

小鼠乳腺组织中 β -防御素 1 基因的克隆及其在妊娠期和泌乳期乳腺中的表达变化

孟丽丽, 钟 凯*, 王月影, 朱河水

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: β -防御素具有广谱的抗菌活性, 并且是宿主固有免疫的重要参与者。为研究 β -防御素 1 (β -defensin 1, Defb1) 基因在不同泌乳时期的表达变化, 以小鼠第 4 对乳腺组织为研究对象, 用半定量 RT-PCR 法测定了小鼠妊娠期、泌乳期乳腺中 Defb1 基因的表达。结果表明, 妊娠期 Defb1 的表达量呈上升趋势, 且差异显著 ($P < 0.05$), 而泌乳期却恰恰相反, 随着泌乳的进行, Defb1 的表达量逐渐降低, 在泌乳 18 d 时达到最低。

关键词: β -防御素 1; 乳腺; 妊娠期; 泌乳期; 小鼠

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)09-0143-05

Cloning of β -defensin 1 Gene and Its Expression during Gestation and Lactation in Mice Mammary Gland

MENG Li-li, ZHONG Kai*, WANG Yue-ying, ZHU He-shui

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: β -defensin (Defb1) has a broad-spectrum microbicidal activity and is an important participant of innate immunity. In this study, changes of Defb1 expression during pregnancy and lactation in mammary gland of mice were investigated by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the expression of β -defensin 1 was gradually increasing with the development of pregnancy and the difference was significant ($P < 0.05$). Within the process of lactation, Defb1 was gradually decreasing.

Key words: β -defensin 1; mammary gland; gestation; lactation; mice

哺乳动物的乳腺除了为初生幼仔提供其生长所需营养外, 还为人类生产最为完美的食品——乳汁。如何维持乳腺的健康以保障幼畜的健康生长、为人类生产安全的乳制品已成为科研工作者关注的问题。乳汁中存在天然补体系统、溶菌酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、乳过氧化物酶系统, 以及非特异性的免疫细胞, 例如, 中性粒细胞、巨嗜细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞^[1]。近年来, 不断有新的免疫活性成分被发现, 其中较为重要的一种是宿主防御肽 (host defense peptide, HDP)。宿主防御肽是天然免疫的重要介质, 具有广泛的抗菌和抗病毒活性, 是机体防御感染的重要因素。防御素是最早发现的宿主防御肽之一, 1991

年首次在牛体内发现 β -防御素这一阳离子多肽抗生素, 被命名为 TAP (tracheal antimicrobial peptide)^[2]。 β -防御素广泛表达于多种器官黏膜下腺体和上皮细胞, 具有广谱高效的抗菌作用, 广泛分布在机体抵御病原体入侵的第一道防线上, 在使机体免受外界病原体侵袭中发挥着重要的作用^[3]。

Defb1 (β -防御素 1) 最早在人呼吸道中发现, 由上皮细胞分泌生成。Defb1 在动物体内分布非常广泛, 具有广谱的抗菌活性^[4], 并且在免疫系统发育以及免疫应答反应中发挥重要的作用^[5-6]。本试验以小鼠为对象, 用半定量 RT-PCR 法研究了妊娠期、泌乳期小鼠乳腺组织中 Defb1 基因表达的变化, 初步揭示了

收稿日期: 2012-03-30

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究资助计划项目 (2010A230010)

作者简介: 孟丽丽 (1987-), 女, 山东莱阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 泌乳生理生化。E-mail: mengli@163.com

* 通讯作者: 钟 凯 (1974-), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事泌乳生理生化研究。E-mail: zhongkai_henau@gmail.com

Defbl 基因在乳腺发育过程中的表达变化。

1 材料和方法

1.1 试验动物及试验设计

48 只雌性处女昆明小鼠和 24 只雄性昆明小鼠, 购自河南省实验动物中心。在 12 h 光照和 12 h 黑暗的条件下喂养, 环境温度 20~25 °C, 自由采食和饮水。雌性处女小鼠分为妊娠期组 ($n=24$)、泌乳期组 ($n=24$), 于发情前期与 24 只雄性小鼠进行同笼饲养 (雌雄比为 2:1)。

