

不同毒力结核分支杆菌感染 RAW264.7 巨噬细胞 不同时间细胞因子转录水平标准曲线的建立及应用

张妍¹, 宋纪伟², 曾范利³, 时坤³, 李健明³, 刘杨¹, 刘菲¹, 孙凡婷¹, 杜锐^{3,4*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林市人民医院, 吉林吉林 132001; 3. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 4. 教育部动物生产及产品质量安全重点实验室, 吉林省药用动物二级实验室, 长春 130118)

[收稿日期] 2014-09-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0005-06 [中图分类号] S852.61+8

[摘要] 为检测不同毒力结核分支杆菌感染巨噬细胞后细胞因子转录水平的变化, 构建 IL-6、IL-10、TNF- α 重组标准质粒, 建立了实时荧光定量 PCR 标准曲线。应用该方法对不同毒力结核分支杆菌感染 RAW264.7 巨噬细胞 6 个时间点细胞因子的转录水平进行分析, 结果显示 H37Rv 组、BCG 组相比于对照组刺激后均使三种细胞因子的转录水平发生变化, 其中 IL-6 和 TNF- α 发生明显变化。本试验通过对不同时间点细胞因子转录水平的分析为结核分支杆菌对巨噬细胞凋亡机制的研究提供新思路。

[关键词] 结核分支杆菌; RAW264.7 细胞; 荧光定量 PCR; 细胞因子

Establishment and Application a Standard Curve of Quantitative Real-time PCR for Cytokine Transcript Levels after Infected by Different Virulence *Mycobacterium tuberculosis* at Different Time Point

ZHANG Yan¹, SONG Ji-wei², ZENG Fan-li³, SHI Kun³, LI Jian-ming³, LIU Yang¹,

LIU Fei¹, SUN Fan-ting¹, DU Rui^{3,4*}

(1. College of Animal Science & Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin people's hospital, Jilin, Jilin 132001, China; 3. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 4. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of the people's Republic of China, Level 2 Laboratory of Medical Animal of Jilin Province, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to detect the change of cytokine transcript levels after infected by *Mycobacterium tuberculosis*, build recombinant standard plasmids of IL-6, IL-10, TNF- α , a quantitative real-time PCR standard curve was established for cytokine transcript levels. Application of the method was used to analyze cytokine transcript levels that different virulence *Mycobacterium tuberculosis* infecting RAW264.7 macrophages at six time points. Comparison with the control group, H37Rv and BCG made changes in transcript levels of these three cytokines, while the IL-6 and TNF- α have more obvious varies. This study provided new ideas of mechanism between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages through different time points cytokines transcriptional level.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; RAW264.7 cell; fluorescence quantitative PCR; cytokine

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI03B02-1); 吉林省科技厅科技支撑计划 (20120225)

作者简介: 张妍, 硕士研究生, 从事经济动物疫病研究。

通讯作者: 杜锐。E-mail: durui71@126.com

结核病 (Tuberculosis, TB) 是一种慢性消耗性人畜共患传染病。结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染后通常表现为慢性症状, 并且感染后的潜伏期较长, 潜伏期的动物具有传染性^[1]。病畜尤其是具有开放性结核的病畜是人类结核病的主要传染源之一^[2]。目前已证实巨噬细胞在结核分枝杆菌免疫逃逸情况中占有重要作用^[3]。巨噬细胞分泌的细胞因子对巨噬细胞凋亡有重要的调控作用。TNF- α 一般认为可由巨噬细胞内源性分泌, 具有促进细胞凋亡的作用^[4]。IL-10 被认为是细胞因子合成的抑制因子能够抑制多种促炎性细胞因子的分泌^[5]。人医认为 IL-10 的水平与结核分枝杆菌的存活成正相关^[6]。在动物中也有 IL-10 能够诱导结核分枝杆菌再活化的报道^[7]。IL-6 在新近的报道中证明可以抑制由结核分枝杆菌感染引起的巨噬细胞自噬。IL-6 的分泌增加有利于结核分枝杆菌抑制机体先天性免疫应答^[8]。本实验选取以上三种与巨噬细胞凋亡有密切关系的细胞因子进行检测, 以期获得对结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用机制更加深刻理解。

