

奶牛围产期外周血 T 淋巴细胞亚群动态及细胞因子 IL-2、IL-4 基因转录水平分析

崔群维¹, 郭 宁¹, 周 璇¹, 王振云¹, 王雅春^{2*}, 王根林^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; 2. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193)

摘 要: 通过检测奶牛 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞亚群的动态及细胞因子 IL-2、IL-4 在分娩前后 21 d 内的基因转录水平的变化, 以探讨此阶段奶牛免疫机能受损的机理。应用流式细胞术检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞亚群的动态变化及实时荧光定量检测细胞因子 IL-2、IL-4 mRNA 的表达量。结果表明: 血液中 CD3⁺ 淋巴细胞的比例在产前 21 d 内占 (50.8±4.61)%, 产后 14 d 内降低到 (39.21±4.98)%, 两者差异极显著 ($P<0.01$); CD4⁺ 淋巴细胞在产前 21 d 内保持较高水平, 达 (21.38±0.65)%, 产后 21 d 内维持在 (6.89±0.32)% 的较低水平, 且与产前差异显著 ($P<0.05$); CD8⁺ 淋巴细胞的比例在产犊前逐渐升高, 到产犊时达到最高水平 (16.90±2.02)%, 差异显著 ($P<0.05$); CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞的比率在产前 >1, 产后 <1。IL-2 mRNA 的表达量在产后 0~14 d 内下调, 之后上升。IL-4 mRNA 的表达量分娩时期达到最高, 随后下降, 至第 7 天降到最低。奶牛在围产期阶段尤其是分娩前后 14 d 内机体处于免疫抑制状态, 可能是由于自身的 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的亚群的数量和比例发生改变及细胞因子 IL-2、IL-4 mRNA 表达量下调引起的。

关键词: 淋巴细胞亚群; 细胞因子; 免疫抑制; 实时荧光定量

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)11-1615-05

Analysis on the Dynamic Changes of Lymphocyte Subsets and Genetic Transcription of Cytokine IL-2, IL-4 in Peripheral Blood of Dairy Cows during Perpartum

CUI Qun-wei¹, GUO Ning¹, ZHOU Xuan¹, WANG Zhen-yun¹, WANG Ya-chun^{2*}, WANG Gen-lin^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To reveal the mechanism of impaired immune function in perpartum period, the dynamic changes of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in lymphocyte subsets as well as gene transcription level of cytokine IL-2 and IL-4 in peripheral blood of dairy cows during 21 days before calving to 21 days after it were investigated in the present study. The dynamic changes of Lymphocyte cells CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and the mRNA expression of cytokine IL-2, IL-4 in peripheral blood were determined by flow cytometry and RT-PCR respectively. The results showed that significant difference was found in the proportion of CD3⁺ in peripheral blood 21 days before calving (50.8±4.61)% and 14 days after calving (39.21±4.98)%, and also was found in the proportion of CD4⁺ in blood before (21.38±0.65)% and after (6.89±0.32)% calving. The proportion of CD8⁺ increased to the highest level (16.9±2.02)% during calving ($P<0.05$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ was >1 before calving, and <1 after calving. The mRNA expression of IL-2 was the lowest ($P<0.05$)

收稿日期: 2011-03-12

基金项目: 科技部“十一五”科技支撑计划(2006BAD04A12); 江苏省科技支撑计划(BE2008306-2); “十二五”国家科技计划课题(2011BAD28B02); 江苏省农业三新工程课题(SX2011-189)

作者简介: 崔群维(1983-), 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事动物生殖生理调控研究; E-mail: 2008205009@njau.edu.cn; Tel: 13115005155

* 通讯作者: 王根林, 教授, E-mail: glwang@njau.edu.cn; 王雅春, 副教授, E-mail: wangyachun@cau.edu.cn

during 0-14 days after calving, then gradually increased. The mRNA expression of IL-4 increased to the peak during calving, and declined to the lowest level on the 7th day ($P < 0.01$). It was suggested that the immune function of dairy cows was impaired within 21 days before and after calving, especially during the 0-14 days after calving. This might be caused by the quantity and ratio changes of lymphocyte subsets ($CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$) and the down-regulation of the cytokine IL-2, IL-4 during this critical period.

