

寒冷应激对阿勒泰羊细胞免疫及热休克蛋白 70 mRNA 表达的影响

杨莉 黄钰 王凤丽 刘静 齐亚银* 张莉*

石河子大学动物科技学院 石河子 832003

摘要: 为研究不同的寒冷应激温度对阿勒泰羊 (*Ovis aries*) 细胞免疫及热休克蛋白70的影响。实验采集阿勒泰羊寒冷应激前后肝、肺、脾、淋巴结组织及血清, 采用实时荧光定量PCR中最大二阶导数法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 对各组织中 *hsp70* 的表达量进行统计学分析, 同时采用ELISA方法测定血清中白细胞介素-4 (IL-4) 及白细胞介素-2 (IL-2) 寒冷应激前后浓度变化。结果显示, 在寒冷条件下阿勒泰羊各种组织中热休克蛋白 *hsp70* 的表达都有所增加, 尤其是脾组织的表达增加幅度较大。ELISA方法测定阿勒泰羊在寒冷刺激后IL-4浓度发生显著下降 ($P = 0.016$), 而IL-2在冷应激后变化不显著 ($P = 0.502$), 出现轻微的下调。研究表明, 寒冷应激条件下, 较高水平的 *hsp70* 能够保护机体免受应激的损伤。而在冷应激过程中, 机体的免疫系统受到抑制。

关键词: 寒冷应激; 热休克蛋白; 白细胞介素-2; 白细胞介素-4; 阿勒泰羊

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-300-06

Effects of Cold Stress on Immune System and *hsp70* mRNA Expression in Altay Sheep

YANG Li HUANG Yu WANG Feng-Li LIU Jing QI Ya-Yin ZHANG Li*

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: The effects of cold stress at different temperatures on the cellular immunity and heat shock protein 70 expression were studied in Altay sheep (*Ovis aries*). Collected before and after the test cold stress Altay sheep liver, lung, spleen, lymph node tissue and serum, and expression of *hsp70* in each tissue was examined using real-time quantitative PCR, and the change of interleukin -4 (IL-4) and interleukin -2 (IL-2) concentration in the serum was tested using ELISA method. The results showed that the expression of *hsp70* expression increased in various tissues after cold stress, with the highest increase in spleen tissue. The concentration of IL-4 decreased significantly after cold stimulation ($P = 0.016$), while IL-2 did not change

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31260610), 新疆生产建设兵团重点项目 (No. 2013AA003-3), 石河子大学优秀青年基金项目 (No. 2012ZRKXYQ02);

* 通讯作者, E-mail: 75997921@qq.com, zhangli@shzu.edu.cn;

第一作者介绍 杨莉, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理学; E-mail: 563289492@qq.com.

收稿日期: 2014-02-10, 修回日期: 2014-09-28 DOI: 10.13859/j.cjz.201502019

significantly after cold stress ($P = 0.502$), but a slight reduction. Studies have shown that, under conditions of cold stress, a high level of *hsp70* expression protects the body from injury, and that the body's immune system is suppressed.

Key words: Cold stress; Heat shock protein 70 (HSP70); Interleukin 2 (IL-2); Interleukin 4 (IL-4); Altay sheep

新疆阿勒泰地区位于中国西北边陲, 北部为阿勒泰山脉, 南至准葛尔盆地, 中段为前山丘地带和河谷。这里冬季寒冷, 最冷季节气温达 $-35 \sim -40^{\circ}\text{C}$, 一年有近一半时间是冬季, 由于自然条件恶劣, 过去长期以来牲畜处于“夏肥、秋壮、冬瘦、春死”的恶性循环中, 许多优良品种在这里无法生存, 而阿勒泰羊 (*Ovis aries*) 就是在这样一个特殊的条件下通过长期的自然和人工选择而形成的。阿勒泰羊, 俗称阿勒泰大尾羊, 属肉、脂兼用型粗毛绵羊品种, 是哈萨克羊的一个优良类群, 长期以来经过自然选育而形成的地方优良抗寒品种, 以体格大、肉脂生产性能高而著称。

