

Galectin - 2基因在断乳仔猪胃肠道组织的表达研究

孙娅莉¹, 韩立强¹, 常磊¹, 谢家喜¹, 王月影¹, 李宏基¹, 杨国宇^{2*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 农业部动物生长发育调控重点开放实验室, 河南 郑州 450002)

摘要:从仔猪的十二指肠组织中克隆 *Galectin - 2* 基因, 研究 *Galectin - 2* 在仔猪不同组织中的分布情况, 并采用荧光定量 PCR 检测仔猪断奶前后其在胃肠道组织的表达差异情况; 结果表明: 克隆的猪 *Galectin - 2* 基因序列被 GenBank 收录 (收录号: FJ424704), 其主要在胃肠道组织中表达, 与断乳前相比, 在断乳后 *Galectin - 2* 的 mRNA 表达在胃、回肠、结肠组织显著上调 ($P < 0.05$), 而在十二指肠、空肠和盲肠中的表达与对照组相比差异不显著。

关键词: 断乳; *Galectin - 2*; 克隆; 胃肠道; 荧光实时定量; 仔猪

中图分类号: S852.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)02 - 0219 - 04

MRNA Expression of Galectin - 2 in the Gastrointestinal Tract of Pre and Post - weaning

SUN Ya-li¹, HAN Li-qiang¹, CHANG Lei¹, XIE Jia-xi¹,
WANG Yue-ying¹, LI Hong-ji¹, YANG Guo-yu^{2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Animal Growth and Development, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The coding sequence of *Galectin - 2* was cloned from the duodenum tissue of piglet. The gene expression of *Galectin - 2* was amplified by RT - PCR in various piglet tissues. The fold changes of *Galectin - 2* mRNA were determined by Realtime PCR and the differences in the expression between the pre - weaning piglets' gastrointestinal tract and that of the post - weaning ones were compared. The result showed that the full length of *Galectin - 2* was 532 bp, and accepted by GenBank (Accession: FJ424704). *Galectin - 2* was intensely expressed in gastrointestinal tract and the *Galectin - 2* mRNA expression was significantly raised in gaster, ileum and colon after weaning ($P < 0.05$).

Key words: weaning; *Galectin - 2*; clone; gastrointestinal tract; Realtime PCR; piglets

生物体中 50% 以上的蛋白质都是糖蛋白, 糖结构的多样化可能导致蛋白质功能的多样化, 这在生命科学中具有重要意义, 而凝集素因其能选择性识别糖结构并与其非共价结合, 从而引起了国内外研究者的兴趣。凝集素根据来源可分为微生物凝集素、植物凝集素和动物凝集素^[1]。半乳糖凝集素 (*Galectins*)

收稿日期: 2009 - 11 - 30 修回日期: 2010 - 03 - 04

基金项目: 河南省重大科技攻关项目 (0522010800)

作者简介: 孙娅莉 (1983 -), 硕士, 主要从事动物生理生化研究, E-mail: changchang198@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 杨国宇, 教授, 博士, E-mail: haubiochen@163.com.

