

硒镉互作对体外培养鸡淋巴细胞硒蛋白 K 和硒蛋白 S 表达的影响

赵文超, 朱轶豪, 程新越, 白 妍, 陈 晰, 李 保, 徐世文
(东北农业大学 动物医学学院 哈尔滨 150030)

中图分类号: S831

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)10-0101-03

关键词: 鸡; 淋巴细胞; 硒; 镉; 硒蛋白 S; 硒蛋白 K

摘 要: 为了探讨镉对体外培养鸡淋巴细胞硒蛋白 S 和硒蛋白 K 表达的影响及硒的颉颃作用, 试验在体外培养鸡脾脏淋巴细胞的培养液中分别添加硒 1×10^{-7} mol/L、镉 1×10^{-6} mol/L 和硒 1×10^{-7} mol/L 加镉 1×10^{-6} mol/L, 分别在培养的 12, 24, 36, 48 小时采用实时 PCR 法检测硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达量。结果表明: 硒能够显著提高镉诱导的硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 的表达量, 镉能够降低体外培养鸡淋巴细胞硒蛋白 K 和硒蛋白 S 的表达量。

镉(Cd)作为一种生产性毒物 and 环境污染物, 对其毒作用机制特别是免疫抑制机制已进行了较深入的研究^[1-3], 镉可引起内质网应激^[4]。硒(Se)作为机体必需的微量元素, 在一定剂量条件下具有颉颃镉的毒理学作用。硒与镉联合作用的研究表明, 硒可以颉颃镉诱导的 DNA 损伤、原癌基因表达增强、细胞凋亡, 而且对镉引起的自由基生成增多具有一定的颉颃作用^[5-7]。近年的研究发现, 硒蛋白 K 和硒蛋白 S 定位于内质网上, 与内质网的功能密切相关^[8-9]。本研究在此基础上, 通过在培养液中添加不同浓度的硒、镉, 进一步研究硒、镉联合作用对鸡淋巴细胞硒蛋白 K 和硒蛋白 S 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640 完全培养基, 购自 Invitrogen 公司; 人淋巴细胞分离液, 购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司; TRIzol 试剂、M-MLV 反转录酶, 购自 Invitrogen 公司; 实时 PCR 用引物, 由上海英俊生物技术有限公司合成; RNase 抑制剂(RRI)、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP), 购自 Promega 公司; 染料法实时荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM II)、DNA Marker、Oligo(dT)₁₈, 购自 TaKaRa 公司; 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、明胶(Gelatin)、焦碳酸乙二酯(DEPC)、聚酞亚胺(PI)、Rnase, 购自 Sigma 公司; 4', 6-二脒

基-2-苯基吡啶(DAPI), 购自罗氏公司; RNAase 固相清除剂, 购自北京天恩泽基因科技有限公司; 青霉素, 购自哈药集团制药总厂; 链霉素, 购自大连美罗大药厂; Na₂SeO₃, 购自成都市龙泉微量元素厂。其他试剂无特殊说明均为国产分析纯。

1.2 淋巴细胞悬液的制备及试验分组

无菌取出 60 日龄健康公鸡脾脏, 应用淋巴细胞分离液分离鸡脾脏淋巴细胞, 台盼蓝染色后, 观察分离细胞的存活率。将存活率大于 95% 的细胞在含有 1 μmol/L CdCl₂ 的 RPMI-1640 培养液(含 10% FBS)中培养 24 h, 重复 5 次。

1.3 qPCR 对目的基因 mRNA 水平检测方法的建立

1.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中发表的基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 序列见表 1。

表 1 qPCR 引物

基因 (基因序列号)	引物序列(5'~3')	产物长度/bp
硒蛋白 K (NM_001025441.2)	上游 5'-AGCTTGTCAGCCATAACAGATTCT-3' 下游 5'-CCCATTCTACGGCAGGATT-3'	167
硒蛋白 S (NM_001024734.2)	上游 5'-GGAGGAGCTGAAGAAAGTGAA-3' 下游 5'-GCTCTGTCTCGGCAGGTGAT-3' 下游 5'-CTCTCGGCTGTGGTGTGAA-3'	225

