

吴嘉韵, 吴 森, 戴超辉, 等. 产肠毒素性大肠杆菌侵染猪肠上皮细胞后 *DLG5* 基因的表达变化分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(9): 127–129.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.035

# 产肠毒素性大肠杆菌侵染猪肠上皮细胞后 *DLG5* 基因的表达变化分析

吴嘉韵<sup>1</sup>, 吴 森<sup>1</sup>, 戴超辉<sup>1</sup>, 吴圣龙<sup>1,2</sup>, 包文斌<sup>2</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009;

2. 江苏省种猪繁育和健康养殖工程技术研究中心, 江苏扬州 225009)

**摘要:** 为了揭示 *DLG5* 基因在机体抵抗大肠杆菌刺激过程中发挥的功能, 本试验利用产肠毒素性大肠杆菌 (F18ab、F18ac 和 K88ac) 侵染猪肠上皮细胞系 (IPEC-J2) 模拟个体的致病过程, 用实时荧光定量检测 *DLG5* 基因在感染前后的表达变化情况, 在细胞水平上探讨 *DLG5* 基因表达水平与产肠毒素性大肠杆菌抗性的关系。结果表明, 3 种大肠杆菌的菌清和菌体刺激 IPEC-J2 后, *DLG5* 基因表达水平均发生显著或极显著上调; 并且由 F18ab 和 K88ac 这 2 种菌体刺激后 *DLG5* 基因表达水平上调的程度要极显著高于 F18ac 菌体刺激后的表达水平。本研究结果提示, 猪 *DLG5* 基因表达和大肠杆菌的抗性具有密切关系, 可能与其在一定程度上能够促进肠道屏障的结构稳定和功能发挥有关。

**关键词:** 猪; *DLG5* 基因; 产肠毒素性大肠杆菌; 抗病育种; 表达水平; 肠上皮细胞

**中图分类号:** S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)09-0127-03

仔猪断奶前后腹泻是规模化猪场最常见的疾病。产肠毒素性大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, 简称 ETEC) 是引起断奶前后腹泻的主要病原菌。仔猪断奶后, 小肠的形态和功能都发生相应的变化<sup>[1]</sup>。此外, 断奶期间消化酶的活性降低, 影响肠黏膜的修复和结构的完整性<sup>[2]</sup>, 导致大量致病性大肠杆菌的入侵而引起疾病, 因此仔猪肠道黏膜结构完整性是抵抗产肠毒素性大肠杆菌等外来病原菌侵袭的基本保障<sup>[3]</sup>, 同时是维持肠道屏障相关基因 (蛋白) 表达对腹泻的抗性具有的重要调控作用<sup>[4]</sup>。

*DLG5* (discs large homologs 5) 基因位于 10 号染色体 q23, 全长约 79 kb, 含 32 个具有编码功能的外显子, 其编码的蛋白是膜结合相关的鸟苷酸激酶 (membrane-associated guanylate kinase, MAGUK) 家族成员之一, 主要参与细胞内的信号传导并起到构建细胞骨架的作用<sup>[5]</sup>。有相关研究证明, *DLG5* 基因还具有稳定顶端蛋白复合体的功能, 与上皮细胞的完整性和极性的保持有关<sup>[6]</sup>。课题组前期筛选出 miR-192 和 miR-215 可能是调控断奶仔猪抗 F18 大肠杆菌感染的重要 miRNAs, 而 *DLG5* 基因就是两者共同靶向调控的关键靶基因, 结合 *DLG5* 基因的生物学功能, 初步表明猪 *DLG5* 基因可能与断奶仔猪肠道上皮的完整性以及大肠杆菌的抗性密切相关<sup>[7-8]</sup>。为进一步揭示 *DLG5* 基因在机体抵抗大肠杆菌刺激过程中发挥的功能, 本试验在细胞水平上利用产肠毒素性大肠

杆菌 (F18ab、F18ac 和 K88ac) 侵染猪肠上皮细胞系 (IPEC-J2), 用实时荧光定量检测 *DLG5* 基因在侵染前后的表达变化情况, 分析 *DLG5* 基因的表达水平与大肠杆菌侵染的关系, 为下一步探讨 *DLG5* 基因的功能提供更加直接的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