作为动物凝集素的一员,在细胞黏附、凋亡,机体的炎症反应,免疫调节以及肿瘤的转移等生理和病理过程中发挥重要作用^[2],受到生物学家和免疫学家的关注。

仔猪早期断奶由于受到生理、营养和环境的突然改变,加上消化道发育不完善,容易引起“早期断奶综合症”,表现为采食量下降、生长受阻、腹泻,其中一个主要原因是仔猪免疫力差导致对胃肠道疾病特别敏感。研究发现,*Galectins*可以与胃、肠黏膜上的黏蛋白和上皮表面的多糖蛋白复合物结合,形成的复合物可使上皮表面耐受腔内物质,如胃酸、消化酶和外源微生物的破坏^[3]。因此在仔猪断乳过程中,半乳糖凝集素可能对断奶后仔猪的消化生理、胃肠道环境和免疫状态的变化起到一定的作用。Paclik等^[4]人研究显示 *Galectin - 2* 主要在肠上皮细胞区室表达,与固有层的单核细胞结合,但关于猪 *Galectins* 的报道几乎很少见,因此本实验选择 *Galectins* 家族中的一员 *Galectin - 2*,从仔猪组织中克隆了 *Galectin - 2* 基因,并研究了断奶前后其在胃肠道组织的表达差异,为深入研究动物凝集素在仔猪断乳应激过程中的作用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织来源 随机选取健康断乳仔猪,颈部放血处死,分别取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、盲肠和肠淋巴结组织;以 28 日龄为断乳时间,选择断乳前和断乳后各 7 d 的仔猪各 3 头,颈部放血处死,分别取胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠,经 PBS 液处理。将所有组织放入液氮速冻,置 -80 的超低温冰箱保存。实验样本来自郑州新大牧业有限公司提供的大白和长白杂交的二元健康仔猪。

1.1.2 主要试剂 PureYield™ RNA Midiprep System (购自 Promega, USA); dNTP - mix (购自 Tiangen, Beijing); Trizol (购自 Invitrogen, USA); oligo (dT)₁₅ (购自 Tiangen, Beijing); M - MLV Reverse Transcriptase (购自 Promega, USA), Rnase - Inhibitor (购自 Promega, Shanghai); 2 × Taq DNA Master Mix (购自 Tiangen, Beijing); pMD19 - T vector (购自 TakaRa, Dalian); Agaoase Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 (购自 TakaRa, Dalian); 2 × SYBR real - time PCR premixture (购自 B ioteke, Beijing)。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因的克隆 以报道的哺乳动物 *Galectin - 2* 基因序列对猪 ESTs 库和 UniGene 进行搜索,利用搜索的 ESTs 拼接序列设计 1 对特异性克隆引物:上游:5' - AGAGCTGTCGTGAGGAGTTG - 3'; 下游:5' - AGGAACAGCAGGTAGGAACC - 3'。取断乳 7 d 健康仔猪十二指肠组织 0.1 g,采用 Trizol 法提取总 RNA,分光光度计 ND - 1000 检测总 RNA 的浓度和纯度。使用 M - MLV 反转录酶反转录得到 cDNA,以此为模板进行 PCR 扩增,95 预变性 5 min,然后 95 变性 30 s,58 退火 30 s,72 延伸 40 s,循环 35 圈,最后 72 延伸 10 min。扩增产物用 TakaRa Agaoase Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 进行纯化后连接到 pMD19 - T 载体上,转化到 DH5 感受态细胞。由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.2 *Galectin - 2* 的组织分布 采用 Trizol 法提取健康断乳仔猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、肠淋巴结、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和盲肠等 15 个组织的 RNA,使用 M - MLV 反转录酶反转录得到 cDNA。根据克隆出的 *Galectin - 2* 基因序列设计 1 对定量引物,上游:5' - AGATCGATGATGACGCTGATGGCT - 3'; 下游:5' - ACAATGACTGCTCCTGCTCCT - 3'。同时选取 *RPL4* 作为内参,根据 GenBank 中猪的 *RPL4* (登录号: DQ845176) 基因序列设计 1 对特异性引物,上游:5' - CAAGGTAACCTACAACCTTC - 3'; 下游:5' - GAACTCTACGATGAATCTTC - 3',采用 RT - PCR 方法,分析 *Galectin - 2* 在各组织的表达情况。

1.2.3 荧光实时定量 PCR 分析仔猪断奶前后 *Galectin - 2* 在胃肠道组织的表达差异 (1) 总 RNA 的提取和逆转录反应。分别取断乳前 7 d 和断乳后 7 d 健康仔猪的胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和盲肠组织各约 300 mg,按 PureYield™ RNA Midiprep System 说明书分别提取总 RNA, Nuclease - Free Water 溶解总 RNA,分光光度计 ND - 1000 检测总 RNA 的浓度和纯度。使用 M - MLV 反转录酶反转录得到 cDNA。