1.3.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 根据 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书对细胞总 RNA 进行抽提。应用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度, 通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值和琼脂糖凝胶电泳来判定 RNA 的纯度与完整性。选择纯度和完整性较好的样品, 取总 RNA

收稿日期: 2012-04-14

基金项目: 黑龙江省教育厅科研基金项目(10551038)

作者简介: 赵文超(1991-), 男, 本科生, 604776342@qq.com。

通信作者: 徐世文(1966-), 男, 教授, 博士, 博士生导师。

5 μg , 加 50 pmol/L Oligo (dT)₁₈ 2.0 μL , 10 mmol/L dNTP 2.0 μL , 加无 RNAase 水至总体积为 24 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 迅速冰上冷却 1~2 min; 短暂离心后, 加 5 $\times$ Buffer 8.0 μL , 0.1 mol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 4.0 μL , 40 U $\cdot$ μL RRI 2.0 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min; 加 M-MLV 2.0 μL 轻柔混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 终止反应, 然后 -30 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 待用。

1.3.3 qPCR 扩增体系 qPCR 反应采用 SYBR Green I 荧光染料法, 按照试剂盒使用手册进行。反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$ Conc.) 10 μL , Rox Reference Dye II 0.4 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , cDNA 模板 2.0 μL , 灭菌双蒸水 6.8 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 40 个循环; 最后为融解反应。所有样品做 3 个重复孔, 并在同一块平板上进行 cDNA 样品 5 倍逐级稀释相对标准曲线, 进行线性回归分析, 同时获得扩增曲线、融解曲线和 Slope 值进行下一步分析。以 β -Actin 为内参, 进行硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达水平相对定量分析。计算采用 Pfaffl 法, 计算公式如下:

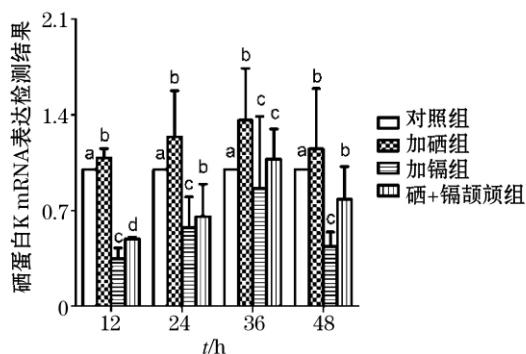
$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\beta\text{-Actin}})^{\Delta Ct_{\beta\text{-Actin}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

其中 $E = 10^{(-1/\text{slope})}$; $\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})$ 为目的基因在对照组 Ct 值与试验组 Ct 之差; $\Delta Ct_{\beta\text{-Actin}}(\text{control} - \text{sample})$ 为 β -Actin 对照组 Ct 值与试验组 Ct 之差。

1.4 数据的统计与分析

所有数据的统计学分析应用 SPSS 13.0 软件进行一维方差分析, 并应用 Microsoft Excel 2000 对试验数据进行作图。所有数据均用 “ $\bar{x} \pm s$ ” 形式表示。P < 0.05 被认为存在显著性差异。

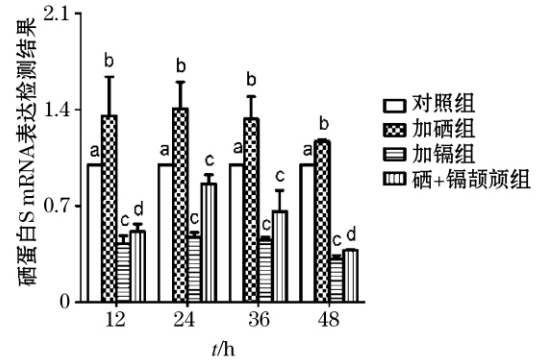
2 结果(见图 1、图 2)