妊娠期组雌性小鼠在同笼后第 2 天开始进行阴道检查, 发现阴道栓明显的当天被看作妊娠 0 d, 妊娠鼠单独饲养, 分别于妊娠的 1 d、6 d、12 d、18 d 处死, 每组 6 只。泌乳期组雌性小鼠在确认其怀孕后单独饲养直至分娩, 将分娩的当天看作泌乳 0 d, 分别于泌乳 1 d、6 d、12 d、18 d 处死, 每组 6 只。

1.2 乳腺组织采集

各组雌性小鼠在试验期结束后被脱臼处死, 取小鼠蹊部乳腺组织, 迅速置液氮中, 后放于 -80 °C 冰箱中保存。

1.3 小鼠乳腺中 *Defbl* 基因的克隆

1.3.1 引物设计及合成 根据 GenBank 中小鼠 *Defbl* 基因的 cDNA 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物, 由大连宝生物 (TaKaRa) 公司合成, 其序列为: F: 5'-CACTCTGGACCCTGGCTGCC-3', R: 5'-AATCCATCGCTCGTCCTTTA-3', 目的片段大小约为 277 bp。

1.3.2 乳腺组织中总 RNA 提取 按照 TRIzol 试剂操作说明提取小鼠乳腺总 RNA; 紫外分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 值, 初步确定提取的总 RNA 质量; 凝胶电泳检测其完整性。

1.3.3 cDNA 链的合成 以提取的 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 反应体系: 模板 RNA 1 μ L (2 μ g), Oligo (dT) 15 (50 pmol/L) 1 μ L, M-MLV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μ L) 1 μ L, dNTP Mix (10 μ mol/L) 5 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.7 μ L, 5 \times M-MLV Buffer 5 μ L, 加水至 25 μ L。反应程序为: 25 °C 10 min, 37 °C 60 min, 72 °C 10 min, 后冰浴 2 min, 得到 cDNA, -20 °C 保存待用。

1.3.4 PCR 扩增 以 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: cDNA 2 μ L, 上游引物 (20 pmol/L) 1 μ L, 下游引物 (20 pmol/L) 1 μ L, 2 \times PCR plus mix 12.5 μ L, 加水至 25 μ L。反应程序为: *Defbl*: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。 β -actin: 95 °C 预变性 5 min;

95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 26 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.4 克隆测序

目的片断的回收参照 TaKaRa Agaose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 DNA 胶回收试剂盒说明书进行, 回收的 DNA 片断, -20 °C 下保存备用。

将纯化后的 PCR 扩增产物连接到 pMD-19T 上, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 下过夜培养。菌落长成后, 进行蓝白斑筛选, 将重组转化体细胞接种于 1 mL LB/Amp⁺ 液体培养基中, 37 °C 下振荡过夜培养。进行菌液 PCR 筛选阳性克隆, 取阳性菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 将测序结果与 NCBI 上已报道的 *Defbl* 基因的序列进行对比分析。

1.5 不同泌乳时期小鼠乳腺组织中 *Defbl* 基因的表达变化

将不同泌乳时期采集的乳腺组织按照上述 *Defbl* 基因的克隆的方法进行检测。

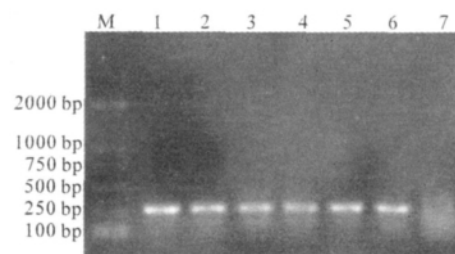
1.6 数据统计

用 SPSS 13.0 统计软件进行数据整理和统计, 数据用平均值 \pm 标准差表示, 多组间比较用方差分析 *F* 检验。利用 Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 小鼠乳腺中 *Defbl* 基因的克隆

从小鼠乳腺中提取的总 RNA 经 RT-PCR 后, 在 277 bp 位置有预期大小的特异性扩增条带 (图 1)。



M. DL2000; 1—6. 阳性克隆; 7. 阴性对照

图 1 阳性克隆的 PCR 鉴定结果

2.2 RT-PCR 产物的测序及序列分析结果

经上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 序列测定, 小鼠乳腺中 *Defbl* 阳性克隆序列在 NCBI 上比较, 显示序列同小鼠 *Defbl* (NM_007843) 同源性的 99% (图 2), 表明所扩增 PCR 产物为预期的目的片断。

