

卢艳敏. 猪感染 PRRSV 后 Cathelicidins 抗菌肽基因的表达情况[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(2): 24-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.006

猪感染 PRRSV 后 Cathelicidins 抗菌肽基因的表达情况

卢艳敏

(衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000)

摘要:猪源抗菌肽主要包括防御素(defensins)和 cathelicidins 两大家族, cathelicidins 是一类在结构上存在很大差异, 含有保守 cathelin 区域的抗菌肽。猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是猪的一种高度传染性疾病, 对养猪业造成了巨大的经济损失, PRRSV 已成为严重威胁我国养猪业发展的重要传染病之一。主要研究猪感染 PRRSV 后体内 cathelicidins 抗菌肽的表达情况, 以期为 PRRSV 新药物的开发提供思路。结果表明, PR39、PG1、PG1-5、PMAP23 的表达受到 PRRSV 的影响, 猪在感染 PRRSV 后, 脾脏、肺、肺门淋巴结中的 PR39、PG1、PG1-5、PMAP23 表达量均上调, 其中 PRRSV 对 PR39 与 PG1-5 表达的影响较大。

关键词:猪; PRRSV; Cathelicidins; 抗菌肽; PR39; PG1; PG1-5; PMAP23

中图分类号:S858.28 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0024-03

抗菌肽是动物天然免疫反应的重要组成部分, 具有广谱抗菌活性, 对细菌、真菌、原虫和病毒均具有较强的杀伤作用^[1], 另外还可以抗癌、促进伤口愈合, 因此具有较大的药用开发价值。抗菌肽是生物体经诱导产生的具有抗菌活性的小分子多肽, 在机体抵抗病原体入侵中起着重要作用^[2], 具有分子量小、抗菌谱广、抗菌活性高、不易使病原菌产生耐药性、不破坏动物体细胞、无免疫原性等优点。抗菌肽作用机制独特, 主要有膜作用机制和胞内作用机制。最新研究表明, 抗菌肽还存在其他的杀菌机制, Chu 等研究发现, 抗菌肽 α -defensin 6 可以结合到鼠伤寒沙门氏菌表面, 通过自我组装, 在细菌周围形成一些小纤维和纳米样纤维, 从而减少细菌黏附到肠道黏膜, 以达到保护机体的目的^[3]。汪以真发现, 猪源 hepcidin 能够使大肠杆菌 K88 聚集成团, 形成网状结构包裹^[4]。

猪源抗菌肽主要包括防御素(defensins)和 cathelicidins 两大家族, 目前已发现了约 30 种猪源抗菌肽, 其中 Cathelicidins 有 PR-39、PG1-5 (protegrin)、PF1-2 (prophenin) 和 PMAP 等 4 类抗菌肽^[1]。cathelicidins 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 1~3 个外显子编码 N-端信号肽区域(PRE)和保守的 cathelin 区域(PRO), 第 4 个外显子编码 Pro 区的最后几个残基和高度特异的 C-端成熟肽区域。与其他抗菌肽相比, cathelicidins 家族的抗菌活性更强^[5-6], 抗菌作用迅速^[7], 对耐药菌株也具有较弱的活性^[8]、低的溶血活性以及细胞毒性, 在新型抗菌药物开发领域显示出巨大的潜力^[9]。

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是猪的一种高度传染性疾病, 最早在北美洲和欧洲发现, 我国于 1955 年首次分离到猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)。PRRSV 可引起妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎及产弱仔等繁殖障碍, 并可引起各年龄

阶段猪的呼吸道症状, 仔猪死亡率高, 同时还会导致免疫抑制和持续性感染等症状。PRRSV 对我国乃至世界养猪业造成了巨大的经济损失, 已成为严重威胁养猪业发展的重要传染病之一, 而现有疫苗及药物效果均不理想^[10]。本试验主要研究猪感染 PRRSV 后体内 cathelicidins 抗菌肽的表达情况, 为 PRRSV 新药物的开发提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 PRRSV 由国家野生动物疫病研究中心保存, PRRSV 感染 1 月龄无特定病原体(SPF)猪(24 头), 分别于感染后 12、24、72、168 h 取样(以未感染病毒的 1 月龄 SPF 猪 6 头作为对照), 取肺脏、肺门淋巴结、脾脏、肝脏、骨髓等组织, 将样品置于冻存管中, 液氮速冻, -80 °C 保存。