目前, 国际上对基因表达水平的检测通用的是荧光定量 PCR 方法。此方法具有敏感性高、重复性好、耗时短、操作简便和无污染等优点^[9]。本实验通过构建能够用于准确稳定检测受体 mRNA 表达水平的重组质粒, 建立以 Ct 值为横坐标以重组质粒倍比稀释倍数为纵坐标的标准曲线, 以实现巨噬细胞分泌的细胞因子的定量分析。通过探讨巨噬细胞分泌的三种细胞因子 IL-6、IL-10、TNF- α 在巨噬细胞感染结核分枝杆菌后不同时间的转录水平, 为研究巨噬细胞凋亡机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 RAW264.7 细胞和强毒结核分枝杆菌 H37Rv 由吉林大学孙长江老师赠与; 弱毒结核分枝杆菌 BCG 由本实验室保存; EDTA (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); β -巯基乙醇 (Amresco 公司); DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (Amresco 公司); 二甲基亚砷 (Sigma 公司); DEPC (Amresco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); TRIzol (大连宝生物工程有限公司); SYBR® Premix EX Taq™ II (大连宝生物工程有限公司); Primescript® RT reagent Kit With gDNA Erase (大连宝生物工程有限公司); 其他常规化学试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养 RAW264.7 小鼠巨噬细胞为贴壁细胞正常情况下为亮圆形, 采用含 10% 血清、1% 双抗的 DMEM 细胞培养液于含 50 mL/L CO₂ 的 37 °C 的细胞培养箱中培养。使用时用 0.1% 的胰酶消化使其悬浮, 计数调整其浓度为 5×10^5 个/mL, 铺于 12 孔板中继续培养。

1.2.2 结核分枝杆菌培养 实验室罗氏培养基上保存的结核分枝杆菌成簇生长为乳黄色块状物, 卡介苗表面成菜花样, 结核分枝杆菌表面光滑, 将其刮下接种于 7H9 液体培养基培养 3~5 d, 可见液体浑浊内有白色颗粒, 有菌膜挂壁。将菌液进行倍比稀释涂板进行菌落计数, 离心用 PBS 稀释使其终浓度为 5×10^6 /mL 备用。

1.2.3 结核分枝杆菌感染巨噬细胞 结核分枝杆菌感染 12 孔板中生长 12 h 以上贴壁良好的细胞, 于 CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中孵育 4 h (此时使用的营养液不含血清不含双抗)。吸出营养液重新加入含血清不含双抗的营养液继续培养 1、2、4、12、24、48 h。

1.2.4 RNA 的提取及反转录 12 孔板中每孔直接加入 1 mL TRIzol 试剂, 吸出后静置 5 min 使核蛋白充分解离。加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡 15 s 静置 2~3 min, 12000 g 离心 15 min 取上清加入 0.5 mL 异丙醇, 轻轻混匀后静置 10 min, 12000 g 离心 10 min 弃去上清加入 1 mL 75% 乙醇 (用 DEPC 水配制) 轻轻混匀。7500 g 离心 5 min 弃上清后晾干, 加适量 DEPC 水溶解。采用 RT-PCR 专用反转录试剂盒进行去除基因组 DNA 和反转录两步反应。按照试剂盒要求进行操作。

1.2.5 引物设计及定量模型制备 根据 GenBank 中小鼠的 TNF- α 、IL-6、IL-10 的核苷酸序列, 应用 BLAST 进行同源性比较分析, 分别选取序列的保守区域, 利用 Primer6.0 引物设计软件设计荧光定量引物, 通过梯度 PCR 反应确定各引物的最适退火温度分别为 60、60、51 °C, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

取 PCR 扩增产物以 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 鉴定扩增基因片段的大小。鉴定正确后, 用凝胶回收试剂盒进行回收, 步骤参见凝胶回收试剂盒说明书。将三段基因分别与 pMD18-T 载体连接, 转化入 JM109 感受态细胞, 提取质粒 DNA 并测序。