热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 几乎在所有生物的应激细胞中都经常高度地被诱导表达或被抑制, 是评价组织细胞处于危险状态的分子生物标志 (Shyu et al. 2000)。HSP70 赋予细胞或生物体从应激状态中恢复的能力, 并保护它们免受应激的损害, 是对环境和代谢应激综合反应的代表 (Saavedra et al. 1996, 1997, Vainberg et al. 2000)。国内对冷应激在家养或实验动物中的研究, 主要集中在冷应激对仔鸡 (*Gallus gallus domesticus*) 生长性能、免疫及抗氧化功能的影响, 还有对下丘脑-垂体-甲状腺和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的影响 (袁学军等 2002, 李丽娟等 2009); 在仔猪 (*Sus domestica*) 主要涉及免疫系统及细胞因子的相关研究 (计红等 2007, 2010); 研究最多的是冷应激对小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 的影响 (李瑞纲 2005); 而在牛 (*Bos taurus*) 只研究了慢性冷应激对西门塔尔杂交犊牛免疫相关指标的影响 (杨焕民等 2002)。本项目拟在揭示寒冷应激对新疆阿勒泰羊细胞免

疫及热休克蛋白 mRNA 表达的影响, 为新疆绵羊抗寒育种工作提供理论依据, 减少寒冷应激对养羊业带来的损失。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

在新疆福海县选择寒冷应激前 (10 月份) 和寒冷应激后 (1 月份) 健康成年的阿勒泰羊各 10 只, 分别采集阿勒泰羊血液样本各 10 份, 放入装有柠檬酸钠的试管中用以检测细胞因子白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 和白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4) 的变化。同时解剖后采集肝、肺、脾、淋巴结组织样本, 立即放入 -80°C 液氮中保存。

Trizol 试剂购自天根生化科技有限公司; PrimeScriptTM RT reagent kit 反转试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒 (批号: 1101G06)、PMD@18-T Vector 载体 (批号: CK5201AA) 购自宝生物工程有限公司; 质粒提取试剂盒 (批号: 1011G23) 购自上海捷瑞生物工程有限公司; SYBR Premix Ex TaqTM kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA Marker、dNTP、Amp、X-gal、IPTG、Taq 酶均购自天根生化科技有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉、琼脂糖、氯仿、异丙醇、酒精购自北京华美生物工程公司。白细胞介素 2 和白细胞介素 4 的 ELISA 检测试剂盒均购自华大生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 测定热休克蛋白 *hsp70* mRNA 的表达情况 利用 Trizol 一步法提取所有实验样品的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, -70°C 保存备用。取 RNA

1 μg , 依次加入 10 \times Reaction Buffer 2 μl , 25 mmol/L MgCl_2 1 μl , 1 U/ μl DNase I (RNase-free) 1 μl , 1% DEPC 处理水补足 10 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 除去存在的少量基因组 DNA。然后加入 1 μl 50 mol/L EDTA, 65 $^\circ\text{C}$ 孵化 10 min, 即可用此 RNA 作为反转录的模板。

参照 GenBank 中公布的绵羊 *hsp70* 基因全长序列 (登录号为 JN604434.1), 用 Primer 5.0 软件设计阿勒泰羊 *hsp70* 基因引物, 引物由北京六合华大基因有限公司合成。*hsp70* 上游引物 5'-CCC ACG AAG CAG ACG CAG AT -3', 下游引物 5'- GCA GGT TGT TGT CCC GAG TCA T -3', 扩增基因片段预计大小为 200 bp。

利用 PrimeScriptTM RT reagent kit 反转录试剂盒将提取的各组织 RNA 反转录, 产物可直接用于 PCR 扩增, 或于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存, 长期保存则放于 -70 $^\circ\text{C}$ 。

以上述反转录产物为模板, 利用常规 PCR 反应对组织样品中 *hsp70*、 β -*actin* 基因进行扩增, 将目标片段分别从琼脂糖凝胶中切下, 按照 DNA 回收试剂盒说明回收目标片段, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 经 16 $^\circ\text{C}$ 过夜连接 pGM-T 载体, 用 CaCl_2 法将连接产物转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 感受态细胞, 经蓝白斑筛选阳性菌落后, 挑取单菌落进行培养, 然后从菌液中提取质粒, 菌液送往上海华大基因公司测序。

分别提取重组质粒 pGM-T- β -*actin* 和 pGM-T-*hsp70*, 将线性化纯化后质粒用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的值, 将质粒浓度折算为拷贝数。拷贝数 (个/ml) = [质粒浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) \times 阿氏常熟] / 质粒分子量, 其中, 阿氏常数为 6.02×10^{23} , 质粒分子量 = 1 个碱基的平均分子量 (649) \times 重组质粒长度 (bp)。将重组质粒稀释为 1×10^{10} 拷贝数后, 再依次稀释为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 拷贝数, 以不同拷贝数浓度的质粒为模板, 进行 Quantitative Real-Time PCR, 软件自动生成这两个基因的标准曲线, 应用 MX3000P 荧光定量