1.1.2 试剂 超纯 RNA 提取试剂盒(Ultrapur RNA Kit), 购自北京康为世纪生物科技有限公司; Supermo III M-MLV 反转录酶, 购自北京百泰克生物技术有限公司; dNTP Mixture、Ribonuclease Inhibitor 和 Oligo(dT)₁₈ Primers, 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); TransStart Green qPCR SuperMix, 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用超纯 RNA 提取试剂盒(Ultrapur RNA Kit)取冻存组织进行总 RNA 提取, 操作过程按照试剂盒说明书进行。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 紫外分光光度计下测定 RNA 浓度, 随后进行反转录, 合成 cDNA 第一链。以合成的 cDNA 作为 Real-Time PCR(即实时定量 PCR)分析的模板, -20 °C 保存备用。

1.2.2 Real-Time PCR Real-Time PCR(实时定量 PCR)引物(由上海英骏生物技术有限公司合成)序列^[11]见表 1, 按照北京全式金生物技术有限公司 TransStart Green qPCR SuperMix 说明书进行 Real-Time PCR, 反应体系: P₁ 0.5 μ L, P₂ 0.5 μ L, 2 \times TransStart™ Green qPCR SuperMix 12.5 μ L, Passive Reference Dye 0.5 μ L, 模板 1.0 μ L, ddH₂O 10.0 μ L。

收稿日期: 2016-08-27

基金项目: 河北省高层次人才资助项目(编号: 32)。

作者简介: 卢艳敏(1977—), 女, 河北冀州人, 博士, 副教授, 研究方向为动物分子生物学。E-mail: hsxlym@sina.com。

表1 Cathelicidin 引物序列

Cathelicidin 引物	引物序列 (5'→3')	核苷酸位置 (nt)	PCR 产物长度 (nt)
PR-39	CTGGTCACTGTGGCTTCTGCT	53~74	127
	GAGATTAGCTTCCGAGGACTGC	157~179	
Protegrin-1	AACGGGCGGTGAAACAGT	301~320	95
	CCCCTGACACCTTGAACCTCA	395~374	
Protegrin-4	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	278~302	189
	GTCCGACACAGAAGCAGATCCAACC	466~442	
Protegrin1-5	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	278~302	187
	TGCCGTCGCAACCGTCATCCT	464~444	
PMAP23	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	291~315	164
	AAATTTGGGTTTCTGTGGCCGACG	454~431	
PMAP36	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	291~315	215
	ACCCAAGGGTATTGAGCCGACAAT	505~482	
PMAP37	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	291~315	159
	TCCGACCACGATCACTGAGGAAAT	449~426	
Prophenin1/2	CGGAGCTGTGTGACTTCAAGGAGAA	280~304	363
	AAAGTGGAGCGGAGGGAACCA	643~621	
β -actin	ATCGTCCGGGACATCAAGG	256~274	109
	GGCAGCTCGTAGCTTCTC	364~345	

反应程序:95℃ 30 s,95℃ 5 s,55℃ 15 s,72℃ 10 s,40个循环。相对定量分析参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[12]。实时定量PCR分析共进行3次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 PR39 的表达情况

猪感染PRRSV之后,在脾脏、肺、肺门淋巴结中均检测到PR39的表达,且随着感染时间的增长,表达量也有所变化。如图1所示,猪感染PRRSV后,PR39在脾脏中的表达量在0.5、1、3和7d的4个感染时间段中,感染1d后表达量最高,其次为感染0.5d;猪感染PRRSV后,PR39在肺中的表达量在0.5、1、3和7d的4个感染时间段中,感染1d后表达量最高,其次为感染3d;猪感染PRRSV后,PR39在肺门淋巴结中的表达量在0.5、1、3和7d 4个感染时间段中,在感染1d后表达量最高,然后依次是感染0.5、3、7d,但感染0.5d和3d后的表达量差异不大。