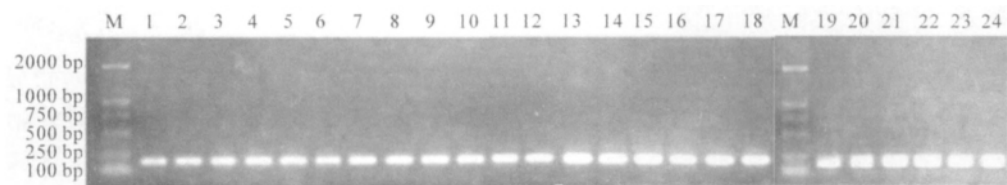
```
Defb1 1 CACTCTGGACCTGGCTGCCACCACTATGAAAACCTATTACTTTCTCCTGGTGATGATAT 60
NM_007843 28 CACTCTGGACCTGGCTGCCACCACTATGAAAACCTATTACTTTCTCCTGGTGATGATAT 87
Defb1 61 GTTTTCTTTTCTCCAGATGGAGCCAGGTGTTGGCATTCTCACAAGTCTTGGACGAAGAA 120
NM_007843 88 GTTTTCTTTTCTCCAGATGGAGCCAGGTGTTGGCATTCTCACAAGTCTTGGACGAAGAA 147
Defb1 121 CAGATCAATACAAATGCCTTCAACATGGAGGATTCTGTCTCCGCTCCAGCTGCCCATCTA 180
NM_007843 148 CAGATCAATACAAATGCCTTCAACATGGAGGATTCTGTCTCCGCTCCAGCTGCCCATCTA 207
Defb1 181 ATACCAAACCTACAGGGAACCTGTAAACAGATAAGCCCACTGTTGTAAGAGCTGACAGT 240
NM_007843 208 ATACCAAACCTACAGGGAACCTGTAAACAGATAAGCCCACTGTTGTAAGAGCTGACAGT 267
Defb1 241 AGTTTGAAGAATGGACATAAAGGACGAGCGATGGATT 277
NM_007843 268 AGTTTGAAGAATGGACATAAAGGACGAGCGATGGATT 304
```

图 2 克隆片段 *Defb1* 与 NM_007843 序列同源性比较

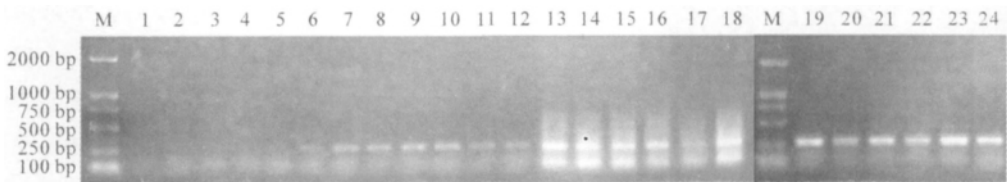
2.3 妊娠期小鼠乳腺中 *Defb1* 基因表达规律

妊娠期小鼠乳腺 β -actin 基因扩增产物电泳结果见图 3,妊娠期小鼠乳腺 *Defb1* 基因扩增产物电泳结果见图 4。利用凝胶成像系统软件分析 *Defb1* 和 β -actin 电泳条带密度值,小鼠乳腺中 *Defb1* mR-

NA 转录水平的相对定量结果见表 1。从图 4 可以看出,*Defb1* 基因在妊娠的各个时期均有表达。从表 1、图 5 中可以看出,随着妊娠的进行,*Defb1* mRNA 转录水平逐渐上调,各组间差异均显著 ($P<0.05$)。



M. Marker2000; 1—6,7—12,13—18,19—24 分别代表妊娠 1、6、18、12 d
图 3 妊娠期小鼠乳腺组织中 β -actin mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果



M. Marker2000; 1—6,7—12,13—18,19—24,分别代表妊娠 1、6、18、12 d
图 4 妊娠期小鼠乳腺组织中 *Defb1* mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果

表 1 妊娠期小鼠乳腺 *Defb1*/ β -actin 电泳条带密度扫描结果 (n=6)

组别	<i>Defb1</i> / β -actin (IOD)
妊娠 1 d	0.07 \pm 0.03 ^a
妊娠 6 d	0.23 \pm 0.03 ^b
妊娠 12 d	0.32 \pm 0.06 ^c
妊娠 18 d	0.56 \pm 0.06 ^d