注: 小写字母不同表示相同时间组间数据差异显著 ($P < 0.05$), 相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 1 硒蛋白 K mRNA 表达检测结果

由图 1 和图 2 可知, 加硒、镉、硒 + 镉对鸡脾脏细胞中硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达水平有显著影响, 呈现敏感的应答模式。与对照组相比, 体外培



注: 小写字母不同表示相同时间组间数据差异显著 ($P < 0.05$), 相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 2 硒蛋白 S mRNA 表达检测结果

养的脾脏细胞单独用硒处理后, 硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达呈升高的趋势 ($P < 0.05$)。相反, 单独用镉处理, 脾脏细胞中硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达水平呈下降的趋势 ($P < 0.05$)。而硒与镉共同处理脾脏细胞, 硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达水平要比单独用镉处理高, 比单独用硒处理要低。随着培养时间的变化, 脾脏细胞硒蛋白 K 和硒蛋白 S mRNA 表达水平呈现不规则的趋势。

3 讨论

硒能在多方面有效消除镉对机体的损害, 并直接影响镉的代谢。已有研究表明, 硒对镉的颉颃作用主要有以下几种机制: 与硒的抗氧化作用有关; 硒能影响镉的代谢; 硒能诱导金属硫蛋白的产生; 硒与镉形成复合物。硒蛋白是硒在机体内发挥生物学功能的主要形式, 硒蛋白 K 和硒蛋白 S 主要定位于内质网, 是一类膜蛋白。硒蛋白 K 是 III 型膜蛋白, 含有 1 个短的位于内质网腔的氨基末端序列和位于细胞质的含 sec 的羧基末端序列, 硒蛋白 K 具有同硒蛋白 S 相似的调节内质网应激的功能^[9]。研究表明, 硒蛋白 S 具有保护细胞颉颃氧化损伤及内质网应激诱导的细胞凋亡、参与脂蛋白代谢、精子发育过程、炎症反应及作为内质网相关蛋白降解逆向转运通道的一个重要组成部分^[10]。

镉中毒能够引起内质网应激。研究表明: 镉处理 1 个月后, 在甲状腺主细胞内, 可见扩张的和呈环状排列的粗面内质网; 镉处理 36 个月后, 在甲状腺主细胞内可见有膜性同心层状小体和成对内质网。本研究表明, 体外培养淋巴细胞时, 在培养液中添加硒后, 能够显著提高硒蛋白 K 和硒蛋白 S 的表达量, 这与东北农业大学动物医学学院姚海东前期体外培养骨骼肌细胞的研究结果一致(结果另文发表)。添加镉后, 能够显著降低细胞内硒蛋白 K 和硒蛋白 S 的表达; 而添加硒后, 能够提高上述 2 种硒蛋白的表达量, 表明其对镉诱导的内质网应激具有保护作用。

参考文献:

常德市郊仔猪沙门菌的分离鉴定及药敏试验

王京仁, 李淑红, 成 钢

(湖南文理学院 生命科学学院 湖南 常德 415002)

中图分类号: S852.61⁺7

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)10-0103-03

关键词: 沙门菌; 仔猪; 药敏试验

摘 要: 为了对常德市郊某猪场病死仔猪分离的沙门菌进行分离、鉴定及耐药情况检测, 试验用世界卫生组织(WHO)推荐的 Kirby-Bauer 氏法对分离株进行药敏试验。结果表明: 从 2 例病猪体内分离鉴定出 4 株沙门菌, 分离率为 26.7%; 分离株对环丙沙星、氟哌酸、复达新 3 种药物敏感, 对先锋五号、氨苄西林、头孢呋肟 3 种药物中介, 对复方新诺明、丁胺卡那、强力霉素、庆大霉素、美满霉素、羧苄青霉素、红霉素、青霉素、四环素 9 种药物产生了耐药性, 其中敏感率为 20.00%, 中介率为 20.00%, 耐药率为 60.00%。