综上所述,猪感染PRRSV后,PR39在肺、肺门淋巴结和脾脏3种组织中的表达量均呈现先升高后降低的趋势,且都是在感染1d后表达量达到最高值。

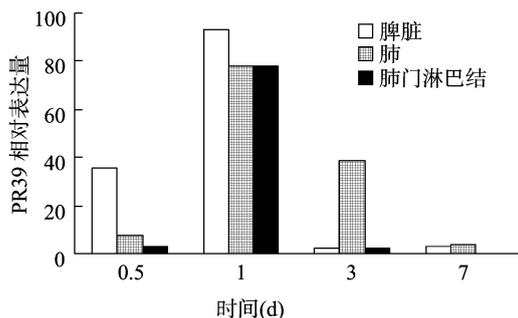


图1 SPF猪感染PRRSV后脾脏、肺、肺门淋巴结中抗菌肽PR39的相对表达量

2.2 Progerin 1 的表达情况

猪感染PRRSV之后,在脾脏、肺、肺门淋巴结中均检测到Progerin1(PG1)的表达,感染时间不同,其表达量有所变化,但差异较小。如图2所示,猪感染PRRSV后,Progerin1在脾脏中的表达量在0.5、1、3和7d 4个感染时间段中,在感染1d后表达量最高,其次为感染0.5、7、3d;猪感染PRRSV后,Progerin1在肺中的表达量在0.5、1、3和7d 4个感染时间段中,在感染1d后表达量最高,其次为感染3、7、0.5d;猪感染PRRSV后,Progerin1在肺门淋巴结中的表达量在0.5、1、3和7d 4个感染时间段中,在感染1d后表达量最高,然后依次是感染0.5、3、7d。综上所述,猪感染PRRSV后,Progerin1在脾脏、肺和肺门淋巴结3种组织中的表达量均呈现先升高后降低的趋势,且都是在感染1d后表达量达到最高值,Progerin1的表达量在3种组织中的变化均不明显。

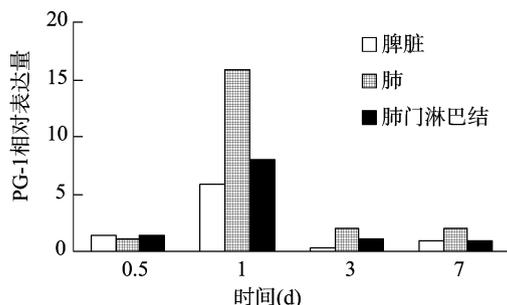


图2 SPF猪感染PRRSV后脾脏、肺、肺门淋巴结中PG1的相对表达量

2.3 progerin 1-5 的表达情况

猪感染PRRSV之后,在脾脏、肺、肺门淋巴结中均检测到Progerin1-5(PG1-5)的表达,在脾脏中表达量较高,而在肺与肺门淋巴结中表达量较少,随着感染时间的增长,表达量也有所变化。如图3所示,猪感染PRRSV后,progerin1-5在脾脏中的表达量在0.5、1、3和7d 4个感染时间段中,在感染

1 d后表达量最高,然后依次为0.5、7、3 d;猪感染PRRSV后,progerin1-5在肺中的表达量在0.5、1、3和7 d 4个感染时间段中,在感染1 d后表达量最高;猪感染PRRSV后,progerin1-5在肺门淋巴结中的表达量在0.5、1、3和7 d 4个感染时间段中,在感染1 d后表达量最高,然后依次是感染0.5、3、7 d,但感染3 d与7 d后的表达量差异不大。

综上所述,猪感染PRRSV后,progerin1-5在脾脏、肺和肺门淋巴结3种组织中的表达量均呈现先升高后降低的趋势,且都是在感染1 d后表达量达到最高值,其中在脾脏中的表达量变化较大,而在肺中的表达量变化不明显。

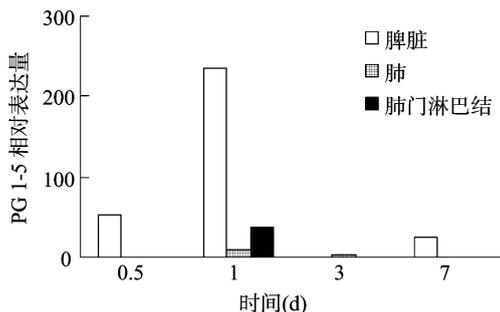


图3 SPF猪感染PRRSV后脾脏、肺、肺门淋巴结中PG1-5的相对表达量

2.4 PMAP23的表达情况

猪感染PRRSV之后,在脾脏中未检测到PMPA23的表达,肺、肺门淋巴结中检测到PMPA23的表达,且随着感染时间的增长,肺、肺门淋巴结中PMAP23的表达量有所变化。如图4所示,猪感染PRRSV后,PMAP23在肺、肺门淋巴结中的表达量在0.5、1、3和7 d 4个感染时间段中,在感染1 d后表达量最高,然后依次为感染0.5、3、7 d。