(2) 绘制标准曲线。将得到的 cDNA 样品混合后进行 10 倍的梯度稀释, 使用含有 10^{-1} 倍、 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍、 10^{-4} 倍和 10^{-5} 倍 DNA 原液的稀释液作为反应模板进行目的基因和内参基因的荧光定量 PCR, 反应结束后根据 C_t 值计算标准曲线斜率 (SLOPE) 和相关系数, 并计算扩增效率 $E = 10^{- (1/SLOPE)}$, 根据溶解曲线判断产物特异性。

(3) SYBR 荧光实时定量 PCR。将未断乳和断乳仔猪的胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和盲肠组织的 cDNA 作为实时荧光定量 PCR 的反应模板, 每个样品均作复孔以减少操作误差, 每个样品均有内参基因 *RPL4* 作为对照。实时荧光定量 PCR 通过 Mastercycler ep Realplex (ependorf) 仪器运行 PCR, 反应体系: SYBR Green Mix 10 μ L、上下游引物各 0.25 μ L (10 pmol/ μ L), cDNA 2 μ L, Nuclease - Free Water 7.5 μ L, 反应程序: 95 1 min (预变性) 后进入循环, 95 20 s (变性), 60 20 s (退火), 72 20 s (延伸), 重复 40 个循环, 设置在延伸阶段收集荧光信号。扩增完毕后, 进行溶解曲线分析以确定扩增产物的特异性, 温度从 60 缓慢递增至 95, 连续测定样品的荧光强度以获取溶解曲线。

(4) 定量 PCR 数据分析^[5-6]。以 *RPL4* 基因为内参 (reference), 以断乳前仔猪组织的 mRNA 表达量作为对照组, 通过公式对断乳后仔猪样品组织中 *Galectin - 2* 相对表达量进行计算: $Ratio = E_{target}^{C_{t_{target}}(control - sample)} / E_{reference}^{C_{t_{ref}}(control - sample)}$, 其中 $Ratio$: mRNA 相对表达量; E_{target} : 目的基因扩增效率; $E_{reference}$: 内参基因扩增效率, $C_{t_{control}}$: 对照组的 C_t 值, $C_{t_{sample}}$: 样品组的 C_t 值。对 mRNA 相对表达量采用 SPSS11.5 统计软件分析处理, 组间差异比较用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 *Galectin - 2* 的克隆及序列分析

Galectin - 2 的 PCR 产物经 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 显示扩增到 1 个片段约 532 bp 的条带 (图 1), 与估计的目的基因位置相近。切胶回收后, 进行连接、转化、涂板、挑斑后, 进行阳性克隆筛选。送样测序得到 *Galectin - 2* 的基因序列。序列被 NCBI 收录, 接受号: FJ424704。

2.2 组织分布

取猪的 15 种组织: 心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、盲肠、子宫和肠淋巴结组织的 cDNA, 采用 RT-PCR 方法, 同时扩增 *RPL4* 和 *Galectin - 2*, 结果如图 2。由图可知, *Galectin - 2* 主要在仔猪胃肠道组织中有分布, 条带亮度较高, 而在脾、食管及脑等组织中未见表达。

2.3 仔猪断奶前后 *Galectin - 2* 的在胃肠道组织的表达差异

2.3.1 标准曲线 内参基因 *RPL4* 和目的基因 *GAL - 2* 的扩增效率分别为 $E_{reference} = 1.96$, $E_{target} = 1.66$, 标准曲线的相关系数在 0.98 以上, 反应良好, 所用引物可特异性扩增 DNA 序列, 经过 40 个循环后, 扩增产物的溶解温度均高于 80 (图 3, 图 4), 溶解曲线只有单一的尖锐峰, 表明各个产物特异性都很高, 经电泳检测, 大小与产物长度符合, 说明扩增反应符合定量要求。