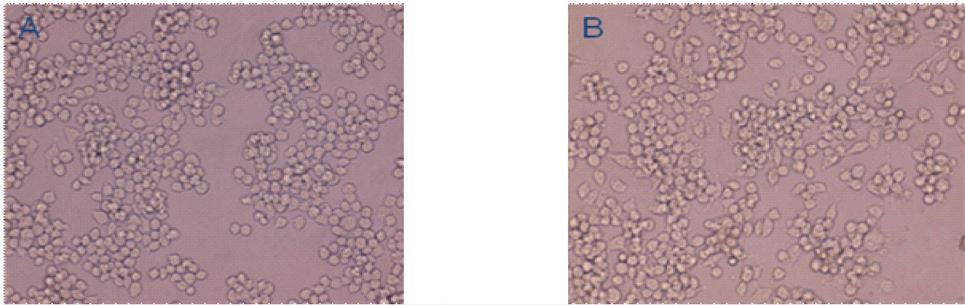
表 1 荧光定量 PCR 引物		
引物名称	引物(5'-3')	扩增片段大小/bp
IL-6-F	CAACGATGATGCACTTGCAGA	117
IL-6-R	CTCCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA	
IL-10-F	GCCAGAGCCACATGCTCCTA	145
IL-10-R	GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA	
TNF-α-F	TCACCCACACCGTCAG	170
TNF-α-R	GAGTTGGTCCCCCTTC	

1.2.6 不同细胞因子标准曲线建立 测定各细胞因子的重组质粒的浓度及其 A260 /280 的比值, A260/280 的比值在 1.8~2.0 之间方可用于建立标准曲线。将质粒 DNA 倍比稀释 5 个梯度,进行荧光定量 PCR。反应条件为: 95 ℃ 30 s; 95 ℃

5 s,不同退火温度 52~60 ℃ 30 s,72 ℃ 延伸30 s, 共进行 40 个循环;采集荧光信号得出扩增产物的解链曲线。反应体系为:然后用反应所得 Ct 值制作标准曲线。
1.2.7 不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞 mRNA 转录水平检测 将提取的 cDNA 按 1.2.5 中反应条件和时间进行检测。

2 结果

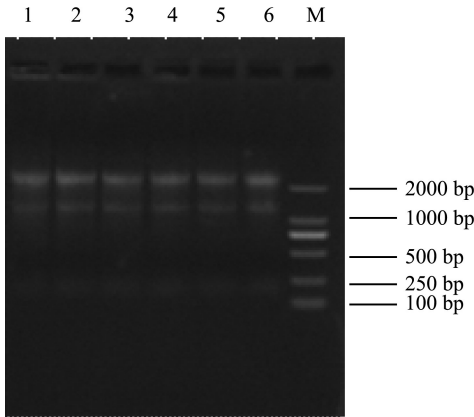
2.1 结核分枝杆菌感染巨噬细胞结果 正常 RAW264.7 细胞成圆形,折光度好,边缘清晰(图 1-A); 感染后细胞发生皱缩,细胞质有小泡形成,边界不明显(图 1-B)。



A: 正常 RAW264.7 细胞; B: 感染结核分枝杆菌后的 RAW264.7 细胞

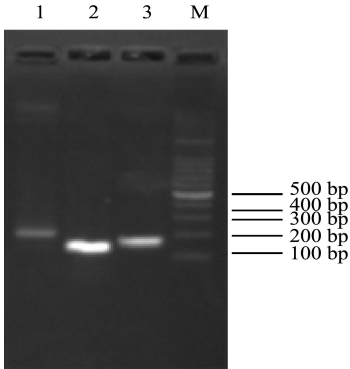
图 1 感染前后的 RAW264.7 细胞形态

2.2 细胞 RNA 提取结果及定量模型制备结果 将提取的 RNA 进行凝胶电泳可见在明显的三条带(图 2),其中 28 s 亮度约为 18 s 两倍,表示所提 RNA 质量较好无降解。图 3 为 IL-6、IL10、TFN-α PCR 鉴定结果,片段大小与预期相符。



