	182	0.06(11)	0.41(75)	0.53(96)	0.27	0.73
民猪 Min	281	0.24(68)	0.63(176)	0.13(37)	0.56	0.44
杜洛克 Duroc	215	0.04(8)	0.14(31)	0.82(176)	0.11	0.89
大白 Yorkshire	69	0.07(5)	0.23(16)	0.70(48)	0.19	0.81

g. 1704674C>T 位点进行遗传多态性分析显示(表 4), 民猪的杂合度最高, 为 0.49, 表示其遗传多样性较丰富, 遗传变异程度较高; 而杜洛克猪的杂合度最低, 为 0.19, 遗传变异程度最小。民猪的有效等位

基因数接近 2, 表明等位基因 T 和 C 在民猪中分布较均匀。长白猪的多态信息量为 0.31, 民猪的多态信息量为 0.37, 大白猪的多态信息量为 0.26, 均表现为中度多态。

表 4 *IL6* g. 1704674C>T SNP 的遗传多态性分析Table 4 The genetic polymorphism of SNP g. 1704674C>T of *IL6* gene

品种 Breed	纯合度 <i>H_o</i>	杂合度 <i>H_e</i>	有效等位基因数 <i>N_e</i>	多态信息含量 <i>PI_C</i>
长白 Landrace	0.61	0.39	1.64	0.31
民猪 Min	0.51	0.49	1.98	0.37
杜洛克 Duroc	0.81	0.19	1.24	0.18
大白 Yorkshire	0.69	0.31	1.44	0.26

2.6 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与民猪仔猪腹泻指数和生长性状的关联分析

民猪群体中, *IL6* g. 1704674C>T SNP 位点不同基因型与仔猪腹泻指数和部分生长性状的关联分

析结果见表 5。可以看出, CC 型个体的腹泻指数显著高于 TT 型个体($P < 0.05$), CC 型个体的 14、21、28、35 日龄体重及日增重均显著低于 TC 型个体($P < 0.05$), CC 型个体的 21 日龄体重也显著低于

表 5 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与民猪仔猪腹泻指数和生产性状的关联分析Table 5 Association analysis between *IL6* g. 1704674C>T SNP and diarrhea index and growth traits of Min piglets

性状 Trait	基因型(mean±SE) Genotype		
	TT	TC	CC
个体数 Individual number	68	176	37
腹泻指数 Diarrhea index	2.41±0.33 ^a	2.81±0.20 ^{ab}	3.53±0.44 ^b
出生重/kg Birth weight	1.02±0.03	1.00±0.02	0.99±0.04
7 日龄体重/kg 7-day body weight	1.66±0.05	1.73±0.03	1.59±0.07
14 日龄体重/kg 14-day body weight	2.28±0.08 ^{ab}	2.33±0.05 ^a	2.06±0.11 ^b
21 日龄体重/kg 21-day body weight	3.36±0.12 ^a	3.38±0.07 ^a	2.96±0.16 ^b
28 日龄体重/kg 28-day body weight	4.30±0.14 ^{ab}	4.45±0.09 ^a	4.02±0.19 ^b
35 日龄体重/kg 35-day body weight	5.44±0.17 ^{ab}	5.64±0.11 ^a	5.13±0.23 ^b
日增重/(kg·d ⁻¹) Daily gain	0.13±0.01 ^{ab}	0.13±0.00 ^a	0.12±0.01 ^b

同行数据肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同或无肩标表示差异不显著($P > 0.05$)。下同

In the same line, values with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same letter or no letter indicate difference was not significant ($P > 0.05$). The same as below

TT 型个体 ($P < 0.05$), 因此, 在育种过程中淘汰 CC 基因型个体可以提高仔猪群体平均抗腹泻能力和断奶体重。

2.7 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与长白仔猪腹泻指数和生长性状的关联分析

长白仔猪群体中 *IL6* g. 1704674C>T SNP 不同基因型与仔猪腹泻指数和部分生长性状的关联分析结果见表 6。TT 型个体的出生重显著高于 CC 型个体 ($P < 0.05$), 7 日龄体重显著高于 TC 型个体 ($P < 0.05$)。

表 6 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与长白猪仔猪腹泻指数和生长性状的关联分析表

Table 6 Association analysis between *IL6* g. 1704674C>T SNP and diarrhea index and growth traits of Landrace piglets