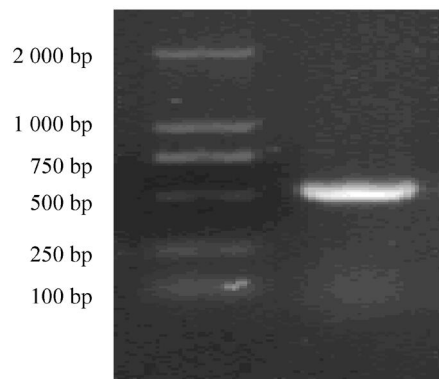
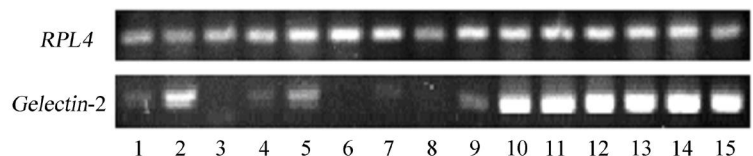


图 1 *Galectin - 2* 基因电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of amplified product of *Lan inaria japonica Galectin - 2* gene



1. 心; 2 肝; 3 脾; 4 肺; 5 肾; 6 大脑; 7 小脑; 8 食管; 9 肠淋巴结; 10 胃; 11 十二指肠; 12 空肠; 13 回肠; 14 盲肠; 15 结肠。

1. Heart; 2 Liver; 3 Spleen; 4 Lung; 5 Kidney; 6 The brain; 7 Cerebellum; 8 Esophagus; 9 Intestinal lymph nodes; 10 Stomach; 11 Duodenum; 12 Jejunum; 13 Ileum; 14 Caecum; 15 Colorectal

图 2 *Galectin - 2* 和 *RPL4* 基因在猪不同组织中的表达电泳结果

Fig 2 Electrophoresis analysis of in different tissues of the Porcine *Galectin - 2* and *RPL4*

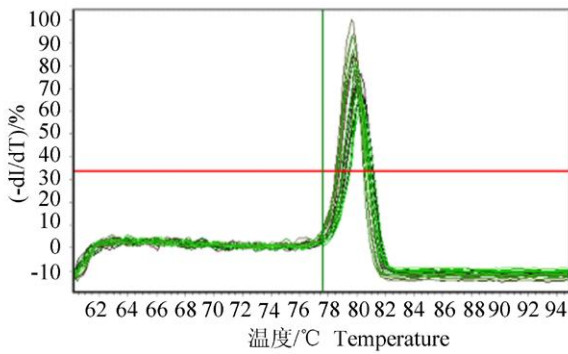


图 3 RPL4 熔解曲线图
Fig 3 RPL4 melting curve

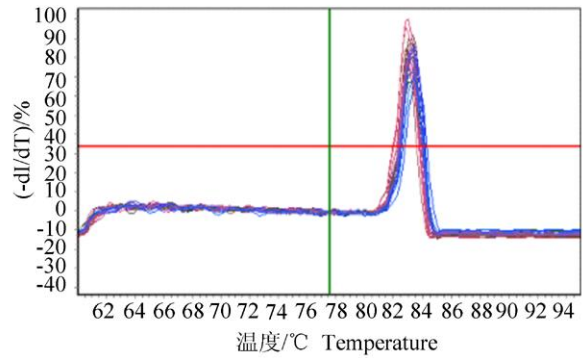


图 4 Galectin - 2 熔解曲线图
Fig 4 Galectin - 2 melting curve

2.3.2 断奶前后 Galectin - 2 的在胃肠道的表达差异 Galectin - 2 在断乳前和断乳后仔猪胃肠道基因的表达差异见图 5。由图 5 可知,与断乳前相比,在断乳后 Galectin - 2 的基因表达在胃组织上调了 24.28 倍 ($P=0.017$),在回肠上调了 1.87 倍 ($P=0.031$),在结肠上调了 1.38 倍 ($P=0.041$),而在十二指肠、空肠和盲肠的表达与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