注:同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

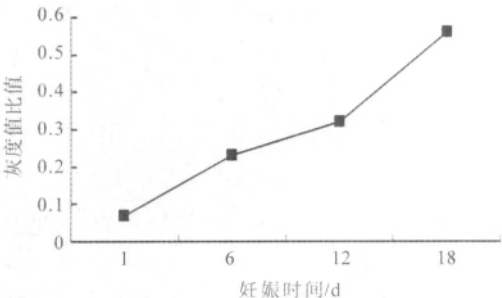
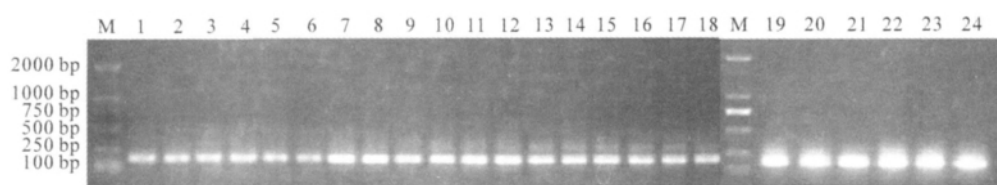


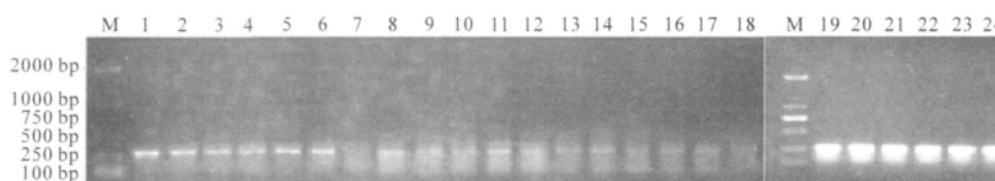
图 5 妊娠期小鼠乳腺中 *Defb1* 表达量变化趋势

2.4 泌乳期 *Defb1* 基因表达规律

泌乳期小鼠乳腺 β -actin 基因扩增产物电泳结果见图 6;小鼠乳腺 *Defb1* 基因扩增产物电泳结果见图 7。利用凝胶成像系统软件分析 *Defb1* 和 β -actin 电泳条带密度值,小鼠乳腺中 *Defb1* mRNA 转录水平的相对定量结果见表 2。从图 6 中可以看出,*Defb1* 基因在泌乳的各个时期均有表达。从表 2、图 8 中可以看出,随着泌乳的进行 *Defb1* 基因的转录水平逐渐降低,泌乳 1 d 转录水平最高,此后 *Defb1* 转录水平持续下降,18 d 时达到最低值。与泌乳 1 d 相比,泌乳 6 d 时 *Defb1* mRNA 水平下调,但差异不显著 ($P>0.05$);泌乳 12 d、18 d, *Defb1* 的转录水平显著下降 ($P<0.05$)。



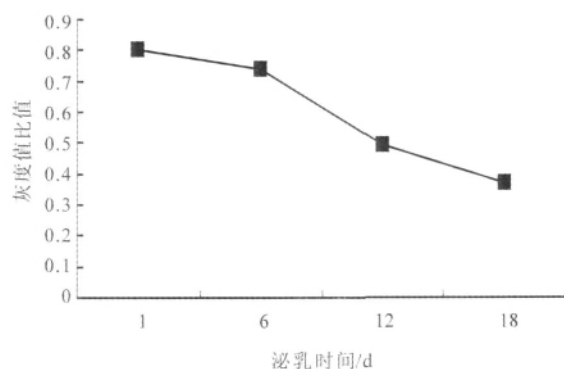
M, Marker2000; 1—6, 7—12, 13—18, 19—24 分别代表泌乳 1、12、18、6 d

图 6 泌乳期小鼠乳腺组织中 β -actin mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果

M, Marker2000; 1—6, 7—12, 13—18, 19—24 分别代表妊娠 1、12、18、6 d

图 7 泌乳期小鼠乳腺组织中 *Defbl* mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果表 2 泌乳期小鼠乳腺 *Defbl*/ β -actin 电泳条带密度扫描结果 (n=6)

组别	<i>Defbl</i> / β -actin (IOD)
泌乳 1 d	0.80 \pm 0.10 ^a
泌乳 6 d	0.74 \pm 0.02 ^a
泌乳 12 d	0.49 \pm 0.08 ^b
泌乳 18 d	0.37 \pm 0.07 ^c