性状 Trait	基因型(mean±SE) Genotype		
	TT	TC	CC
个体数 Individual number	11	75	96
腹泻指数 Diarrhea index	5.55±1.86	3.69±0.78	5.16±0.75
出生重/kg Birth weight	1.63±0.10 ^a	1.44±0.04 ^{ab}	1.41±0.04 ^b
7 日龄体重/kg 7-day body weight	2.68±0.17 ^a	2.29±0.07 ^b	2.38±0.07 ^{ab}
14 日龄体重/kg 14-day body weight	3.95±0.34	3.58±0.14	3.68±0.14
21 日龄体重/kg 21-day body weight	5.49±0.48	5.09±0.20	5.16±0.20
28 日龄体重/kg 28-day body weight	6.82±0.62	6.63±0.26	6.76±0.26
35 日龄体重/kg 35-day body weight	8.29±0.76	8.09±0.32	8.29±0.32
日增重/(kg·d ⁻¹) Daily gain	0.19±0.02	0.19±0.01	0.20±0.01

表 7 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与杜洛克公猪繁殖性能的关联分析

Table 7 Association analysis between *IL6* g. 1704674C>T SNP and reproduction traits of Duroc boars

性状 Trait	基因型(mean±SE) Genotype		
	TT	TC	CC
射精量/mL Ejaculate volume	144.70±14.84 ^a	145.47±7.46 ^a	142.67±3.12 ^b
精子活力 Sperm motility	0.72±0.04	0.70±0.02	0.73±0.01
精子活率/% Sperm live-rate	77.01±3.57	80.61±1.80	82.14±0.75
精子密度/(亿·mL ⁻¹) Sperm density	2.98±0.26	2.79±0.13	2.92±0.06
畸形率/% Deformity rate	15.99±3.88	13.68±1.95	13.94±0.82
直线速度/(μm·s ⁻¹) Straight line velocity	131.52±25.73	144.74±12.94	161.10±5.41
曲线速度/(μm·s ⁻¹) Curvilinear velocity	105.61±37.50	129.50±18.86	149.06±7.89

2.9 *IL6* 基因在 LPS 刺激的 PBMC 中的表达分析

采用定量 RT-PCR 检测了 LPS 刺激 PBMC 后不同时间段 *IL6* 基因的表达量。结果如图 4 所示,

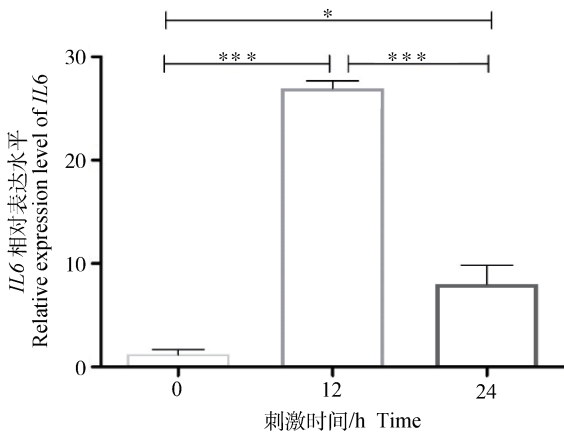
2.8 *IL6* 基因 g. 1704674C>T SNP 与公猪繁殖性能的关联分析

在杜洛克和大白猪 2 个品种中, *IL6* g. 1704674C>T SNP 位点不同基因型与公猪繁殖性状关联分析显示: 在杜洛克猪中, *IL6* g. 1704674C>T SNP 与射精量呈显著相关 ($P < 0.05$), TT 和 TC 基因型个体射精量显著大于 CC 基因型个体 (表 7)。在大白猪中, *IL6* g. 1704674C>T SNP 与精子密度呈显著相关 ($P < 0.05$), CC 基因型个体精子密度显著大于 TC 基因型个体 (表 8)。

LPS 刺激 0、12 h 后与刺激 24 h 后 PBMC 中 *IL6* 基因的表达量之间差异极显著, 在 LPS 刺激下 *IL6* 表达量显著增加。

表 8 *IL6* 基因 g.1704674C>T SNP 与大白公猪繁殖性能的关联分析Table 8 Association analysis between *IL6* g.1704674C>T SNP and reproduction traits of Yorkshire boars