猪肠上皮细胞系 (IPEC-J2) 和大肠杆菌 (F18ab、F18ac 和 K88ac) 由扬州大学兽医学院畜禽病原微生物研究室惠赠; DMEM 培养基、F12 培养基、LB 培养基、胎牛血清 (FBS) 均购自 Gibco 公司 (美国); PBS 磷酸缓冲液 (干粉) 购自北京赛因坦科技有限公司 (中国, 北京); Trizol 裂解液购自 Invitrogen 公司 (美国); 反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

### 1.2 IPEC-J2 细胞的培养

将 IPEC-J2 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种到 3 板 12 孔板中, 用含 10% FBS 的完全培养液 (DMEM 与 F12 培养基 1:1 混合) 在恒温培养箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中培养至密度达到约 90%。

### 1.3 大肠杆菌菌液侵染 IPEC-J2 细胞

将大肠杆菌 F18ab、F18ac 和 K88ac 分别接种至 LB 培养液, 在恒温摇床 (37 °C, 200 r/min) 中摇菌 12 h, 离心 (4 000 r/min, 10 min), 分别收集菌清和菌体。向“1.2”步骤中 2 板 12 孔板的每个培养孔 (处理孔和培养孔各设 3 个重复) 各加 200 μL 上清液和 800 μL 培养液, 放于恒温培养箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 分别孵育 4、8 h 后收集细胞用于提取总 RNA。

### 1.4 大肠杆菌菌体侵染 IPEC-J2 细胞

将上一步骤中收集的菌体用 PBS 缓冲液洗涤并离心 (重复 3 次)。用细胞培养液将细菌稀释至  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL, 每个培养孔 (处理孔和培养孔各设 3 个重复) 加入 1.0 mL 细菌

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31372285); 江苏省科技支撑计划 (编号 BE2014357); 江苏省苏州市科技局攻关项目 (编号: SNG201628)。

作者简介: 吴嘉韵 (1993—), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 主要从事猪抗病育种研究。E-mail: 18252711336@163.com。

通信作者: 包文斌, 博士, 研究员, 主要从事猪抗病育种研究。E-mail: wbbao@yzu.edu.cn。

悬液,于恒温培养箱(37 ℃,5% CO<sub>2</sub>)孵育 4 h 后收集细胞用于提取总 RNA。

1.5 引物设计及合成

根据 GenBank 数据库中 *DLG5* 基因序列(登录号:XM\_

005671132.1),利用 Oligo 7.0 软件设计 Real-time PCR 引物,为避免基因组 DNA 污染,引物跨外显子设计;以 *GAPDH* 基因作为内参,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 *DLG5* 基因的 Real-time PCR 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
<i>DLG5</i>	F:ATCCCTCTGTCATCGACCCA;R:GTGCAGGTTCCCACCACATA	185
<i>GAPDH</i>	F:ACATCATCCCTGCTTCTACTGG;R:TCTCCTCTGCTCCAATCCAG	187

1.6 细胞总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 Trizol 法提取各孔板细胞总 RNA,提取步骤严格按照 Trizol Reagent 说明书操作,并以 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整程度,使用 ND-1000 核酸/蛋白浓度测定仪测定浓度及纯度,产物-70 ℃保存备用。

cDNA 合成反应体系(10 μL)为:5 × qRT SuperMix II 2 μL,总 RNA 500 ng,RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL。反应条件为:25 ℃ 10 min,50 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,产物 4 ℃保存备用。

1.7 实时荧光定量

实时荧光定量反应体系:模板 cDNA 2.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,2 × SYBR Premix ExTap™ II 10 μL,50 × ROXReference Dye II 0.4 μL,RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至总体积 20 μL。扩增程序为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共 40 个循环。扩增结束后进行熔解曲线的分析,具体程序为:95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s。每个样本设置 3 个重复。