Galectins 是动物凝集素的一种,又被称为 S 型凝集素^[7],因其含有特殊的保守氨基酸序列和对 α -半乳糖具有亲合性而得名。

Galectins 在很多生理和病理过程中扮演重要角色,比如细胞-细胞黏附、细胞生长调节、细胞的凋亡、炎症反应、免疫调节及肿瘤的转移等。研究表明, Galectins 可能是免疫细胞动态平衡的主要调整者^[8],可通过调节细胞的存活和信号,参与炎症性反应的动态平衡^[9-10]。

胃肠道是体内最大的免疫和内分泌器官,肠道形态结构的完整性是肠道一切功能正常发挥的基础。断乳后仔猪肠道易发生过敏反应,其结构和功能将发生损伤性变化,出现绒毛萎缩、隐窝增生,养分消化吸收障碍、腹泻。Junko 等^[11]利用原位杂交技术检测 Galectins 亚群在小鼠消化道的分布情况,结果发现 Galectin - 2, Galectin - 3, Galectin - 4/6, Galectin - 7 在消化道的高度表达, Paclik 等发现 Galectin - 2 能诱导肠上皮黏膜 T 细胞凋亡^[4], Ohtkae 等^[12]报道 Galectin - 2 是保护胃黏膜和维持其完整性的主要相关蛋白,但目前尚未见断乳应激对仔猪胃肠道组织中 Galectin - 2 的表达影响的报道。本试验的研究显示出断乳前后 Galectin - 2 在肠道组织表达量都比较高,表明其可能对仔猪胃肠道上皮细胞的稳态平衡、宿主菌之间的相互作用和黏膜免疫发挥着重要作用,但具体机制有待深入研究。

参考文献:

[1] 任声权. Galectin - 1 的生物学活性及其研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(2): 41 - 44.
 [2] Rabinovich G A. Galectin - 1 as a potential cancer target [J]. British Journal of Cancer, 2005, 92(7): 1188 - 1192.
 [3] Wasano K, Hirakawa Y. Recombinant Galectin - 1 recognizes mucin and epithelial cell surface glycocalyxes of gastrointestinal tract [J]. J Histochem Cytochem, 1997, 45(2): 275 - 283.
 [4] Paclik D, Bemdt U, Guzy C, et al. Galectin - 2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice [J]. J Mol Med, 2008, 86(12): 1395 - 1406.

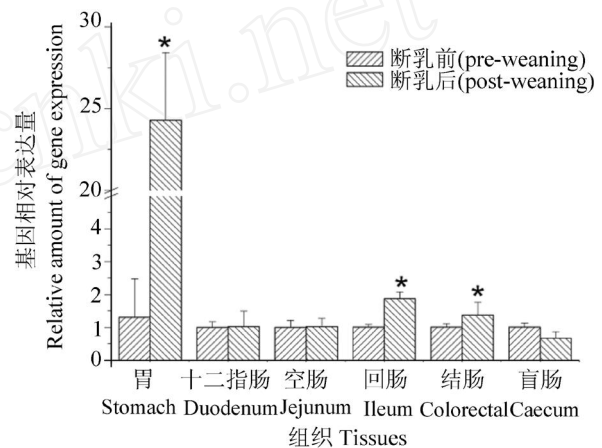


图 5 Galectin - 2 在断乳前后仔猪胃肠道组织的表达差异
Fig 5 The fold change of Galectin - 2 mRNA between pre - and post - weaning piglet gastrointestinal tract