PCR 仪进行表达分析。数值分析采用最大二阶导数法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 进行统计学分析 (Livak 2001)。

所有数据均采用 SAS9.0 进行方差分析, Duncan 法进行均值的多重比较。

1.2.2 使用 ELISA (酶免疫) 法测定血清中 IL-2 和 IL-4 的浓度 阿勒泰羊应激前后血清中白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4) 浓度的测定均参照相应 ELISA 检测试剂盒的操作步骤进行, 最后根据标准品的浓度及对应的吸光度 A 值计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样品的吸光度 A 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

提取的总 RNA 无降解, 经紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 吸光值之比均在 1.8 ~ 2.0 间, 表明提取的总 RNA 质量完好, 可用于后续的实验。

2.2 定性 PCR 反应

利用常规 PCR 对阿勒泰羊 4 种组织样品 *hsp70* 和 β -*actin* 基因进行扩增, 电泳结果均见单一目的条带, 分别为 200 bp 和 180 bp, 与预期目的片段大小一致 (图 1)。分别将内参基因和目的基因 cDNA 片段重组构建克隆载体 pGM-T- β -*actin* 和 pGM-T-*hsp70*, 将重组质粒进行测序, 测序结果分别同 NCBI 中相应 mRNA 序列进行比对, 这两组基因序列的同源性都为 100%。

2.3 实时定量 PCR 标准曲线的制作

hsp70 荧光定量标准曲线的相关系数是 1.00, *hsp70* 基因的扩增效率为 0.85, 测得 β -*actin* 基因值也基本在同一直线上, 其相关系数为 1.00, 扩增效率为 1.14, 说明结果可靠性很好。同时 *hsp70*、 β -*actin* 的溶解曲线均符合基因溶解标准, 曲线 PCR 产物都只有 1 个特异峰, 无引物二聚体及非特异性产物, 满足实验所需。

2.4 *hsp70* 基因在不同组织中的表达

1 月份 (气温 -15 ~ -30 $^\circ\text{C}$), 与 10 月份 (气

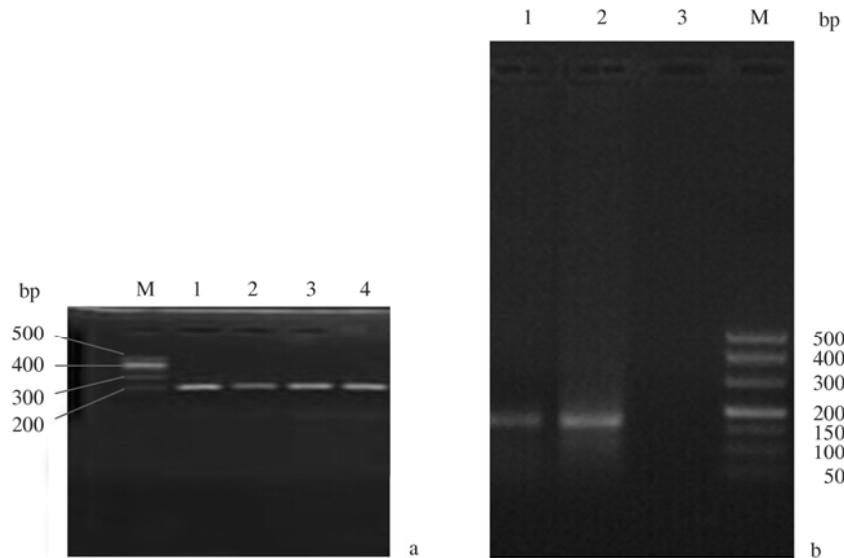


图 1 *hsp70* 基因和 β -actin 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification results of *hsp70* and β -actin gene

a. *hsp70* 基因: M. DNA 分子量标准; 1. 肝; 2. 肺; 3. 脾; 4. 淋巴结。b. β -actin 基因: M. DNA 分子量标准; 1. 肝; 2. 肺; 3. 阴性对照。

a. *hsp70* gene: M. DNA marker; 1. Liver; 2. Lung; 3. Spleen; 4. Lymph node. b. β -actin gene: M. DNA Marker; 1. Liver; 2. Lung; 3. Negative control.