Key words: lymphocyte subsets; cytokine; immune function impaired; RT-PCR

奶牛围产期期间发生免疫抑制,造成机体对病原菌识别和抵抗能力的降低,进而容易感染病原菌,诱发各种疾病^[1-3]。T 细胞亚群是机体重要的免疫群体,其数量或组成比例的变化会影响到机体的免疫状态^[4]。 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 是 T 细胞亚群表面的主要标记和复合受体。 $CD3^+$ 主要与 T cell receptor (TCR) 形成复合体用于 T 细胞信号转导; $CD4^+$ 分布于辅助性 T 细胞亚群,配体为 MHC-II; $CD8^+$ 是杀伤性 T 细胞亚群,配体为 MHC-I。感染、免疫和应激等都可引起奶牛的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 亚群的变化^[5]。 $CD4^+/CD8^+$ 已经作为机体免疫能力的重要指标。KIMURA 等 1999 年对娟姗牛的研究发现,在血液中 $CD4^+/CD8^+$ 比值在产前与产后存在较大的变化,以此说明机体的免疫状态在产前后存在一定的变化^[6]。鉴于以往研究已证明在病原菌感染期间奶牛机体外周血液的淋巴细胞的亚群,尤其是 T 细胞亚群发生变化而引起自身免疫功能的变化^[7],因此笔者推断奶牛围产期阶段自身免疫功能下降可能亦与其 T 细胞亚群发生改变有关。

细胞因子对于机体的免疫调节至关重要。Interleukin 2 (IL-2) 由激活的 T 细胞产生,主要能促进 T 细胞的增殖、产生细胞因子、Natural killer cell (NK) 细胞的活化。Interleukin 4 (IL-4) 由 T 细胞产生,主要促进 B 细胞的增殖和分化^[8]。IL-2 和 IL-4 表达量的高低直接影响到机体的免疫状态,故可通过研究 IL-2、IL-4 基因在此阶段的表达情况进一步说明机体的免疫状态。

本研究通过检测奶牛 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞亚群动态以及细胞因子 IL-2、IL-4 基因在分娩前后 21 d 内的转录表达变化,以期探讨该阶段奶牛免疫机能受损的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究挑选 48 头、3~4 胎次产犊前后 21 d 内

的健康中国荷斯坦奶牛。所有奶牛来自同一牛场,饲养管理条件一致。通过尾静脉采集 10 mL 血液,肝素钠抗凝。牛群共分为 8 组,每组 6 头(-21、-14、-7、0、7、14、21、140 d),“0”d 代表产犊日,“-”代表产前。140 d 奶牛为实时荧光定量 RT-PCR 的对照组。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测奶牛外周血淋巴细胞 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的表达 FITC- $CD3$ 、PE- $CD4$ 检测方法:50 μ L 血液中加入 50 μ L 荧光标记抗体 (FITC- $CD3$ 、PE- $CD4$),室温避光孵育 15 min,再加入 150 μ L 溶血素,溶血至清亮透明。1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min,弃上清,加 PBS 重悬,重复一次。最后加入 150 μ L PBS 重悬,上机检测。FITC- $CD3$ 、PE- $CD8$ 检测方法同前。

1.2.2 RNA 提取及 RT-PCR 检测奶牛外周血淋巴细胞中 IL-2、IL-4 mRNA 的表达 取 1.5 mL 抗凝血,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,分离的淋巴细胞用 TRIzol 试剂盒提取 RNA,用 DNA I 酶处理提取的 RNA 以免存在 DNA 污染。用生物分光光度计测定 RNA 浓度, TaKaRa 试剂盒反转录为 cDNA。反应体系:RNA 1 μ g; 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 4 μ L, 反转录 10 \times buffer 2 μ L, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP mixture 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, AMV 反转录酶 15 U (TaKaRa 公司),随机引物 0.5 μ g, 补充双蒸水到 20 μ L。反应条件:42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 之后于冰水中冷却,20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