- [6] 杨玉梁. 紫色糯性香米型水稻雄性不育系“玉紫 A”的选育 [J]. 江西农业大学学报, 2001, 23 (增刊): 14 - 16
- [7] 刘来福, 毛盛贤, 黄远樟. 作物数量遗传 [M]. 北京: 农业出版社, 1984: 250 - 262
- [8] 齐绍武, 盛孝邦. 籼型两系杂交水稻主要农艺性状配合力及遗传力分析 [J]. 杂交水稻, 2000, 15 (3): 38 - 41.
- [9] 廖伏明, 周坤炉, 盛孝邦, 等. 籼型三系杂交水稻主要农艺性状配合研究 [J]. 作物学报, 1999, 25 (5): 622 - 631.
- [10] 张利华, 王建军, 李旭晨, 等. 籼型三系杂交水稻主要农艺性状的配合力分析 [J]. 浙江农业学报, 2003, 15 (1): 1 - 7.
- [11] 朱镇, 赵凌, 宗寿余, 等. 籼型两系杂交水稻主要农艺性状的配合力分析 [J]. 江苏农业学报, 2004, 20 (4): 207 - 212.
- [12] 游年顺, 雷捷成, 黄利兴, 等. 杂交水稻配合力分析及高产地区组合选配的探讨 [J]. 福建稻麦科技, 1994, 12 (4): 11 - 17.
- [13] 粟学俊, 陈彩虹. 几个杂交水稻亲本配合力的测定 [J]. 广西农业科学, 2001 (1): 1 - 3.
- [14] 廖佩言. 水稻主要性状配合力的分析 [J]. 遗传, 1980, 2 (5): 22 - 24.
- [15] 吕建群, 陈林, 曾宪平. 7 个籼型新不育系和 7 个新恢复系的配合力及利用价值评价 [J]. 西南农业学报, 2009, 2 (1): 12 - 18.
- [16] 冯瑞光, 孟令启, 宁文书. 粳型光敏核不育系主要农艺性状的配合力及杂种优势 [J]. 华北农学报, 1997, 12 (4): 7 - 12.
- [17] 宋宇, 邹小云, 贺浩华, 等. 籼型三系杂交水稻产量及相关性状的配合力分析 [J]. 江西农业大学学报, 2004, 26 (5): 719 - 725.
- [18] 张名位, 彭仲明, 杜应琼. 特种稻米中微量元素铁、锌、锰的含量的配合力和稳定性分析 [J]. 中国水稻科学, 1996, 10 (4): 201 - 206.
- [19] 汪仁春. 粳型杂交水稻优势和配合力的初步研究 [J]. 浙江农业科学, 1981 (5): 205 - 212.
- [20] 徐静斐, 汪路应. 水稻杂种优势和配合力的初步研究 [J]. 遗传, 1980, 2 (2): 17 - 19.

(上接第 222 页)

- [5] Michael W P. A new mathematical model for relative quantification in real - time RT - PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29 (9): 2002 - 2007.
- [6] Vandesompele J, Katleen D P, Filip P. Accurate normalization of real - time quantitative RT - PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biology, 2002, 3 (7): 1 - 12.
- [7] Dodd R B, Drickamer K. Lectin - like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate - binding activity [J]. Glycobiology, 2001, 11 (5): 71 - 79.
- [8] Rabinovich G A, Baum L G, Tinari N, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response [J]. Trends in Immunology, 2002, 23 (6): 313 - 320.
- [9] Rossiter H, Alon R, Kupper T S. Selectins, T - cell rolling and inflammation [J]. Molecular Medical Today, 1997, 3 (5): 214 - 222.
- [10] Cooper D N W, Barondes S H. God must love galectins: he made so many of them [J]. Glycobiology, 1999, 9 (10): 979 - 984.
- [11] Junko Niio, Yasuhiko Kon, Toshihiko Iwanaga. Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2005, 53 (11): 1323 - 1334.
- [12] Ohtsuka K, Shimada N, Uchida H, et al. Approach for identification of protein S - nitrosation in mouse gastric mucosa treated with S - nitrosoglutathione [J]. J Proteomics, 2009, 2 (5): 750 - 760.