温 $10\sim 25^{\circ}\text{C}$)相比较,阿勒泰羊肝、肺、脾及淋巴结中热休克蛋白*hsp70*的表达都有所增加(图2),而且差异显著,尤其是应激后阿勒泰羊脾中热休克蛋白*hsp70*基因mRNA极显著增加。

2.5 寒冷应激前后IL-2和IL-4浓度比较

比较不同月份测定结果(图3),阿勒泰羊经过寒冷刺激后IL-4浓度显著下降($P = 0.016$),而IL-2在冷应激后变化不显著($P = 0.502$),出现轻微下调。

3 讨论

杨焕民(2002)用免疫印迹法测定肉牛在冷应激和非冷应激条件下均可以表达热休克蛋白,冷应激可以诱导*hsp70*的表达增加。仔猪冷应激同样导致肝、脾、肌肉和淋巴细胞的*hsp70*高效表达,认为*hsp70*可作为评价冷应激的分子标志物(计红等2007)。雏鹅(*Anser domestica*)急性冷应激时,下丘脑*hsp70* mRNA

转录水平最高,表达量总体呈现明显上升趋势,是冷应激反应时的正调控基因,而在垂体和甲状腺中的表达总体是被抑制的(屠云洁等2010)。我们用实时荧光定量PCR检测阿勒泰羊4种组织中的表达,发现寒冷应激后,*hsp70* mRNA的转录水平与冷应激前相比,表达明显升高,尤其是脾中的增加幅度更大。这说明在温度下降时*hsp70*表达上升,推测其在应激时可以保护机体的组织细胞,提高生存能力。

冷应激对动物机体免疫系统作用的影响是复杂的。急性冷应激、重度冷应激常呈现免疫抑制作用,而慢性和温和冷应激常呈现免疫增强作用。一般来说,冷应激对免疫系统功能的影响主要是抑制性的(Salak-Johnson et al. 2007)。通过实时定量RT-PCR发现,冷应激可使鸡促炎症细胞因子IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-12 β 以及细胞因子Th2的mRNA表达增加,从而表明冷应激可以刺激机体的细胞免疫(Hangalapura et al. 2006)。袁学军等(2002)

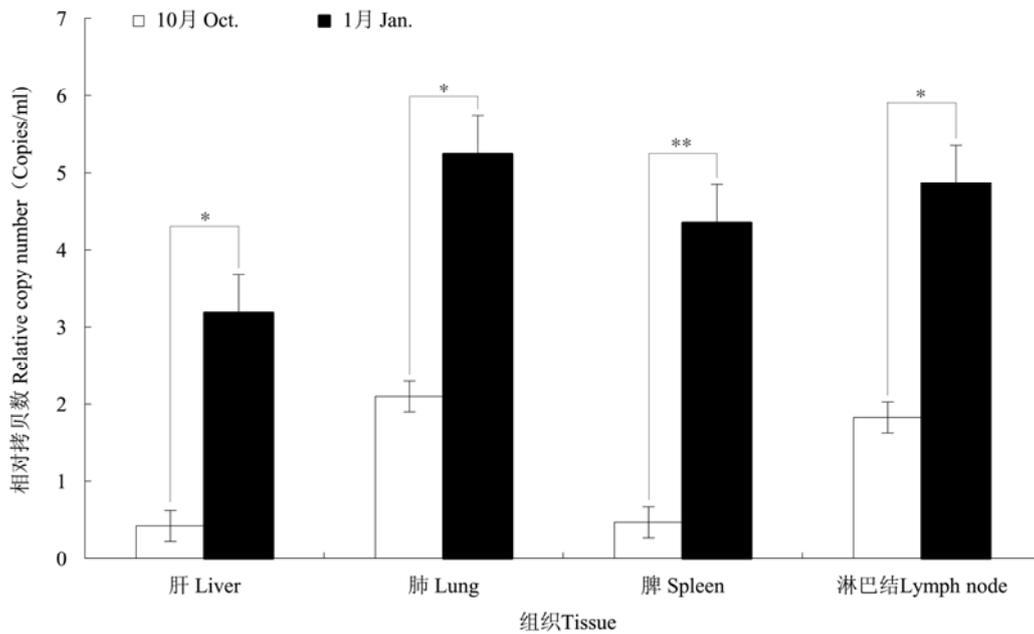


图2 阿勒泰羊组织hsp70基因mRNA表达情况

Fig. 2 The mRNA expression level of hsp70 in different tissues of Altay sheep

“*”为差异显著，“**”为差异极显著。“*” shows is significant difference, “**” shows extremely significant difference.

