

引用格式:

宋云云, 孟江海, 刘丹, 曹斌, 赵越雯, 田燕涛, 陈韬. 胰腺再生蛋白III  $\gamma$  在猪小肠上皮细胞中的表达调控机理[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(2): 215–221.

SONG Y Y, MENG J H, LIU D, CAO B, ZHAO Y W, TIAN Y T, CHEN T. Expression regulation mechanism of the pancreatic regenerative protein III  $\gamma$  in porcine intestinal epithelial cells[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(2): 215–221.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 胰腺再生蛋白III $\gamma$ 在猪小肠上皮细胞中的表达调控机理

宋云云<sup>1,2</sup>, 孟江海<sup>1,2</sup>, 刘丹<sup>1,2</sup>, 曹斌<sup>1,2</sup>, 赵越雯<sup>1,2</sup>, 田燕涛<sup>1,2</sup>, 陈韬<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省兽药工程中心, 湖南 长沙 410311)

**摘 要:** 选取不同浓度( $0$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL)的灭活金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和不同质量浓度( $0.0$ 、 $0.1$ 、 $1.0$ 、 $10.0$   $\mu\text{g/mL}$ )的肽聚糖(PG)诱导猪小肠上皮细胞(IPEC-J2), 通过 qPCR 和免疫印迹试验, 检测 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平, 分析 RegIII $\gamma$  及 P65、P38、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)等的表达变化, 进一步探究 RegIII $\gamma$  表达调控的分子机理。结果表明: 灭活 *S. aureus* 和 PG 对 IPEC-J2 的细胞活力均有抑制作用; 与不添加灭活 *S. aureus* 处理相比, 添加灭活 *S. aureus* 可增加 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达, 且呈现剂量依赖性, 当灭活 *S. aureus* 浓度达到  $10^9$  cfu/mL 时, RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平极显著增加; 同样 PG 也能诱导 RegIII $\gamma$  蛋白的表达, 与不添加 PG 的处理相比, 添加  $1.0$   $\mu\text{g/mL}$  PG 时, RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白表达水平极显著升高; 与不添加灭活 *S. aureus* 或 PG 的处理相比, 添加  $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 或  $1.0$   $\mu\text{g/mL}$  PG 能显著或极显著提高 IPEC-J2 的 P65、P38、JNK、ERK 等蛋白的表达水平, 表明 RegIII $\gamma$  在 IPEC-J2 中的表达可能是由髓样分化初级应答蛋白(MyD88)下游的核转录因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 2 条信号通路途径所调控。

**关 键 词:** 胰腺再生蛋白III  $\gamma$ (RegIII $\gamma$ ); 金黄色葡萄球菌; 肽聚糖(PG); 核转录因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ ); 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK); 猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)

中图分类号: S828.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)02-0215-07

## Expression regulation mechanism of the pancreatic regenerative protein III $\gamma$ in porcine intestinal epithelial cells

SONG Yunyun<sup>1,2</sup>, MENG Jianghai<sup>1,2</sup>, LIU Dan<sup>1,2</sup>, CAO Bin<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuewen<sup>1,2</sup>, TIAN Yantao<sup>1,2</sup>, CHEN Tao<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Engineering Research Center of Veterinary Drugs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410311, China)

**Abstract:** A group of the concentrations of inactivated *Staphylococcus aureus*( $0$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  cfu/mL) and of peptidoglycan(PG)( $0.0$ ,  $0.1$ ,  $1.0$ ,  $10.0$   $\mu\text{g/mL}$ ) were selected to induce the expression of regenerating protein III  $\gamma$ (RegIII $\gamma$ ) in porcine intestinal epithelial cells(IPEC-J2). The levels of RegIII $\gamma$  mRNA and protein were detected by qPCR and western blot assay, and the expression variations of RegIII $\gamma$ , P65, P38, C-Jun amino terminal kinase(JNK) and extracellular regulatory protein kinase(ERK) were analyzed to further explore the molecular mechanism of RegIII $\gamma$  expression regulation. The results showed that both inactivated *S. aureus* and PG had inhibitory effects on cellular viability of IPEC-J2. In comparison to the treatment without inactivated *S. aureus*, the mRNA and protein expression

收稿日期: 2020-10-16

修回日期: 2022-04-05

基金项目: 湖南省教育厅项目(18A109)

作者简介: 宋云云(1997—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事动物肠道黏膜免疫分子生物学研究, 2607193821@qq.com; \*通信作者, 陈韬, 博士, 教授, 主要从事动物肠道黏膜免疫分子生物学研究, chentao\_114@163.com

levels of RegIII $\gamma$  was higher in the groups of inactivated *S. aureus* treatment and showed a dose-dependent trend, and the mRNA and protein expression levels were significantly increased when the concentration of inactivated *S. aureus* was  $10^9$  cfu/mL. Similarly, PG also induced the expression of RegIII $\gamma$ . Compared with the treatment without PG, the mRNA and protein expression levels of RegIII $\gamma$  were significantly higher when PG was 1.0  $\mu$ g/mL. The expression levels of P65, P38, JNK, and ERK in IPEC-J2 were significantly increased by adding  $10^9$  cfu/mL inactivated *S. aureus* or 1.0  $\mu$ g/mL PG, compared with that without adding inactivated *S. aureus* or PG. These results suggested that the expression of RegIII $\gamma$  in IPEC-J2 might be regulated by two signaling pathways: nuclear transcription factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase(MAPK) downstream of the primary myeloid differentiation response protein MyD88.