在 ABI 7300 仪器上进行荧光实时定量反应。实时定量程序如下:1 μ L cDNA; 10 μ L 2 \times SYBR premix Ex Taq (TaKaRa 公司); 0.4 μ L 50 \times Rox Dye; 每种引物 10 pmol; 双蒸水加至 20 μ L。反应程序:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 系统自带熔解曲线程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 每个样本设 3 个重复,同时设无模板阴性对

照。引物见表 1,以 β -actin 作为内参^[9],用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算 IL-2、IL-4 mRNA 的表达量。

用分别对应的 β actin 基因表达量进行校正目的基因表达强度,即 ΔCt 为目的基因相对于内参基因的表达强度 $-Ct = CT(\text{目的基因}) - CT(\beta ac-$

tin 基因),将围产期阶段的目的基因相对于产奶中期的表达差异倍数用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算: $-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct \text{ 围产期} - \Delta Ct \text{ 泌乳中期})$ 。 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 目的基因表达上调,反之下调。

表 1 扩增 IL-2、IL-4、 β -actin mRNA 基因引物

Table 1 Primers used in RT-PCR assay for cow IL-2, IL-4 and β -actin genes

基因 Gene	GenBank No.	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度/°C Temperature
IL-2	M12791	GAAAGTTAAAAATCCTGAGAACCTCAA	61
		GCGTTAACCTTGGGCACGTA	61
IL-4	M77120	AGGAGCCACACGT GCTTGA	61
		TTGCCAAGCTGTTGAGATTCC	61
β actin	AY141970	TCCAGCC TTCCTTCTGGGCAT	61
		GGACAGCACCGTGTGGCGTAGA	61

1.2.3 统计分析 试验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 代表差异水平显著,用 Spss16.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺在不同阶段的数量和比例

如表 2 所示,血液中 CD3⁺ 阳性细胞产前与产

后 14 d 内差异显著 ($P < 0.05$),产前 21 d 为 $49.32\% \pm 1.02\%$,产后 14 d 降低到 $39.21\% \pm 4.98\%$ 。CD4⁺ 在产前 21 d 与产后 21 d 差异极显著 ($P < 0.05$),产后 20 d 处于较低水平,CD8⁺ 在分娩后达到最高,比例为 $16.9\% \pm 2.02\%$,之后逐渐降低。产前 21 d 内 CD4⁺/CD8⁺ > 1 维持在较高水平,产后 21 d 内 CD4⁺/CD8⁺ < 1 处于较低水平。

表 2 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺围产期的表达水平

Table 2 The statistical analysis of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ at different period

时期 Period/d	CD3 ⁺ %	CD4 ⁺ %	CD8 ⁺ %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
-21	49.32 ± 1.02 ^a	20.60 ± 0.33 ^a	9.14 ± 0.77 ^a	2.25 ± 0.72 ^a
-14	52.86 ± 4.31 ^a	21.75 ± 0.42 ^a	10.08 ± 0.86 ^a	2.00 ± 0.57 ^a
-7	50.32 ± 3.14 ^a	21.14 ± 0.54 ^a	13.37 ± 0.74 ^b	1.60 ± 0.33 ^b
0	30.52 ± 2.34 ^b	22.05 ± 0.02 ^a	16.90 ± 2.02 ^d	1.30 ± 0.24 ^b
7	31.10 ± 3.28 ^b	7.67 ± 0.23 ^b	13.45 ± 2.30 ^b	0.50 ± 0.11 ^c
14	39.21 ± 4.98 ^b	7.51 ± 0.33 ^b	16.00 ± 2.32 ^c	0.40 ± 0.13 ^c
21	58.54 ± 4.32 ^a	5.50 ± 0.43 ^b	8.10 ± 0.43 ^a	0.80 ± 0.09 ^c

同列上肩标不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Values with different superscripts in each column are those that differ significantly ($P < 0.05$)

