

汪 伟,胡屹屹,何孔旺,等.猪圆环病毒 2 型体外刺激猪髂动脉血管内皮细胞的炎症相关细胞因子 mRNA 转录分析[J].江苏农业科学,2017,45(21):32-34.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.008

猪圆环病毒 2 型体外刺激猪髂动脉血管内皮细胞的炎症相关细胞因子 mRNA 转录分析

汪 伟,胡屹屹,何孔旺,温立斌,倪艳秀,王小敏,刘传敏

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:通过 PCV2 病毒感染猪髂动脉血管内皮细胞(PIEC)后炎症相关细胞因子 mRNA 转录水平变化,探讨 PCV2 感染诱导炎症产生的免疫机制。将 PCV2 病毒体外接种 PIEC,感染不同时间后,收集样品,荧光定量 PCR 方法检测细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-8* 及 *IL-18* mRNA 转录水平的变化。结果显示,PCV2 感染 PIEC 后,对促炎症细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-18* 及趋化因子 *IL-8* 主要起上调表达作用。由此推测细胞因子在体内的综合效应会导致 PCV2 感染早期机体产生过度炎症反应,并趋化中性粒细胞,引发机体免疫抑制,影响机体特异性免疫应答的正常运转,为 PCVD 的发病创造条件。

关键词:猪圆环病毒 2 型;猪髂动脉血管内皮细胞;炎症相关细胞因子;荧光定量 PCR;mRNA 转录分析;免疫机制;促炎症细胞因子

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0032-03

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)属于圆环病毒科圆环病毒属成员,为无囊膜、单链负股 DNA 病毒,于 1982 年由 Tischer 等首次发现^[1],是目前发现最小的病毒之一,病毒颗粒直径为 12~23 nm^[2],其中猪圆环病毒 2 型(PCV2)对猪群具有致病性。目前,PCV2 已成为影响全球养猪业最重要的疾病之一,是猪圆环病(PCVD)的主要病原^[3]。PCV2 单独感染猪群很少引起临床发病^[4],而使猪群处于亚临床感染状态^[5];临床上常与猪呼吸与繁殖综合征病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)及猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)混合感染^[6-7]。

在 PCVD 中 PCV2 影响机体的免疫系统功能的发挥,从而产生免疫抑制^[8],给全世界养猪业造成了重大的经济损失^[9]。在 PMWS 猪中存在肉芽肿性炎症和多核巨细胞,表明细胞因子分泌及其他免疫相关信号分子在该过程中发挥着重要作用。目前,在基因、蛋白水平上,通过在体内/体外研究发现 PCV2 感染后对各种细胞因子产生影响,特别是炎症相关细胞因子如 *IL-1 β* 、*IL-8*、*IL-18*、*TNF- α* 等,以及免疫调节因子 *IL-10*、*IFN- γ* 等;PCV2 与其他病原共感染后对组织/细胞的细胞因子也产生影响。通过 PCV2 对细胞因子产生影响的研究,来阐明 PCV2 感染对机体免疫系统的影响及

引起免疫抑制的相关机理。

PCV2 感染猪体后,可引起病毒血症^[10];PCV2 在血液内通过血液循环与血管内皮细胞相互作用,并引起血管内皮细胞分泌细胞因子,极少量的细胞因子即可在体内发挥重要的免疫作用。因此,研究 PCV2 与血管内皮细胞相互作用引起的细胞因子变化具有重要的意义。本研究旨在探讨 PCV2 病毒感染猪髂动脉血管内皮细胞(pig iliac endothelial cells, PIEC)后对部分炎症相关细胞因子转录水平的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1640 细胞培养液(Invitrogen 公司),猪髂动脉血管内皮细胞(PIEC)(中国科学院生化细胞所细胞库),2×SYBR Premix Ex Taq(大连 TaKaRa 公司),细胞 RNA 提取试剂盒(北京天恩泽科技公司),DNase I(大连 TaKaRa 公司),5×qRT SuperMix 反转录试剂盒(Biouniquer Technology 公司)、ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 病毒

PCV2 病毒为笔者所在实验室自行分离并鉴定,并在 PK-15 细胞体外传代 58 代后收获的细胞毒,间接免疫荧光法(IFA)测定其 TCID₅₀ 为 10^{-6.25} mL。