1-6: 6 个时间点细胞 RNA; M: DL2000

图 2 6 个时间点细胞 RNA 提取结果



1: TNF-α; 2: IL-6; 3: IL-10; M: 100 bp DNA Maker

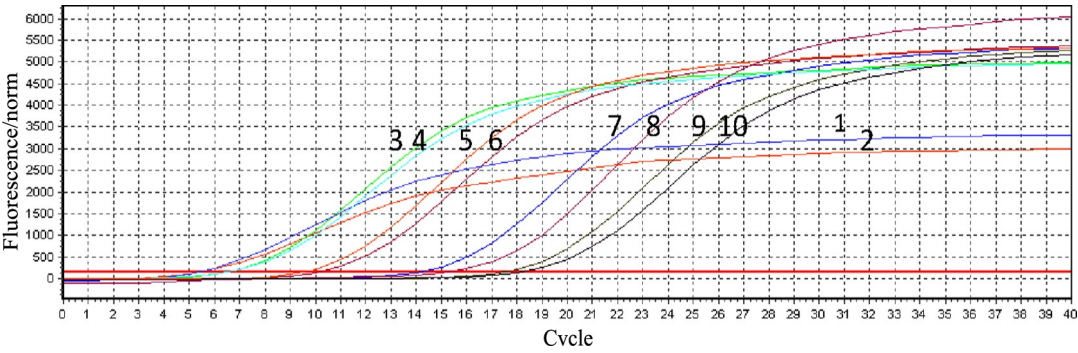
图 3 三种细胞因子 PCR 鉴定结果

各质粒 DNA 的浓度见表 2,其 A260/280 比值均在 1.8~2.0 之间,可以用于绘制标准曲线。

表 2 重组质粒 DNA 浓度测定结果		
基因名称	A260/280	质粒浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
IL-6	0.069/0.042	38.932
IL-10	0.151/0.083	107.847
TNF-α	0.056/0.030	52.110

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线建立结果 对重组标准质粒进行 10 倍稀释,共稀释 6 个梯度,系统自动生成扩增反应的标准曲线(图 4)及溶解曲线(图 5)。实时荧光定量 PCR 结果表明:质粒在原浓度

时未产生吸收峰,在 $10^1 \sim 10^5$ 的范围内有良好的线性关系,说明其灵敏度为 10^1 拷贝/反应。溶解曲线均产生单一峰型,无引物二聚体等非特异性产物,特异性强。



1、2 为质粒 10 倍稀释; 3、4 为质粒 10^2 倍稀释; 5、6 为质粒 10^3 倍稀释; 7、8 为质粒 10^4 倍稀释; 9、10 为质粒 10^5 倍稀释

图 4 细胞因子重组质粒不同浓度扩增曲线

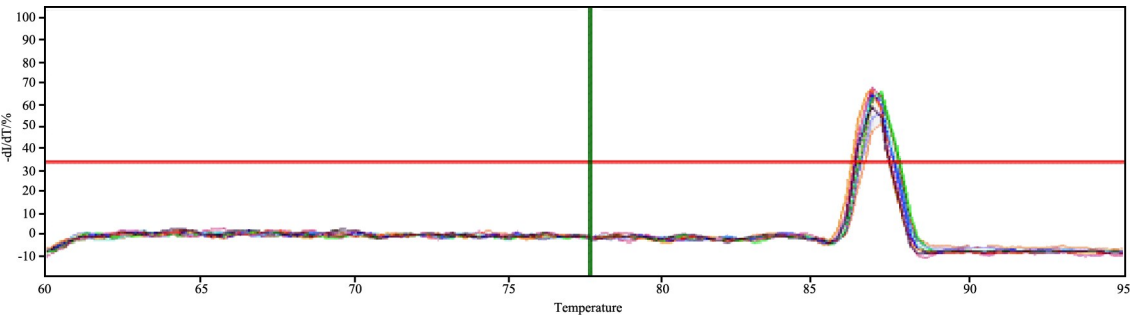


图 5 细胞因子重组质粒不同浓度溶解曲线

通过计算得出回归方程分别为: IL-6 : $y = -0.3034x + 2.2084$ $R^2 = 0.9786$; TNF- α : $y = -0.2809x + 0.0775$ $R^2 = 0.9549$; IL-10 : $y = -0.3046 + 0.4156$ $R^2 = 0.9011$ 。 R^2 均大于 0.9, 可见 Ct 值与其对应标准品浓度对数值在稀释度范围内呈良好的线性关系, 可对检测样品进行定量的测定分析。

2.4 不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞 mRNA 转录水平检测结果 应用已建立的标准曲线对结核分枝杆菌感染巨噬细胞 RAW264.7 后产生的三种细胞因子在不同时间的转录水平进行检测, 结果见图 6-图 8。

由图 6 可以看出, 对于结核分支杆菌感染早期 H37Rv 组、BCG 组 IL-6 的转录水平明显增高, 随着时间的延长而逐渐降低。对照组转录水平在 24 h 和 48 h 时有增高趋势。