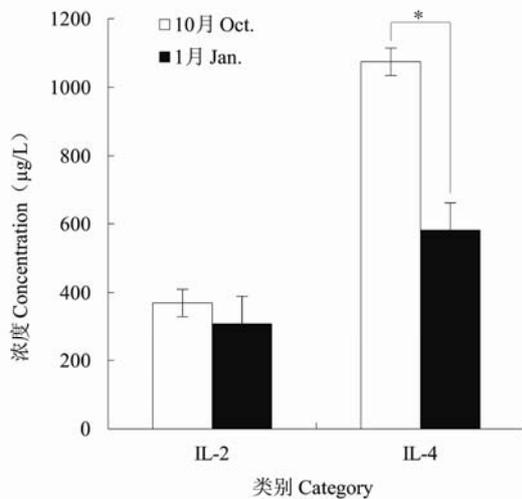


图3 阿勒泰羊IL-2和IL-4浓度测定结果

Fig. 3 The concentration determination of IL-2 and IL-4 in Altay sheep

“*”为差异显著。“*” shows significant difference.

研究冷应激对伊褐红公雏鸡外周血淋巴细胞数目变化的影响，结果发现，急性冷应激期间，雏鸡外周血 T 淋巴细胞数目明显减少。计红等

(2010) 研究冷应激对仔猪血浆相关细胞因子和 IgG 水平的影响，发现冷暴露组血浆 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 和 IFN- γ 都呈先升高然后逐渐波动性下降的趋势，但冷暴露并糖皮质激素受体阻断组升高的速度更快。我们的研究结果表明，经过冷应激后，阿勒泰羊血清中 IL-2 和 IL-4 含量都呈下降趋势，而 IL-4 浓度下降非常明显。IL-2 主要由活化的 T 细胞产生，是调节机体免疫功能最主要的细胞因子之一，其水平反映了 T 细胞的功能状态。可见，寒冷应激后明显抑制了 T 淋巴细胞的功能。

参 考 文 献

Hangalapura B N, Kaiser M G, van der Poel J J, et al. 2006. Cold stress equally enhances *in vivo* pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(5): 503-511.

Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

- Method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Saavedra C A, Hammell C M, Heath C V, et al. 1997. Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes and Development*, 11(21): 2845–2856.
- Saavedra C, Tung K S, Amberg D C, et al. 1996. Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*, 10(13): 1608–1620.
- Salak-Johnson J L, McGlone J J. 2007. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science*, 85(Suppl 13): E81–E88.
- Shyu W C, Kao M C, Chou W Y, et al. 2000. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 Cells. *Neuroreport*, 11(4): 771–774.
- Vainberg I E, Dower K, Rosbash M. 2000. Nuclear export of heat shock and non-heat-shock mRNA occurs via similar pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11): 3996–4005.
- 计红, 吴永魁, 胡仲明, 等. 2007. 不同强度冷应激下仔猪淋巴细胞 HSP70 mRNA 的转录规律. *应用与环境生物学报*, 13(4): 507–509.
- 计红, 杨焕民, 李士泽, 等. 2010. 冷应激对仔猪血浆相关细胞因子和 IgG 水平的影响. *应用与环境生物学报*, 13(5): 632–636.
- 李丽娟, 王安, 芦燕. 2009. 冷应激对肉仔鸡生长性能、免疫及抗氧化功能的影响. *中国饲料*, (17): 42–43.
- 李瑞纲. 2005. 冷应激对小鼠免疫系统的影响. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文.
- 屠云洁, 陈国宏, 耿照玉, 等. 2010. 雏鹅冷应激反应中 HPT 轴 HSP70 mRNA 的动态表达规律. *中国农业科学*, 43(7): 1473–1479.
- 杨焕民. 2002. 应激肉牛几种组织中HSPs表达的研究. 长春: 中国人民解放军军需大学博士学位论文.
- 袁学军, 牛静华, 吴海燕, 等. 2002. 冷应激对伊褐红公雏鸡外周血淋巴细胞数目变化的影响. *黑龙江八一农垦大学学报*, 14(1): 61–63.