综上所述,猪感染PRRSV后,PMAP23在肺、肺门淋巴结中的表达量均呈现先升高后降低的趋势,且都是在感染1 d后表达量达到最高值。

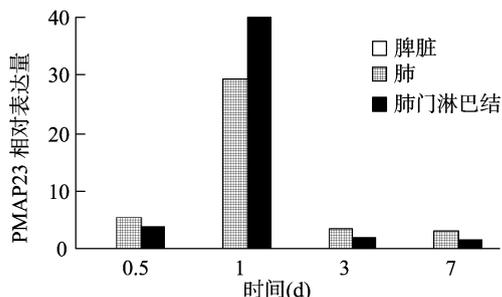


图4 SPF猪感染PRRSV后脾脏、肺、肺门淋巴结中抗菌肽PMPA23的相对表达量

3 讨论

抗菌肽分子量小,大部分具有12~50个氨基酸,具有强碱性、热稳定性以及广谱抗菌性等特点,在农业、医药等领域受到广泛的重视,全球科研人员对抗菌肽的作用机制、药物疗效、安全性等进行了深入的研究,并且建立了抗菌肽数据库(APD; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)^[13]。目前,该数据库已收录2700多种抗菌肽,其中272种抗菌肽来源于细菌,4种抗菌肽来源于古细菌,8种抗菌肽来源于原生物、13

种抗菌肽来源于真菌,335种抗菌肽来源于植物,2043种抗菌肽来源于动物。这些抗菌肽具有抗细菌、抗病毒、抗真菌、抗寄生虫、抗癌、抗原虫等活性。

研究发现,多种抗菌肽具有抗病毒活性,如抗艾滋病病毒、疱疹病毒。LL-37是人体内唯一的cathelicidins,通过直接的灭活试验发现,LL-37可以显著降低几种病毒对人的感染^[14-17]。动物抗菌肽通过与病毒糖蛋白或细胞表面的病毒受体的相互作用,可以直接抑制病毒的感染,也可以通过激活其他抗病毒反应来间接地抑制病毒感染^[18]。

本试验测定了PRRSV在感染猪后的不同时间段内,脾脏、肺、肺门淋巴结中cathelicidins表达量的变化情况。研究结果表明,PR39、PG1、PG1-5、PMAP23的表达受到PRRSV的影响,猪感染PRRSV后,脾脏、肺、肺门淋巴结中的PR39、PG1、PG1-5、PMAP23表达量上调,其中PRRSV对PR39与PG1-5表达量的影响较大。下一步工作合成PR39、PG1、PG1-5、PMAP23多肽,测定抗菌肽对PRRSV的灭活效果以及对细胞的毒性,为PRRSV新药物的开发提供新的思路。

参考文献:

- [1] Sang Y M, Ruchala P, Lehrer R I, et al. Antimicrobial host defense peptides in an arteriviral infection; differential peptide expression and virus inactivation [J]. *Viral Immunology*, 2009, 22(4): 235-242.
- [2] 刘伟, 皮雄娥, 王欣. 抗菌肽与肠道健康研究进展 [J]. *微生物学报*, 2016, 56(10): 1537-1543.
- [3] Chu H, Pazgier M, Jung G, et al. Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets [J]. *Science*, 2012, 337(693): 477-481.
- [4] 汪以真. 动物源抗菌肽的研究现状和展望 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(10): 2934-2941.
- [5] Wang Y P, Lu Z K, Feng F F, et al. Molecular cloning and characterization of novel cathelicidin-derived myeloid antimicrobial peptide from *Phasianus colchicus* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011(3): 314-322.
- [6] Feng F F, Chen C, Zhu W J, et al. Gene cloning, expression and characterization of avian cathelicidin orthologs, Cc-CATHs, from *Coturnix coturnix* [J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(9): 1573-1584.
- [7] Wang Y P, Hong J, Liu X H, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics [J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3217.
- [8] Turner J, Cho Y, Dinh N N, et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(9): 2206-2214.
- [9] 广慧娟. Cathelicidin家族抗菌肽研究进展 [J]. *动物学研究*, 2012, 33(5): 523-526.
- [10] 韩军, 杨汉春. 猪源抗菌肽的研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(5): 29-32.
- [11] Cheng Q, Jiang Z G, Xu C C, et al. CpG oligodeoxynucleotide promotes protective immunity in the enteric mucosa and suppresses enterotoxigenic *E. coli* in the weaning piglets [J]. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(10): 1249-1260.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

郑舒文,洪晓松,王 昊. 沙地云杉、沙冬青和山杏 ISSR-PCR 反应体系优化及种间多态性比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):27-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.007