1.3 PIEC 的培养

PIEC 培养于含 10% 血清的 1640 细胞培养液中,长至单层细胞。将已长满单层的细胞用细胞培养液制成细胞悬液(细胞密度为 5.0×10⁵ mL)接种至 6 孔细胞培养板,每孔 2 mL。置 37℃、5% CO₂ 下培养 24 h。

1.4 病毒感染细胞

将 6 孔板上的细胞用 1640 培养液(无血清)清洗 2 次后,每孔接种病毒液 200.0 μ L,补加 1640 维持液(5% 血清)

收稿日期:2016-11-16

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303046);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2045];江苏省农业科学院基本科研业务专项-重大成果培育类[编号:ZX(15)1003]。

作者简介:汪 伟(1988—),男,安徽庐江人,硕士,助理研究员,主要从事兽用生物制品研究。Tel:(025)84391226;E-mail:weiwang054@126.com。

通信作者:何孔旺,研究员。E-mail:kwh2003@263.net。

1.8 mL,共 3 个重复。另 3 孔只加 2.0 mL 1640 维持液(5% 血清),作为细胞因子自然转录对照组。置 37 ℃、5% CO₂ 下分别作用 24、48、72、96 h。

1.5 细胞总 RNA 的提取与反转录

在各时间点分别取出细胞板,按细胞 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,得到的 RNA 按照 DNase I 说明书进行基因组去除,按反转录试剂盒说明书进行反转录。20.0 μL 反转录体系:5 × qRT SuperMix 4.0 μL,总 RNA 8.0 μL,RNase free ddH₂O 8.0 μL。反转录程序:25.0 ℃ 10 min,42.0 ℃ 30 min,85.0 ℃ 灭活 5 min。获得 cDNA,置 -20 ℃ 冰箱备用。

表 1 各细胞因子和管家基因 β -actin 荧光定量 PCR 扩增的引物及条件

基因名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	退火时间 (s)	产物大小 (bp)
<i>IL-1β</i>	F:AGGGACATGGAGAAGCGATTT;R:TCTGCTTGAGAGGTGCTGATG	60.0	34	108
<i>IL-18</i>	F:GCAGTAACCATCTCTGTGCAGTGTA;R:TCATCAATATTATCAGGAGGACTCATTT	60.0	60	101
<i>IL-8</i>	F:TTCCTGCTTTCTGCAGCTCTCT;R:GGGTGGAAGGCTGTGGAATG	60.0	60	102
β -actin	F:CCATCGTCCACCGCAAAAT;R:CCAAATAAAGCATGCCAATC	60.0	34	112

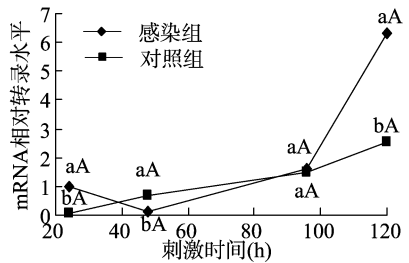
1.7 统计分析

病毒组与对照组 mRNA 相对转录水平通过倍数改变量(fold change,FC)比较,FC ≥ 2.0 或 FC ≤ 0.5 时,表明倍数改变有意义。对倍数改变有意义的数据在 SPSS 22 软件下采用独立样本 *t*-检验进行统计分析,以 *P* < 0.05 表示差异显著,*P* < 0.01 表示差异极其显著。

2 结果与分析

2.1 PCV2 对 PIEC 的 *IL-1 β* mRNA 转录水平的影响

IL-1 β 是一种重要的促炎症细胞因子,能诱导与 TNF- α 相似的生理和代谢改变,并能与 TNF- α 产生相互协同作用,介导病毒感染后机体的炎症反应与免疫调节中起重要作用。PCV2 感染细胞后,除 48 h 时 *IL-1 β* 出现下降(FC < 0.5, *P* < 0.05)外,24 h(FC > 2, *P* < 0.05)、96 h(FC > 2, *P* < 0.01)时 *IL-1 β* 转录水平均显著升高。说明 PCV2 感染 PIEC 后,总体上会促进细胞 *IL-1 β* 的转录,从而进一步影