性状 Trait	基因型(mean±SE) Genotype		
	TT	TC	CC
射精量/mL Ejaculate volume	193.23±25.00	206.64±13.93	212.18±8.04
精子活力 Sperm motility	0.70±0.03	0.71±0.02	0.71±0.01
精子活率/% Sperm live-rate	82.26±2.43	85.69±1.35	84.77±0.78
精子密度/(亿·mL ⁻¹) Sperm density	2.16±0.28 ^{ab}	2.10±0.15 ^b	2.19±0.09 ^a
畸形率/% Deformity rate	14.25±3.22	10.99±1.80	12.10±1.04
直线速度/(μm·s ⁻¹) Straight line velocity	203.29±16.04	211.82±8.94	193.62±5.16
曲线速度/(μm·s ⁻¹) Curvilinear velocity	222.68±17.59	233.66±9.80	216.70±5.65



*. $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$

图 4 不同的 LPS 诱导时间下 *IL6* 基因的表达量Fig. 4 Expression of *IL6* gene at different LPS induction times

3 讨论

现代养猪生产中,腹泻是造成仔猪生长缓慢和高死亡率主因之一。同时,随着猪的人工授精技术的普及,极大提高了公猪的利用效率,使得公猪的繁殖力对养猪生产的影响更大、更广。不同个体对腹泻抗性(或易感性)存在差异,不同公猪每次射精量、精液品质等也存在较大差异。这些差异受遗传基因等控制,因此,寻找控制腹泻、生长和公猪繁殖力主效基因和分子标记,培育高抗、高生长、高繁品种(系),对养猪业健康发展尤为重要。

IL6 是一种由多种细胞产生的具有多种生物功能的细胞因子。*IL6* 能促进细胞活化、增殖和分化,以自分泌、旁分泌、内分泌等形式对不同生理和病理产生不同效应,包括介导炎症反应、免疫反应等,在自身免疫、机体防御、排卵、着床、生长发育等方面存

在重要作用^[13]。正常情况下 *IL6* 在机体内浓度很低,具有调节免疫应答、促进细胞生长分化等多种生理功能^[14]。很多刺激下都能诱导不同组织细胞中 *IL6* 基因的转录,比如 RNA 或 DNA 病毒感染、细菌内毒素、脂多糖、血清以及干扰素(Interferon, IFN)等^[15]。本试验对民猪 PBMC 进行 LPS 刺激,也发现 LPS 刺激 12 和 24 h 后, *IL6* 基因表达量极显著上升,表明 *IL6* 基因表达与机体的免疫存在极显著的相关关系,与以上结果一致。民猪 CC 型个体的腹泻指数显著高于 TT 型个体($P < 0.05$),长白猪 CC 型个体的腹泻指数也呈高于 TC 型个体的趋势。由此推测,CC 可能是猪腹泻的不利基因型,提示在育种中淘汰 CC 型个体可能有利于提高种群的抗腹泻能力,但此结果仍需在更多的样本群中验证。民猪与长白猪腹泻指数相比,发现民猪 3 个基因型个体的腹泻指数都低于长白猪,表明民猪的抗腹泻能力强于长白猪,这与王希彪等的试验结果也一致^[16]。

近年来, V. Wallenius 等^[17]发现,敲除 *IL6* 基因的小鼠在成熟后会表现肥胖病,而在使用 *IL6* 处理 18 d 后,小鼠的体重又明显下降。此外, M. Szydlowski 等^[18]在 *IL6* 和 *TNF* 两个基因的启动子区发现了 3 个 SNP,关联性分析发现它们与猪的肥胖有关。K. L. Baumgartel 等^[19]研究也表明 *IL6* 多态性与粪便钙卫蛋白(Fecal calprotectin)、增重等相关。由此可见, *IL6* 基因可能与猪的生长性状存在相关,因此本试验将 *IL6* 内含子 3 区域多态性与仔猪部分生长性状进行了关联性分析。结果发现,长白猪群中,TT 型个体出生重显著高于 CC 型个体($P < 0.05$),7 日龄体重显著高于 TC 型个体