2.2 IL-2、IL-4 的荧光定量分析

如(图 1)所示,IL-2 基因 mRNA 的表达量在产

前变化不显著,产后的 14 d 内的基因表达量降低显著,在产后 7 d 时候最低,随后逐渐升高,产前与产

后 14 d 内表达量差异显著 ($P < 0.05$)。IL-4 基因的产前 14 d mRNA 的表达量逐渐增高,至分娩时达最高。产后迅速降低,产后 7 d 达到最低水平,之后逐渐升高(图 2)。

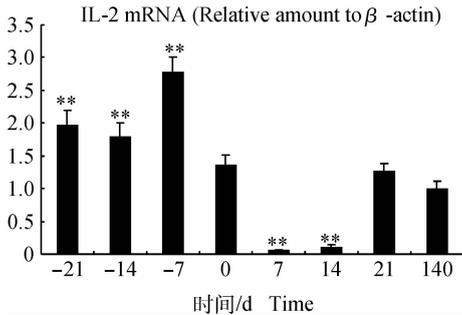


图 1 IL-2 mRNA 在 -21~21d 内的表达量

Fig. 1 Changes of IL-2 mRNA level during 21 days before calving to 21 days after it

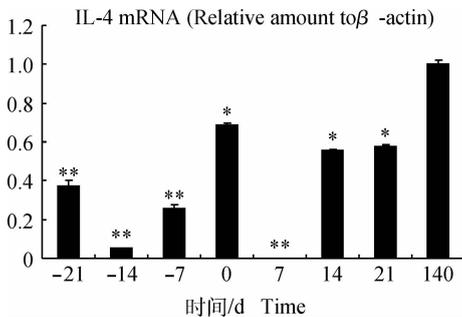


图 2 IL-4 mRNA 在 -21~21d 内的表达量

Fig. 2 Changes of IL-4 mRNA level during 21 days before calving to 21 days after it

3 讨论

3.1 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞数量和比例的变化

T 淋巴细胞亚群是机体最重要的免疫细胞群,在正常机体内各 T 淋巴细胞亚群相互作用,维持着机体的免疫功能。T 淋巴细胞亚群中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞对机体细胞免疫和体液免疫发挥着重要的调节作用。CD3 主要与 TCR 形成 TCR-CD3 复合物,作为 T 细胞识别抗原和转导信号的主要单位,CD3 转导 T 细胞活化的第一信号。CD4、CD8 是 T 细胞表面重要的抗原分子, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞的数量和适当的比例是免疫调节的中枢, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 相互调节,能表现辅助和抑制的作用是免疫系统的核心。当不同的细胞亚群数量和比例发生异常时,就可导致机体免疫功能紊乱。以往研

究在围产期阶段奶牛乳腺与血液中的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的数量发生变化^[10-11],但主要围绕产后 20~60 d 进行了研究。

本研究发现(表 2) $CD4^+$ 在产前 21 d 内保持较高水平,产犊前期 21 d 内差异不显著 ($P > 0.05$),产后 21 d 内,维持在较低水平,与产前差异极显著 ($P < 0.01$)。这可能是由于此阶段血液的参数发生变化引起的,如淋巴细胞数量减少^[12]。

$CD8^+$ 作为杀伤性分子,其比例在产犊时达到最高水平,在产后 14 d 内处于水平表达较低(表 2),说明在产后 14 d 内机体抵御能力处于低水平,可能是导致机体此阶段免疫抑制的原因之一。这与 Kampen 等的研究也基本一致^[10]。

$CD4^+$ / $CD8^+$ 已经作为机体免疫功能的重要指标。Kampen 等研究发现在围产期阶段 $CD4^+$ / $CD8^+$ 的比率不发生变化^[10],但 Kimura 等却发现产前产后存在较大的变化^[6]。而本研究中 $CD4^+$ / $CD8^+$ 的比值产后 21 d 内均维持在较低水平 ($CD4^+$ / $CD8^+$ < 1) 与产前 21 d 内差异显著,可能是机体产后内分泌紊乱引起的。产后 $CD4^+$ / $CD8^+$ 的比值较低,也进一步解释此阶段感染病原菌的原因。