**Keywords:** regenerating protein III  $\gamma$ (RegIII $\gamma$ ); *Staphylococcus aureus*; peptidoglycan(PG); nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B); mitogen-activated protein kinase(MAPK); the intestinal porcine enterocyte cell line(IPEC-J2)

肠道是哺乳动物体内最大的免疫器官,其黏膜上皮细胞可产生多种抗菌蛋白(AMPs)家族,如防御素、溶菌酶、核糖核酸酶和 C 型凝集素等。属于 C 型凝集素中的胰腺再生蛋白 III  $\gamma$ (RegIII $\gamma$ )在小鼠和人的小肠中表达最为广泛,不仅能够选择性杀死致病细菌且对益生菌有益,参与机体的免疫调节,还可提高细胞活力,在肠道先天免疫系统中发挥着难以取代的重要功能<sup>[1]</sup>。肠道隐窝深处中的潘氏细胞及杯状细胞是 RegIII $\gamma$  表达的主要部位<sup>[2]</sup>。潘氏细胞在建立和维持肠道菌群<sup>[3]</sup>、保护宿主防御肠道致病细菌并为邻近的干细胞提供营养等方面有重要作用<sup>[4]</sup>。潘氏细胞主要分泌的是 RegIII $\alpha$ <sup>[5]</sup>,小鼠体内主要分泌的是 RegIII $\gamma$ <sup>[6]</sup>,它们能作用于细菌表面肽聚糖(PG),瓦解细菌细胞壁的结构,使细胞质泄漏,最终导致细菌死亡<sup>[7]</sup>。研究表明,当敲除小鼠 RegIII $\gamma$  蛋白后,肠道更易患炎症性疾病<sup>[8]</sup>,而当无菌小鼠肠道 RegIII $\gamma$  的表达量较低时,益生菌的定植能明显增加 RegIII $\gamma$  蛋白的表达量,且机体炎症得到缓解<sup>[9]</sup>。Reg 蛋白在机体受到损伤或受微生物刺激后会大量表达,但其表达调控的机理并不明确。VAISHNAVA 等<sup>[10]</sup>研究发现,髓样分化初级应答蛋白(MyD88)作为连接几种 Toll 样受体(TLRs)的衔接蛋白之一,能够控制潘氏细胞 RegIII $\gamma$  蛋白的表达,小鼠体内缺乏 MyD88 时,RegIII $\gamma$  的表达量明显降低,表明了肠上皮的 TLR-MyD88 信号通路刺激 RegIII $\gamma$  蛋白的表达<sup>[11]</sup>; KINNEBREW 等<sup>[12]</sup>证明了细菌鞭毛蛋白通过白细胞介素 22(IL-22)能有效诱导肠上皮细胞和潘氏细胞 RegIII $\gamma$  蛋白的稳定表达。可见,MyD88 和 IL-22 这 2 种信号分子在 RegIII $\gamma$  蛋白的表达调控方式中十分关键。

核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路在调节机体的免疫系统、控制细胞的增殖和分化中至关重要,其

中在调节机体慢性炎症和自身免疫性疾病中扮演着不可或缺的角色<sup>[13]</sup>。DOU 等<sup>[14]</sup>在探究宿主防御肽(HDPs)的表达调控机制时发现,该蛋白的表达主要通过 NF- $\kappa$ B 途径的激活。LU 等<sup>[15]</sup>在患有严重皮炎的小鼠中发现 MyD88 下游信号通路 NF- $\kappa$ B 的激活,减轻了小鼠体内的炎症症状。CUENDA 等<sup>[16]</sup>发现丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路参与各种细胞内其他的信号传导途径,控制细胞的各个环节,包括生长、分化和应激反应,同时在癌症发展中也起着关键作用。MAP3K $\rightarrow$ MAPKK $\rightarrow$ MAPK 是 MAPK 链在传递机体细胞之间信号的重要蛋白激酶,c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)和 P38 是其中主要的 3 种蛋白激酶<sup>[17]</sup>。