($P < 0.05$)。在民猪群体中, TC 型个体的 14 日龄、21 日龄、28 日龄、35 日龄体重及日增重显著高于 CC 型个体($P < 0.05$), TT 型个体的 21 日龄体重也显著大于 CC 型个体($P < 0.05$), 这与 CC 型个体的腹泻指数较高也是较一致的, 说明腹泻会导致仔猪生长变慢。由此推测在育种过程中, 特别是在民猪保种和生产中, 淘汰 CC 型个体可能有利于增加仔猪的断奶重和哺乳期日增重, 提高猪群的生产性能。

另外, IL6 也可以由生殖细胞、支持细胞、睾丸间质细胞以及睾丸间质的巨噬细胞等多种睾丸细胞产生, 与动物生殖关系密切^[20-25]。H. Hakovirta 等^[26]在小鼠中研究发现, IL6 是生精上皮阶段性、特异性的旁分泌调节剂, 能够特异性的抑制减数分裂过程中 DNA 的合成。还有研究发现, 不育症患者的血清 IL6 水平显著高于正常人, IL6 的表达水平与精子浓度之间为负相关^[27], 也有报道指出, IL6 能够促进精子获能, 激发顶体反应等^[28]。这些都表明 IL6 可能影响雄性个体的繁殖性能, 但目前 IL6 基因与种猪繁殖性能的相关研究还比较少。因此本试验分析了其与种猪繁殖性能的关联性, 结果发现, 在杜洛克猪中 IL6 基因与射精量呈显著相关($P < 0.05$), TT 和 TC 基因型个体射精量明显大于 CC 基因型个体, 说明在射精量性状上, T 等位基因为优势等位基因。而在大白猪中, IL6 基因与精子密度呈显著相关($P < 0.05$), CC 基因型个体精子密度明显大于 TC 基因型个体。可见, IL6 基因 g. 1704674C>T SNP 对公猪繁殖性状也存在一定影响, 但能否作为新遗传标记, 仍需后续大样本量群体或不同品种、世代验证。

4 结 论

本试验在 IL6 基因的内含子 3 检测到了一个 SNP 位点 IL6 g. 1704674C>T, 并建立了针对此位点的 PCR-*Hpa* II-RFLP 分型技术。性状关联分析发现, 猪 IL6 g. 1704674C>T 的多态性与民猪仔猪的抗腹泻能力、断奶重和日增重等性状显著相关, 对长白仔猪的出生重存在显著影响。此外, IL6 g. 1704674C>T 位点也影响杜洛克公猪的射精量和大白公猪的精子密度。这些结果也显示了 IL6 基因的多种生物学效应, 为其在猪中的应用奠定了基础。

参考文献 (References):

[1] WEISSENBACH J, CHERNAJOVSKY Y, ZEEVI

M, et al. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: *in vitro* translation and *Escherichia coli* cloning studies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77(12): 7152-7156.

[2] HIRANO T, YASUKAWA K, HARADA H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin[J]. *Nature*, 1986, 324(6092): 73-76.

[3] 蓝 天. 白细胞介素 6 及下游 JAK/STAT3 信号通路在前列腺相关疾病中的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2011.

LAN T. The functions and mechanism of interleukin-6 and downstream JAK/STAT3 signaling pathway in prostatic diseases[D]. Xi'an: Medical University of the Air Force, 2011. (in Chinese)

[4] 仇小强, 贝春华, 余红平, 等. 广西地区人群 IL-6 及 IL-10 单核苷酸多态性与 HBV 相关肝癌关联研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(5): 510-513.

QIU X Q, BEI C H, YU H P, et al. Study on the relationship between single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10 genes and HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2011, 32(5): 510-513. (in Chinese)

[5] BEK S, NIELSEN J V, BOJESEN A B, et al. Systematic review: Genetic biomarkers associated with anti-TNF treatment response in inflammatory bowel diseases[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44(6): 554-567.

[6] BANDAY M Z, BALKHI H M, SAMEER A S, et al. Strong association of interleukin-6 -174G/C promoter single nucleotide polymorphism with a decreased risk of colorectal cancer in ethnic Kashmiri population: A case control study[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317695940.

[7] MAINTINGUER N M, OKI E, FERREIRA CARIOCA A A, et al. Influence of IL1B, IL6 and IL10 gene variants and plasma fatty acid interaction on metabolic syndrome risk in a cross-sectional population-based study[J]. *Clin Nutr*, 2017, doi: 10.1016/j.clnu.2017.02.009. (in Press)

[8] WERNSTEDT I, ERIKSSON A L, BERNDTSSON A, et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, 28(10): 1272-1279.