3.2 IL-2、IL-4 mRNA 在围产期的变化情况

IL-2、IL-4 是机体 T 细胞自分泌和 B 细胞旁分泌的重要免疫因子。IL-2 主要促使初始 $CD4^+$ T 细胞分化成 help T cell 1 (Th1),能使 T 细胞增殖和产生细胞因子,IL-2 的表达量也反映 T 细胞激活数量。IL-4 由 T 细胞产生,促使初始 $CD4^+$ T 细胞分化成 help T cell 2 (Th2) 细胞^[13]。

奶牛机体的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 亚群数量发生变化,诱导相应细胞因子表达发生改变。本研究发现 IL-2 mRNA 的表达量在产后 14 d 内显著降低,而 IL-4 却在产后第 7 天降至最低(图 2),14 d 后显著升高,这与 Asai 等^[14] 研究的结果相近。IL-2 表达量的变化规律与 $CD4^+$ 的变化规律基本一致(表 2,图 1),说明 IL-2 mRNA 表达量与 $CD4^+$ 的表达降低有关。IL-4 mRNA 表达量在产后第 7 天显著降低,可能与此时 T 细胞数减少有关。因此细胞因子表达量降低可能导致 T 细胞与 B 细胞的增殖延缓,进而影响机体的免疫功能。

4 结论

综上所述,奶牛在围产期阶段尤其是分娩前后 14 d 内机体处于免疫抑制状态,可能是由于自身的

T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 数量和比例发生改变以及细胞因子 IL-2、IL-4 mRNA 表达量下调引起的。

参考文献:

- [1] KREMER W D, NOORDHUIZEN-STASSE E N, GROMMERS F J, et al. Blood polymorphonuclear leukocyte chemotaxis during experimental *Escherichia coli* bovine mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76 (9): 2613-2618.
- [2] KREMER W D, NOORDHUIZEN-STASSE E N, GROMMERS F J, et al. Preinfection chemotactic response of blood PMN to predict severity of *Escherichia coli* mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76 (6): 1568-1574.
- [3] KEHRLI M E J R, HARP J A. Immunity in the mammary gland [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2001, 17 (3): 495-516.
- [4] KEHRLI M E JR, NONNECKE B J, ROTH J A. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period [J]. *Am J Vet Res*, 1989, 50 (2): 215-220.
- [5] LOVING M, MAGNUSSON U. Sows intramammarily inoculated with *Escherichia coli* at parturition II. Effect on the densities of MHC class II⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in the mammary gland [J]. *Vet Immunol Immunopatho*, 2002, 90 (1-2): 45-54.
- [6] KIMURA K, GOFF J P, KEHRLI M E JR, et al. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82 (2): 315-319.
- [7] KARCHER E L, BEITZ D C, STABLE J R. Parturition invokes changes in peripheral blood mononuclear cell populations in Holstein dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* [J]. *Vet Immuno Immunopatho*, 2008, 124 (1-2): 50-62.
- [8] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 89-96.
- [9] MADSEN S A, WEBER P S, BURTON J L. Altered blood neutrophil gene expression in periparturient dairy cows [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 86 (3-4): 159-175.
- [10] KAMPEN C V, MALLARD B A. Effects of peripartum stress and disease on bovine lymphocyte subsets [J]. *Vet Immunol Immunopatho*, 1997, 59 (1-2): 79-92.
- [11] PARK Y H, FOX L K, HAMILTON M J, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation [J]. *J Dairy Sci*, 1992, 75 (4): 998-1006.
- [12] MEGLIA G E, JOHANNISSON A, PETERSSON L, et al. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows [J]. *Acta Vet Scand*, 2001, 42 (1): 139-150.
- [13] TANAKA S, ASO H, MIYAZAWA K, et al. Differential cytokine gene expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets of calves [J]. *Vet Immuno Immunopatho*, 2007, 118 (1-2): 84-91.
- [14] ASAI K, KAI K, RIKIISHI H, et al. Variation in CD4 T and CD8 T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods [J]. *Vet Immunol Immunopatho*, 1998, 65 (1): 51-61.

(编辑 白永平)