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 8 泌乳期小鼠乳腺中 *Defbl* 表达量变化趋势

3 讨论

小鼠 *Defbl* 前体分子由 69 个氨基酸残基组成, 包含信号肽、前导片段和成熟肽。成熟肽由 37 个氨基酸组成, 其分布广泛, 在许多组织中都有表达, 例如, 有研究报道, *Defbl* 基因在小鼠的生殖器官有表达, 而且子宫、卵巢含量要比睾丸多得多, 表明它在抵御雌性生殖道感染, 维持正常生殖道微生物环境的稳态及妊娠的成功方面起了至关重要的作用^[7]。但小鼠乳腺组织中 *Defbl* 基因的表达情况未见报道。本试验根据 GenBank 已公布的小鼠 *Defbl* 基因序列 (NM_007843) 设计引物, 克隆小鼠乳腺中 *Defbl* 基因。RT-PCR 产物经电泳检测, 在

277 bp 位置有预期大小的特异性扩增条带, 该产物经测序、比对, 显示为小鼠 *Defbl* 基因, 本研究成功克隆出小鼠 *Defbl* 片段。

利用 RT-PCR 法对 *Defbl* 基因的检测结果表明, 妊娠期 *Defbl* 的表达量呈上升趋势, 且各期差异显著, 而泌乳期却恰恰相反, 随着泌乳的进行, *Defbl* 的表达量逐渐降低, 在泌乳 18 d 时达到最低。从妊娠泌乳整个过程来看, *Defbl* 基因的表达呈现先上升后下降的趋势, 而在妊娠前后即妊娠 18 d, 泌乳 1 d 时表达量极高。李淑凤等^[9]研究发现, 雌二醇对蒙古绵羊生殖道 *Defbl* 基因相对表达量有促进作用, 体外试验表明, 当雌激素接近于机体的生理状态时, *Defbl* 基因的相对表达量与激素的变化基本呈正相关。而雌二醇在准备受精、妊娠期间大量分泌, 能够促进 *Defbl* 基因表达量的增加, 由此推测出 *Defbl* 在增加乳腺抵抗力以及保证怀孕过程的顺利完成过程中发挥重要作用。尤其是在敏感的围产期, *Defbl* 表达量极高, 说明 *Defbl* 可能在这一时期发挥重要的作用。提示 *Defbl* 在泌乳期对小鼠乳腺免疫具有一定的调节作用。在泌乳早期乳腺中 *Defbl* 表达量极高, 推测 *Defbl* 在仔鼠早期免疫中发挥重要功能。

参考文献:

- [1] Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland[J]. Vet Res, 2006, 37: 369-400.
- [2] Diamond G, Zasloff M, Eck H, et al. Tracheal anti-microbial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88: 3952-3956.

- [3] Ganz T, Cowland J B, Liu L. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/poly peptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors[J]. *Immunol*, 2003, 170: 5583-5589.
- [4] Bals R, Goldman M J, Wilson J M. Mouse beta-defensin is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract[J]. *Infect Immun*, 1998, 63(3): 1225-1232.
- [5] Befus A D, Mowat C, Gilchrist M, *et al*. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells; mechanisms of action[J]. *Immunol*, 2003, 163(2): 947-953.
- [6] Mandal M, Jagannadham M V, Nagaraj R. Antibacterial activities and conformations of bovine beta-defensin BNBD-12 and analogs: structural and disulfide bridge requirements for activity[J]. *Centre for Cellular and Molecular Biology*, 2003, 23(3): 413-418.
- [7] Sang Y S, Ramanathan B, Ross C R, *et al*. Gene Silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in β -defensin-1 expression [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 7133-7141.
- [9] 李淑凤, 曹贵方, 宋艳华, 等. 雌二醇对蒙古绵羊输卵管上皮细胞内 防御素(sBD-1)表达的影响[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(4): 41-47.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km=千米, m=米, cm=厘米, mm=毫米; 换算: 1 km=1 000 m, 1 m=100 cm, 1 cm=10 mm
- 2 重量单位: t=吨或 1 000 kg, kg=千克, g=克, mg=毫克; 换算: 1 t=1 000 kg, 1 kg=1 000 g, 1 g=1 000 mg
- 3 面积单位: m^2 =平方米, hm^2 =公顷, cm^2 =平方厘米; 换算: 1 hm^2 =10 000 m^2
- 4 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d、h、min、s”表示

(本刊编辑部)