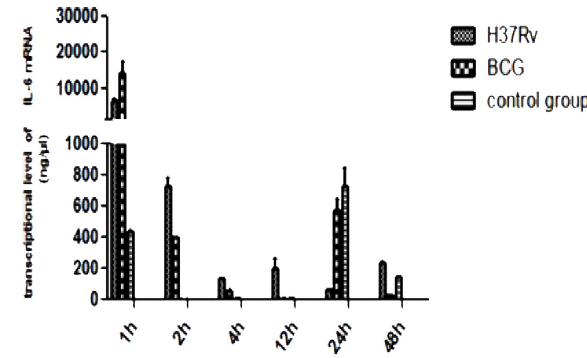


图 6 结核分枝杆菌感染巨噬细胞 6 个时间点 IL-6 转录水平

由图 7 可以看出, 各组 IL-10 转录水平整体较低, H37Rv 组、BCG 组的转录水平在前 12 h 相差不大, 在 12 h 后转录水平开始下降, 而后维持较低水平。

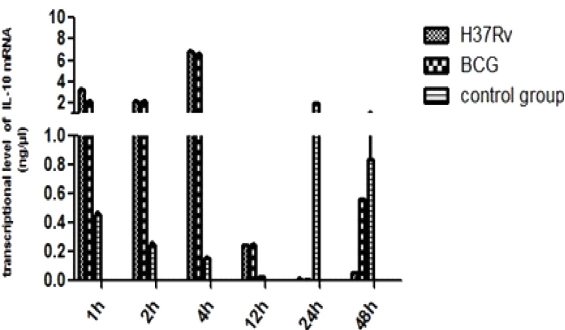


图 7 结核分枝杆菌感染巨噬细胞 6 个时间点 IL-10 转录水平

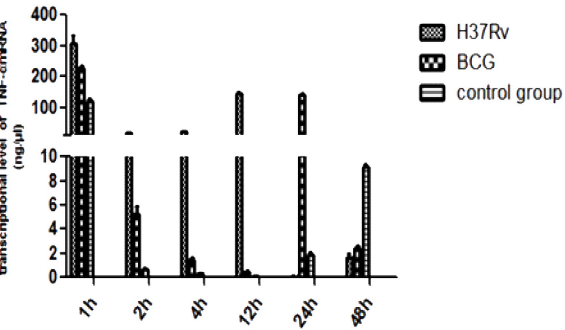


图 8 结核分枝杆菌感染巨噬细胞 6 个时间点 TNF-α 转录水平

由图 8 可以看出,在前 12 h H37Rv 组 TNF-α 的转录水平均高于 BCG 组,且在 2~12 h 时分别高出 3.14 倍、15.66 倍和 315.21 倍,24 h 后则出现相反的结果。

3 讨论与分析

在结核分支杆菌与巨噬细胞的相互作用过程中,巨噬细胞在行使免疫细胞功能杀灭结核分支杆菌的同时,结核分支杆菌也同时在逃逸巨噬细胞的免疫。本实验通过对三种巨噬细胞免疫相关细胞因子转录水平的分析,进一步探讨引起巨噬细胞凋亡及抑制的深层原因^[10-11]。对于细胞因子 IL-6,强毒株引起的转录水平除了在 1 h 时,其他时间点均高于卡介苗组,分析原因可能由于结核分枝杆菌强毒株能够刺激巨噬细胞分泌稳定的 IL-6,帮助巨噬细胞降低自噬,有利于结核分枝杆菌长期存活。对于细胞因子 TNF-α,在 1 h 时强毒株和弱毒株的转录水平都较高,分析原因可能由于结核分枝杆菌感染前期都会引起巨噬细胞凋亡;弱毒株作用后 TNF-α 转录水平在 2 h 后开始降低并维持在一定水平,而强毒株的转录水平在 2~12 h 高于弱毒

株,24 h 后开始远低于弱毒株,分析原因可能由于结核分枝杆菌感染巨噬细胞过程中首先会发生强烈免疫反应,各种细胞因子大量分泌,2~12 h 为作用期巨噬细胞开始分泌肿瘤坏死因子诱导凋亡并且强毒株诱导巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子更多,24 h 后强毒株开始发挥其抑制巨噬细胞凋亡作用,肿瘤坏死因子基本不分泌。对以上结果综合分析发现,在刺激 12~24 h 时,各细胞因子的转录水平往往发生逆转变性变化,分析此段时间可能为不同毒力结核分枝杆菌诱导细胞因子发挥作用的关键时间,后续可在此段时间进一步研究。