不同小写、大写字母表示在 0.05、0.01 水平差异显著。下图同

图 1 PCV2 对 *IL-1 β* mRNA 相对转录水平的影响

响机体的炎症反应(图 1)。

1.6 荧光定量 PCR 法检测样品各细胞因子的 cDNA 拷贝数

用已经建立好的检测各细胞因子(*IL-1 β* 、*IL-18*、*IL-8*)的荧光定量 PCR 方法^[11]检测各细胞因子的 cDNA 拷贝数。Real-time PCR 经优化,25.0 μL 反应体系:2 × SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,ROX Reference Dye II (50 ×) 0.5 μL,cDNA 模板 1.0 μL,ddH₂O 10.0 μL。最佳反应程序:95.0 ℃ 30 s;95.0 ℃ 5 s,60.0 ℃ 34 ~ 60 s(表 1),40 个循环。每一循环结束时读取荧光信号,总循环结束后,加入熔解曲线分析步骤。将各细胞因子基因的拷贝数除以同 1 样本中 β -actin 基因的拷贝数,获得 1 个相对比值,即为细胞因子 mRNA 相对转录水平。

2.2 PCV2 对 PIEC 的 *IL-8* mRNA 转录水平的影响

IL-8 是一种白细胞趋化性细胞因子,可以促进炎症细胞趋化和诱导细胞增殖,也是一种重要的促炎症细胞因子。在 PCV2 感染细胞 24 h(FC > 2, *P* < 0.01)、96 h(FC > 2, *P* < 0.05)时,*IL-8* 转录水平均显著升高。而在 48、72 h 变化不显著。说明 PCV2 感染 PIEC 后,总体上会促进细胞 *IL-8* 的转录,进而影响病毒复制及机体炎症反应(图 2)。

2.3 PCV2 对 PIEC 的 *IL-18* mRNA 转录水平的影响

IL-18 是一种重要的免疫调节因子,诱导 IFN- γ 产生,增强 *IL-12* 的作用,具有抗微生物感染的作用。在 PCV2 感染细胞 24 h(FC > 2, *P* < 0.01)、72 h(FC > 2, *P* < 0.05)、96 h(FC > 2, *P* < 0.05)时,*IL-18* 转录水平均显著升高。*IL-18* 与 *IL-1 β* 具有类似的生物学功能,均能够促进机体炎症反应,并具有一定的协同作用(图 3)。

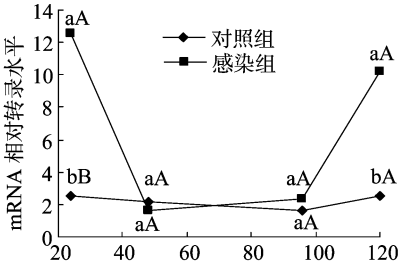


图 2 PCV2 对 *IL-8* mRNA 相对转录水平的影响

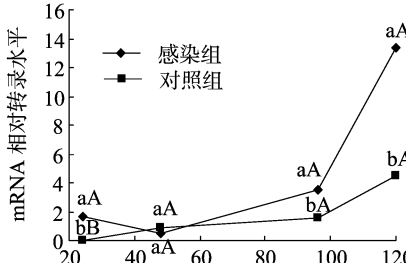


图 3 PCV2 对 *IL-18* mRNA 相对转录水平的影响

3 讨论与结论

PCVD 是由猪圆环病毒 2 型造成的一种消耗性疾病,给世界养猪业造成了严重的经济损失^[12]。PCV2 病毒感染猪体,产生病毒血症,引起免疫抑制,对猪体的免疫机能产生严

重的不良影响。细胞因子在调节免疫系统的免疫应答中起重要作用^[13]。本试验研究 PCV2 病毒在不同时间内对 PIEC 细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-8* 和 *IL-18* 的 mRNA 转录水平的影响;发现 PCV2 感染 PIEC 后,*IL-1 β* 、*IL-8* 和 *IL-18* 主要表现为上调作用。*IL-1 β* 、*IL-18* 均是机体中重要的促炎症细胞因子,

在介导机体炎症反应和抗微生物感染中起重要作用。炎症反应在一定程度上是机体对病原微生物感染后的免疫反应,是机体的一种自我保护机制;但过度的炎症反应会引起机体的免疫紊乱与免疫抑制^[14]。IL-8 是机体内重要的趋化因子,吸引、募集白细胞(主要是中性粒细胞),是机体产生炎症反应重要的因素之一。