1.8 数据统计分析

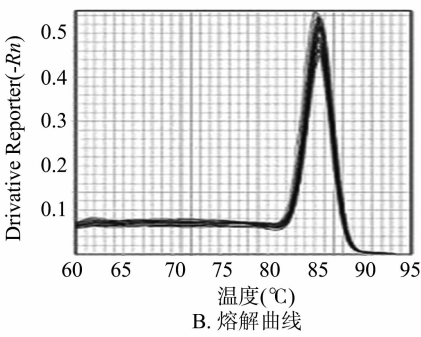
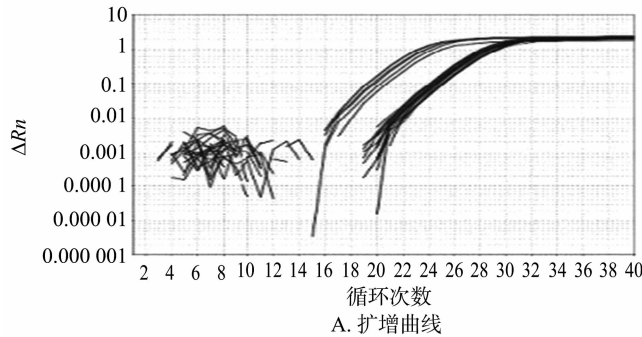


图1 基因 qPCR 产物在不同组织中的扩增曲线(A)和熔解曲线(B)

2.3 大肠杆菌菌清刺激 IPEC-J2 细胞 4 h 和 8 h 后 *DLG5* 基因的表达水平

分别以未经大肠杆菌刺激处理的对照组表达水平为 1,将 3 种大肠杆菌菌清侵染 4 h 和 8 h 后细胞中 *DLG5* 基因 mRNA 的表达水平进行均一化处理。由图 2 可知,F18ab 和 K88ac 菌清刺激猪肠上皮细胞 4 h 后,*DLG5* 基因表达水平均发生显著上调( $P<0.05$ ),F18ac 菌清刺激 4 h 后,*DLG5* 基因表达水平发生极显著上调( $P<0.01$ ),但是 3 种菌清刺激 4 h 后 *DLG5* 基因相对表达水平无显著差异( $P>0.05$ )。3 种大肠杆菌菌清刺激猪肠上皮细胞 8 h 后,*DLG5* 基因表达水平均发生极显著上调( $P<0.01$ ),且 3 种大肠杆菌菌清处理 8 h 后细胞中 *DLG5* 基因相对表达水平都没有显著差异( $P>0.05$ )。结果还显示,3 种大肠杆菌菌清刺激处理 8 h 后 *DLG5* 基因表达水平上调的程度均极显著高于处理 4 h 后的上调程度

相对定量的结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析处理,并利用 SPSS 17.0 软件一般线性模型(general linear model, GLM)的 Univariate 统计方法分析不同菌株刺激的差异显著性,数据用“平均值 ± 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的纯度与完整性检测

提取的细胞总 RNA 经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,呈现清晰的 28S、18S、5S 共 3 条带,无 DNA 污染条带及明显降解, NanoDrop ND-1000 核酸/蛋白浓度测定仪检测 RNA 纯度,样本的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  为 1.8~1.9,说明 RNA 提取的完整性和纯度较高,可用于后续试验。

2.2 荧光定量 PCR 的扩增曲线与熔解曲线

根据荧光值的变化,系统自动生成反应循环数与检测荧光量变化的扩增反应动力学曲线,而扩增产物的特异性由熔解曲线可以判断。由图 1 可知,*DLG5* 基因成功实现扩增,且 qPCR 产物只有 1 个特异峰,无引物二聚体及非特异性产物生成。