应用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞因子目前使用较多的有两种分析方法:一种是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,该方法操作更为简便,可通过引入的管家基因消除由于收集细胞、反转录和加样过程产生的误差^[12];另一种是通过构建已知浓度的目的基因标准质粒建立标准曲线,对目标基因进行定量分析,该方法对于构建重组标准质粒和建立标准曲线的灵敏度和可靠性要求较高^[13]。在本实验中从质粒的 10 倍稀释样品开始出现荧光信号的指数增长,即其最小检测拷贝数为 10^1 拷贝/反应。同时随机挑选两组样品重复 5 次进行检测其 Ct 值相对标准差小于 10%,表明该方法有较好重复性。本试验通过对不同时间点细胞因子转录水平研究为结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用机理提供新的思路。

参考文献:

[1] Young B D, Perkins M D, Duncan K, et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis[J]. Clinical Investigation, 2008, 118(4): 1255-1265.

[2] Zanella G, Bar-Hen A, Boschirol ML, et al. Modelling transmission of bovine tuberculosis in Red Deer and Wild Boar in Normandy, France [J]. Zoonoses and Public Health, 2012, 59 (2): 170-178.

[3] Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(Pt2): 433-436.

[4] Harris J, Hope J C, Keane J. Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infect Dis, 2008, 198(12):1840-1850.

鸭肠炎病毒强毒参考株在感染鸭体内的动态分布研究

文晶亮, 李俊平, 李启红, 李 岭, 孙 淼, 李慧姣, 杨承槐*, 夏业才*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2014-09-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0010-07 [中图分类号] S851.32

[摘要] 为研究鸭肠炎病毒(DEV)强毒株在感染鸭体内的动态分布规律, 根据 DEV 的 gD 基因序列设计检测引物 RT-gDF 和 RT-gDR, 建立了特异性强、敏感性高、重复性好的检测 DEV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。应用已建立的方法, 对 DEV 强毒参考株感染鸭的组织脏器进行了定量检测。结果显示, 接种后 6 h 即可在所有受检组织中检测到 DEV DNA, 随着病程发展, DNA 拷贝数持续升高, 直至接种 5 d 后感染鸭全部死亡。其中结肠病毒 DNA 拷贝数为最高, 达到 $10^{13.26}$ copies/g, 法氏囊、肝脏和盲肠次之, 约 10^{12} copies/g。证实了 DEV 强毒对感染鸭的免疫器官、神经组织和消化系统均具有广泛的嗜性。

[关键词] 鸭肠炎病毒; 实时荧光定量 PCR; 鸭; 动态分布

Dynamic Distribution of Duck Enteritis Virus Standard Challenge Strain in Experimentally Infected Ducklings

WEN Jing-liang, LI Jun-ping, LI Qi-hong, LI Ling, SUN Miao, LI Hui-jiao, YANG Cheng-huai*, XIA Ye-cai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

基金项目: 科技部科技基础性工作专项“重大动物疫病病原及相关制品标准物质研究(2008FY130100)”

作者简介: 文晶亮, 硕士研究生, 从事禽病研究。

通讯作者: 杨承槐, E-mail: ychenghuai@163.com; 夏业才, E-mail: xiayecai@ivdc.gov.cn

- [5] Zhu J, Guo L, Min B, *et al.* Growth factor independent - 1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation [J]. *Immunity*, 2002, 16(5): 733-744.
- [6] Cooper A M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 393-422.
- [7] 杨颖乔, 彭圣威. 肺结核患者细胞因子水平测定的临床研究 [J]. 咸宁学院学报(医学版), 2009, 23(3): 211-212.
- [8] 任 伟, 杨利峰, 赵德民. 实时荧光定量 PCR 构建阮病毒相关蛋白 p38MAPK 标准品质粒和标准曲线 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(10): 34-36.
- [9] Rajesh Kumar Dutta, Mahesh Kathania. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, (44): 942-954.
- [10] 卜文甲. 家畜结核分枝杆菌致病性的分析 [J]. 养殖技术顾问, 2012, (11): 148.
- [11] Griffin J F T, Rodgers C R, Liggetta S, *et al.* Tuberculosis in ruminants: characteristics of intra-tonsillar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer [J]. *Tuberculosis*, 2006, 86: 404-418.
- [12] 梅 英, 刘长安, 龚建平. 定量 PCR 的研究进展 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(1): 23-26.
- [13] van der Velden V H, Hochhaus A, Cazzaniga G, *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects [J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1013-1034.

(编辑: 李文平)