沙地云杉、沙冬青和山杏 ISSR-PCR 反应体系优化及种间多态性比较

郑舒文,洪晓松,王 昊

(辽宁省盐碱地利用研究所,辽宁盘锦 124000)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术对沙冬青、沙地云杉、克旗山杏和凉城山杏的 PCR 反应体系进行了优化,分别建立了适合沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏的 ISSR 标记扩增体系;利用筛选出的 11 个扩增条带清晰且多态性高的引物对沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏进行遗传多样性研究。其中得到清晰谱带 187 条,多态性谱带 184 条,多态位点百分率(PPB)为 98.40%。应用 POPGENE32 分析表明:观察等位基因数(N_a)为 1.984 0,有效等位基因数(N_e)为 1.678 1,Nei's 基因多样性(H_e)为 0.396 4,Shannon 多态性信息指数(I')为 0.582 0。采用 UPGAM 法聚类分析表明:沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏可分为 3 类,克旗山杏和凉城山杏为 I 类,沙地云杉为 II 类,沙冬青为 III 类。聚类分析结果显示,除了山杏物种之间的亲缘性之外,沙冬青与山杏的亲缘关系较远,相似性较低;沙地云杉与山杏 2 个不同物种却有一定的相似性。

关键词:沙地云杉;沙冬青;山杏;ISSR;体系优化;遗传多样性

中图分类号:S722.3⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0027-03

沙冬青、山杏和沙地云杉都是内蒙古地区的特有植物。沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.] 属于豆科蝶形花亚科沙冬青属,是古老的残遗濒危物种,为常绿灌木,主要分布在我国西北地区,是中国北方干旱半荒漠地区唯一的旱生常绿阔叶灌木^[1-2],具有水土保持、固沙、观赏和药用价值^[3]。沙地云杉 (*Picea mongolica*) 是中国稀有珍贵树种,集中成片分布在生态环境恶劣的内蒙古自治区以克什克腾旗的白音敖包自然保护区,具有耐旱抗寒、防风阻沙、调节气候等特点^[4]。山杏 (*Siberian Apricot*) 又名西伯利亚杏,为蔷薇科杏属植物,主要分布在俄罗斯的西伯利亚、蒙古的东部和东南部以及我国北纬 40° 地区,抗低温能力强,根系发达,抗旱、耐瘠薄、耐盐碱,不耐涝。

内蒙古属典型的中温带季风气候,具有降水量少而不匀、

寒暑变化剧烈的显著特点^[5]。这些生存并且繁衍的植物为了适应恶劣的环境,生理性状发生改变的同时遗传因子肯定也会发生一系列的变化。因此本研究通过 4 种特有物种的遗传多样性的分析,为种间杂交育种提供理论基础,实现内蒙古特有植物的繁衍,进而为美化内蒙古的环境作出贡献。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

摘取沙冬青、山杏、沙地云杉的种子,分装放在布袋里,放在 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取各自的种子,去掉种皮,利用 CTAB 法提取基因组 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳的方法检测纯度和浓度,UVP 型凝胶成像分析系统拍照记录,最后分别装入 1.5 mL 离心管并保存在 -20 °C 的条件下。

1.2.2 PCR 扩增 ISSR-PCR 反应体系经过优化确定为 20 μ L,其中引物 1 μ L、*Taq* Mix 10 μ L、水 8 μ L、50 ng 的模板 1 μ L。引物序列由加拿大哥伦比亚大学提供,在上海生工生物技术有限公司合成。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 45 s,72 °C 延伸 2 min,40 个循环;最后 72 °C 充分

收稿日期:2016-10-10

基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金(编号:2015002009)。

作者简介:郑舒文(1990—),女,辽宁本溪人,硕士,研究实习员。

E-mail:eliane150@163.com。

通信作者:王 昊,硕士,助理研究员,研究方向为耐盐碱植物筛选与栽培。E-mail:13134101956@163.com。

[13] Wang G S, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (S1): D933 - D937.

[14] Bergman P, Walter - Jallow L, Broliden K A, et al. The antimicrobial peptide LL - 37 inhibits HIV - 1 replication [J]. *Current HIV Research*, 2007, 5 (4): 410 - 415.

[15] Gordon Y J, Huang L C, Romanowski E G, et al. Human cathelicidin (LL - 37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity [J].

Current Eye Research, 2005, 30 (5): 385 - 394.

[16] Howell M D, Jones J F, Kisich K O, et al. Selective killing of vaccinia virus by LL - 37: implications for eczema vaccinatum [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172 (3): 1763 - 1767.

[17] Howell M D, Gallo R L, Boguniewicz M, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus [J]. *Immunity*, 2006 (24): 341 - 348.

[18] Klotman M E, Chang T L. Defensins in innate antiviral immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006 (6): 447 - 456.