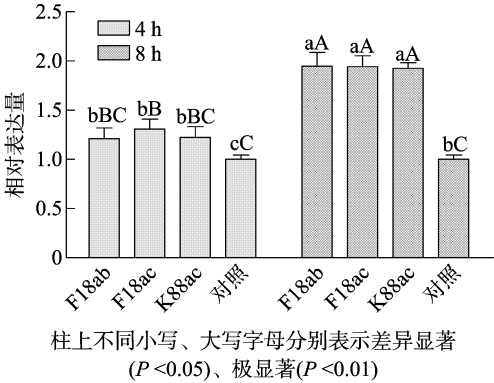
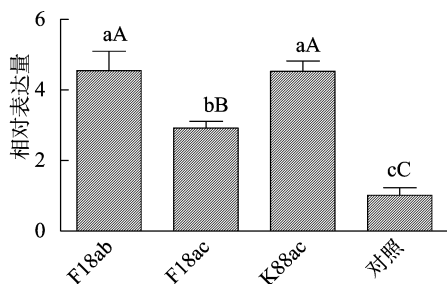


图2 F18ab、F18ac 和 K88a c菌清刺激细胞后 *DLG5* 基因的表达水平

( $P<0.01$ )。

## 2.4 *DLG5* 基因在大肠杆菌菌体刺激 IPEC-J2 后的表达水平

以未经大肠杆菌刺激处理的对照组表达水平为 1, 对 3 种大肠杆菌刺激处理的细胞中 *DLG5* 基因 mRNA 的表达水平进行均一化处理。由图 3 可知, 3 种大肠杆菌刺激 IPEC-J2 后, *DLG5* 基因表达水平均发生极显著上调 ( $P < 0.01$ ), 差异倍数分别为 4.2、4 倍; 并且 F18ab 和 K88ac 这 2 种菌体刺激后 *DLG5* 基因表达水平上调的程度要极显著高于 F18ac 菌体刺激后的表达水平 ( $P < 0.01$ ), 但是 F18ab 和 K88ac 这 2 种菌体刺激后 *DLG5* 基因表达水平无显著差异 ( $P > 0.05$ )。



柱上不同小写、大写字母分别表示差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )

图3 F18ab、F18ac 和 K88ac 菌体刺激细胞后 *DLG5* 基因的表达水平

## 3 讨论

产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC) 是引起断奶前后仔猪腹泻和水肿的主要病原菌, 菌体表面特异菌毛按黏附素 (菌毛) 性质可将 *E. coli* 分为 F18、K88、K99、F41、987P 等, ETEC 通过表面菌毛黏附于仔猪小肠黏膜上皮细胞上的刷状缘受体, 定居并大量繁殖, 同时产生肠毒素, 刺激小肠黏膜细胞, 破坏肠上皮细胞结构, 最后引起仔猪腹泻、脱水甚至死亡<sup>[9,11]</sup>。大量研究报道认为 *DLG5* 基因是人炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的候选易感基因, 而 IBD 的特征之一为肠上皮屏障功能受损<sup>[5,12]</sup>。*DLG5* 蛋白广泛分布于机体心脏、肝脏、肠道上皮等组织<sup>[13]</sup>, 能与其他蛋白互作形成蛋白复合物, 再与多种信号转导蛋白连接, 在维持上皮细胞结构、信号传递和维持细胞骨架等过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。因此, 当机体肠道受到外源感染时, *DLG5* 的较高水平表达可能会在一定程度上缓解肠道组织细胞的增殖和凋亡, 降低病原的侵染速率。结合本次试验结果, 3 种大肠杆菌的菌清或菌体刺激 IPEC-J2 后, 细胞中 *DLG5* 基因的相对表达均显著上调, 且用菌清刺激 IPEC-J2 细胞的时间越久, *DLG5* 基因的相对表达水平越高, 进一步证实了 *DLG5* 在一定程度上能够促进肠道屏障的结构稳定和功能发挥, 并且在大肠杆菌侵袭仔猪肠道中发挥了重要的调控作用。本次试验结果还显示, F18ab 和 K88ac 这 2 种菌体刺激引起 *DLG5* 基因表达上调的程度均极显著高于 F18ac ( $P < 0.01$ ), 这从一定程度上说明了不同种类的大肠杆菌对机体的侵袭能力可能存在差异, F18ab 和 K88ac 这 2 种大肠杆菌对小肠上皮细胞的侵袭能力要强于 F18ac。此外, 大肠杆菌菌体刺激 4 h 后和菌清刺激 8 h 后的引起的 *DLG5* 基因表达都极显著上调 ( $P < 0.01$ ), 菌体引起的差异倍数分别为 4.2、4 倍, 而菌清引起的差异倍数均为 2 倍, 由此可见大肠杆菌菌体对小肠上皮细胞的侵袭能力要强于大肠杆菌菌清。