沙门菌属是一群寄生于人和动物肠道内的无芽孢杆菌, 革兰染色呈阴性, 生化特性和抗原结构相似, 兼性厌氧。绝大多数沙门菌对人和动物有致病性, 能引起人和动物的多种不同临床表现, 并是人类食物中毒的主要病原之一, 在医学、兽医公共卫生上均有重要意义。本菌常侵害幼、青年动物使之发生败血症、胃肠炎及其他组织炎症^[1], 可引起禽伤寒、鸡白痢、猪霍乱、猪副伤寒等疾病。沙门菌属中致病性最强的是猪霍乱沙门菌, 其次是鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌^[2]。试验从疑似仔猪沙门菌感染病例中采集病料, 进行菌株分离与鉴定及药物敏感试验, 现报道

如下。

1 材料

1.1 试验动物

疑似沙门菌患病仔猪, 采自常德市郊某猪场。

1.2 主要试剂

MH 液体培养基、MH 琼脂培养基、麦康凯培养基, 购自杭州天和微生物试剂有限公司; SS 培养基、亚硫酸铋琼脂(BS)培养基, 购自杭州微生物试剂有限公司; 香柏油, 中国上海标本模型厂生产; 沙门菌属诊断血清(批号为 2009070), 宁波天润生物药业有限公司生产; 细菌生化测定成套试剂(批号为 20071015), 购自杭州微生物试剂厂。

1.3 药敏纸片

药敏纸片, 购自杭州天和微生物试剂有限公司, 共 15 种: 先锋五号(V)、环丙沙星(环)、氨苄西林(氨)、复方新诺明(新)、丁胺卡那霉素(丁)、头孢呋肟(头)、强力霉素(强)、复达欣(复)、庆大霉素(庆)、美满霉素(美)、羧苄青霉素(羧)、红霉素

收稿日期: 2011-09-03; 修回日期: 2012-04-20

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目(10K043); 动物学湖南省重点实验室项目(2008); 湖南省“十二五”重点建设学科(动物学)项目(2011)

作者简介: 王京仁(1963-), 男, 教授, 硕士, 研究方向为动物疾病的防治, wangren6332@163.com。

[1] 王敏, 魏莲, 雷毅雄. 氯化镉诱发人支气管上皮细胞系恶性转化[J]. 中国职业医学, 2005, 32(6): 2-4.

[2] 周志衡, 雷毅雄, 王彩霞, 等. 氯化镉诱发人支气管上皮细胞恶性转化中 hMSH2 基因 mRNA 表达变化[J]. 中国职业医学, 2007, 34(5): 375-377.

[3] 雷毅雄, 陈学敏, 陈家堃. 金属镉应答新基因 TEF-1 δ 的致癌力鉴定[J]. 中国职业医学, 2004, 31(5): 5-7.

[4] 高鹏, 常元勋. 镉和/或硒对大鼠肝脏线粒体和粗面内质网形态的影响[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1993(3): 178-179.

[5] 李金龙, 熊永忠, 徐世文, 等. 镉致鸡脾脏淋巴细胞 DNA 损伤的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 362-364.

[6] 李金龙, 熊永忠, 徐世文, 等. 应用碱性单细胞凝胶电泳技术(SCGE)检测镉致鸡脾脏淋巴细胞 DNA 的损伤效应[J]. 中国兽医学报, 2005, 26(3): 307-309.

[7] 余日安, 贺凌飞, 吴志刚, 等. 硒对镉引起的大鼠肝脏超氧阴离子和羟自由基生成的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(1): 33-36.

[8] 曾金红, 张功臣, 黄开勋. 硒蛋白 S 的生物学功能[J]. 化学进展, 2009, 21(7/8): 1044-1050.

[9] 硒蛋白 S 和硒蛋白 K 在内质网应激中的调节作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.

[10] GAO Y, WALDER K, COLLIER G R, et al. Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter[J]. Diabetes, 2003, 52: 929-934.

(009)