由于 PCV2 对感染猪的免疫系统产生抑制作用,许多研究者选择细胞因子途径研究其致病机理。Li 等用 DNA 芯片技术分析 PCV2 感染的猪肺泡巨噬细胞(PAM)多种免疫相关因子的转录变化,发现感染后 24、48 h,IL-1 β 、IL-8 和 IL-18 上调表达^[15]。Chae 等研究 PCV2 引起猪呼吸道疾病时的猪肺脏促炎症细胞因子表达情况,发现 IL-1 α 和 IL-8 mRNA 转录显著升高^[16]。Borghetti 等研究感染 PCV2 的猪外周血单个核细胞(PBMC)时发现,IL-1 β (20 周龄)和 IL-8(20、22 周龄)PCV2 感染组显著低于阴性对照组^[17]。Sipos 等研究发现,自然感染的 PMWS 猪与阴性对照组比较,IL-1 β 上调表达^[18]。Zhang 等研究 PCV2 与猪肺炎支原体共感染时发现,当 PCV2 单独感染时,感染组支气管淋巴结的细胞因子 IL-1 β 、IL-8 高于阴性对照组^[19]。王永帅等研究发现,PCV2 单独感染猪肺泡巨噬细胞后能促进 IFN- γ 的表达,并在感染早期促进 TNF- α 的表达^[20]。

本试验研究 PCV2 在不同时间内对 PIEC 部分炎症相关细胞因子 mRNA 转录水平的影响,发现 PCV2 感染 PIEC 后,对促炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18 及趋化因子 IL-8 主要起上调表达作用。推测细胞因子在体内的综合效应导致 PCV2 感染早期机体产生过度炎症反应,并趋化中性粒细胞,引发机体免疫抑制,影响机体特异性免疫应答的正常运转,为 PCVD 的发病创造条件。

参考文献:

- [1]Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J]. Nature, 1982, 295(5844): 64-66.
- [2]Cheung A K. Porcine circovirus: transcription and DNA replication[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 46-53.
- [3]Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. Veterinary Journal, 2005, 169(3): 326-336.
- [4]Opriessnig T, Halbur P G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 20-32.
- [5]Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 10-19.
- [6]Opriessnig T, O'Neill K, Gerber P F, et al. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection[J]. Vaccine, 2013, 31(3): 487-494.
- [7]Seo H W, Park S J, Park C, et al. Interaction of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines on dually infected pigs[J]. Vaccine, 2014, 32(21): 2480-2486.
- [8]Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology[J]. Veterinary Journal, 2004, 168(1): 41-49.
- [9]王一平, 郭龙军, 唐青海, 等. 猪圆环病毒 2 型疫苗的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(9): 1337-1345.
- [10]Patterson R, Nevel A, Diaz A V, et al. Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV2b[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 261-269.
- [11]汪伟, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 猪链球菌 2 型体外刺激 3D4/21 猪肺泡巨噬细胞的炎症相关细胞因子 mRNA 转录分析[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(3): 559-564.
- [12]曹东阳, 王小敏, 钱爱东, 等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型(PCV2)分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390-398.
- [13]Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression[J]. Methods, 2001, 25(4): 386-401.
- [14]张为丹, 赵敬, 翟瑄. 脑创伤后炎症反应与免疫抑制[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 4(1): 1-4.
- [15]Li W, Liu S, Wang Y, et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 353.
- [16]Chae J S, Choi K S. Proinflammatory cytokine expression in the lung of pigs with porcine circovirus type 2-associated respiratory disease[J]. Research in Veterinary Science, 2011, 90(2): 321-323.
- [17]Borghetti P, Morganti M, Saleri R, et al. Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 163(1/2): 42-53.
- [18]Sipos W, Duvigneau J C, Willheim M, et al. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 99(1/2): 63-71.
- [19]Zhang H, Lunney J K, Baker R B, et al. Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfecting with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 140(1/2): 152-158.
- [20]王永帅, 唐波, 张雪花, 等. PCV2 与 PPV 体外混合感染猪肺泡巨噬细胞对细胞因子的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 772-778.