体外模拟个体的致病过程, 特别是以宿主细胞为素材进行相关研究是验证基因功能的重要手段。为了在细胞水平揭示 *DLG5* 基因在机体抵抗大肠杆菌刺激过程中发挥的功能, 本研究利用 3 种大肠杆菌的菌清和菌体刺激 IPEC-J2 细胞, 通过分析刺激前后细胞中 *DLG5* 基因的表达变化, 初步证实了 *DLG5* 基因在大肠杆菌刺激过程中确实发挥了一定的调控作用; 但考虑到离体培养的猪肠上皮细胞系并不能完全模拟体内肠道组织的生长环境, 所以本研究只能初步说明 *DLG5* 基因的表达和大肠杆菌的抗性具有密切关系, *DLG5* 基因在大肠杆菌刺激过程中的调控作用及其机制还有待进一步研究。下一步还将利用基因敲除和干扰技术, 结合转录组分析和转基因动物模型制备等手段, 在动物模型上进行大肠杆菌体外攻毒试验, 并在群体水平中进行系统分析验证, 以期对猪抗大肠杆菌病分子选育工作提供指导和依据。

## 参考文献:

- [1] Cabrera R A, Usry J L, Arrellano C, et al. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2013, 4 (1): 29.
- [2] Godlewski M M, Bierla J B, Strzalkowski A, et al. A novel cytometric approach to study intestinal mucosa rebuilding in weaned pigs fed with dietary nucleotides[J]. *Livestock Science*, 2009, 123 (2): 215 - 220.
- [3] 谢天宇, 胡红莲, 高 民. 肠黏膜免疫屏障及其保护措施[J]. *动物营养学报*, 2014, 26 (5): 1157 - 1163.
- [4] 张影超, 王希彪, 崔世泉, 等. 肠上皮紧密连接蛋白 mRNA 的表达与仔猪断奶腹泻关系的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41 (9): 221 - 224.
- [5] 冯 赞, 郑 萍. *DLG5* 与克罗恩病相关性的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2008, 28 (4): 277 - 279.
- [6] Friedrichs F, Stoll M. Role of discs large homolog 5 [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12 (23): 3651 - 3656.
- [7] Ye L, Su X M, Wu Z C, et al. Analysis of differential miRNA expression in the duodenum of *Escherichia coli* F18 - sensitive and - resistant weaned piglets[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e43741.
- [8] 吴正常, 殷学梅, 孙 丽, 等. 猪 miR - 192 / - 215 的组织表达谱及其关键靶基因分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48 (11): 2251 - 2261.
- [9] 叶 兰, 潘章源, 黄雪根, 等. 苏太猪抗 F18<sup>+</sup> 大肠杆菌病基础群 *FUT1* 基因多态性及其与生长发育的关联分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37 (4): 158 - 161.
- [10] 张培晏, 刘 峻. 产肠毒素性大肠杆菌菌毛的研究进展[J]. *四川畜牧兽医*, 2016, 43 (1): 32 - 34.
- [11] 陈传荣, 韩敏敏, 张乃嘉, 等. 腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜与耐药性及毒力的相关性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43 (10): 2234 - 2241.
- [12] 黄盛秋, 徐 辉. 克罗恩病易感基因研究进展[J]. *西南军医*, 2013, 15 (2): 188 - 191.
- [13] Shah G, Brugada R, Gonzalez O, et al. The cloning, genomic organization and tissue expression profile of the human *DLG5* gene[J]. *BMC Genomics*, 2002, 3 (1): 6.
- [14] Stoll M, Corneliussen B, Costello C M, et al. Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36 (5): 476 - 480.