[9] TODENDI P F, POSSUELO L G, KLINGER E I, et al. Low-grade inflammation markers in children and

- adolescents: Influence of anthropometric characteristics and CRP and IL6 polymorphisms[J]. *Cytokine*, 2016, 88: 177-183.
- [10] BRUCH J, RETTENBERGER G, LEEB T, et al. Mapping of type I loci from human chromosome 7 reveals segments of conserved synteny on pig chromosomes 3, 9, and 18[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 73(3): 164-167.
- [11] KELLY D, OBRIEN J J, MCCracken K J. Effect of creep feeding on the incidence, duration and severity of post-weaning diarrhoea in pigs[J]. *Res Vet Sci*, 1990, 49(2): 223-228.
- [12] DEN DUNNEN J T, DALGLEISH R, MAGLOTT D R, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants; 2016 Update[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(6): 564-569.
- [13] 苗 平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(4): 355-360.
- MIAO P, LU M S, ZHANG D Q. Recent progresses of the association research on IL-6/IL-6R and rheumatoid arthritis[J]. *Immunological Journal*, 2011, 27(4): 355-360. (in Chinese)
- [14] 任芳芳. 野生和人工繁育树鼯 CD4 以及 IL-6 分子的克隆与分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- REN F F. Cloning and analysis of CD4 and IL-6 in the wild and laboratory tree shrews[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2015. (in Chinese)
- [15] 王宇昕. IL-6 受体与 EGF 受体相互作用增强 IL-6 诱导的 STAT3 信号转导作用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.
- WANG Y X. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6R to EGFR[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2013. (in Chinese)
- [16] 王希彪, 李建敏, 许 愿, 等. 哺乳仔猪腹泻发生时间和程度的品种间差异及对增重的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2014, 45(9): 79-83.
- WANG X B, LI J M, XU Y, et al. Variations between breeds of suckling piglets in diarrhea occurrence time and degree and effect on weight gain[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2014, 45(9): 79-83. (in Chinese)
- [17] WALLENIUS V, WALLENIUS K, AHRÉN B, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity[J]. *Nat Med*, 2002, 8(1): 75-79.
- [18] SZYDŁOWSKI M, BUSZKA A, MACKOWSKI M, et al. Polymorphism of genes encoding cytokines IL6 and TNF is associated with pig fatness[J]. *Livest Sci*, 2011, 136(2): 150-156.
- [19] BAUMGARTEL K L, GROER M W, COHEN S M, et al. Maternal interleukin genotypes are associated with NICU outcomes among low-birth-weight infants[J]. *Biol Res Nurs*, 2016, 19(1): 36-44.
- [20] BOOCKFOR F R, WANG D, LIN T, et al. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture[J]. *Endocrinology*, 1994, 134(5): 2150-2155.
- [21] BRYNIARSKI K, SZCZEPANIK M, PTAK M, et al. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43(1): 37-41.
- [22] CUDICINI C, KERCRET H, TOUZALIN A M, et al. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat sertoli cells cultured in a dual culture compartment system[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(7): 2863-2870.
- [23] KERN S, ROBERTSON S A, MAU V J, et al. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis[J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(6): 1407-1416.
- [24] POTASHNIK H, ELHIJA M A, LUNENFELD E, et al. Interleukin-6 expression during normal maturation of the mouse testis[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2005, 16(2): 161-165.
- [25] RIVAL C, THEAS M S, GUAZZONE V A, et al. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis[J]. *J Reprod Immunol*, 2006, 70(1-2): 43-58.
- [26] HAKOVIRTA H, SYED V, JÉGOU B, et al. Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1995, 108(1-2): 193-198.
- [27] 林文龙. 白细胞介素 6 与血清生殖激素及精子浓度的相关性分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2012, 20(4): 250-252.
- LIN W L. Correlation analysis of plasma interleukin 6 level with serum reproductive hormones and sperm concentration[J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2012, 20(4): 250-252. (in Chinese)
- [28] LAFLAMME J, AKOUM A, LECLERC P. Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(2): 141-150.