近年来 RegIII $\gamma$  的相关研究大多集中于小鼠、大鼠和人类,而有关猪的 RegIII $\gamma$  鲜有研究,尤其是关于其表达调控的分子机理研究。经过前期大量的文献查阅及试验准备,笔者选取不同浓度的灭活金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和 PG 诱导猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)的表达,同时应用荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹技术,分别从 mRNA 和蛋白 2 个水平上检测 RegIII $\gamma$  及相关通路信号分子 P65、P38、JNK、ERK 蛋白的表达水平,探究猪 RegIII $\gamma$  蛋白表达的作用分子机理,旨在为解决早期断奶仔猪产生腹泻的难题提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

IPEC-J2 细胞来源于中国科学院亚热带研究院;*Staphylococcus aureus* 为湖南农业大学动物医学院 417 实验室现有菌株;PG 购于 Sigma。

胰蛋白胨大豆肉汤培养基购于北京陆桥技术

有限责任公司; 2 $\times$ PCR Master Mix 购于北京鼎国生物技术有限公司; RegIII $\gamma$  一抗由湖南农业大学动物医学院 417 实验室保存; 兔源 P65、鼠源 P38、兔源 ERK 特异性非磷酸化抗体购于 Proteintech; 兔源 JNK 特异性非磷酸化抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

ELX800 酶联免疫检测仪和 DYY-20 水平电泳仪(北京六一仪器厂); 细胞恒温培养箱(Thermo); 超微量核酸蛋白分析仪(Thermo Fisher); 梯度荧光 PCR 仪(Applied Biosystems); 多功能凝胶成像系统(上海新振仪器设备有限公司); 超声波破碎仪和 Bio-Rad 凝胶成像系统(伯乐生命医学产品(上海)有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 IPEC-J2 细胞活力检测

取生长旺盛期的 IPEC-J2, 用常温 PBS 缓冲液清洗 2 次, 每次 4 mL, 再用胰酶消化, 当显微镜下观察到细胞变得比较饱满且细胞之间有明显间隙时, 表示消化完全, 此时加入 1 mL 完全培养基停止消化; 轻轻将细胞从培养板吹打收集下来, 经 3000 r/min 离心 3 min 后, 弃去上清液, 加入新的完全培养基重悬细胞, 制备成细胞悬液; 吸取 10  $\mu$ L 细胞母液进行细胞计数, 确定细胞母液浓度。取细胞母液按照  $5\times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 在倒置显微镜下观察到细胞贴壁且状态趋于稳定后, 弃去 96 孔板中的旧培养基, 每孔分别加入 100  $\mu$ L 不同浓度(0、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL) 的灭活 *S. aureus* 或不同质量浓度(0.0、0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL) 的 PG 进行药物处理, 每个药物组设 3 个重复组; 显微镜下观察细胞铺满板底 70% 左右, 每孔加入 10  $\mu$ L MTT 原液和 100  $\mu$ L DMEM 培养基, 置于细胞培养箱孵育 4 h 后小心吸出孔内的 MTT 工作液, 向每孔再添加 150  $\mu$ L 的 DMSO; 最后, 将 96 孔板置于酶标仪低速振板 10 min, 再于 490 nm 波段处检测各孔吸光值(OD<sub>490 nm</sub>), 根据 OD<sub>490 nm</sub> 计算相对细胞活力。

### 1.2.2 IPEC-J2 RegIII $\gamma$ mRNA 与蛋白表达检测

按 1.2.1 的方法, 用 0、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL 的灭活 *S. aureus* 或 0.0、0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL 的

PG 处理 IPEC-J2, 再提取 IPEC-J2 的总 RNA 和总蛋白, 检测 RNA 及蛋白的浓度。对样品总 RNA 进行预处理, 去除残留的 gDNA 后进行逆转录合成 cDNA。配置 20  $\mu$ L RNA 逆转录体系: 向 PCR 管中加入 4  $\mu$ L 4 $\times$ gDNA wiper Mix, 4  $\mu$ L 5 $\times$ HiScript II qRTSuperMix II 和 2  $\mu$ L 模板 RNA, 最后加 DEPC 水补足至 20  $\mu$ L。设置程序为 50  $^{\circ}$ C 下反应 2 min, 85  $^{\circ}$ C 下反应 5 s。设计 RegIII $\gamma$  相关引物序列, 筛选合适的引物交由武汉塞维尔生物技术有限公司合成。PCR 八连管配置 20  $\mu$ L 体系: 每管中需加入 10  $\mu$ L 2 $\times$ qPCR Mix; 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L; 1  $\mu$ L cDNA; RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。qPCR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 循环 40 次。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 RegIII $\gamma$  mRNA 的相对表达量。同时采用 BCA 法测定提取的细胞总蛋白浓度, 将样品中的蛋白于高温下变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 随后切胶、转膜、封闭、孵育 RegIII $\gamma$ 、GAPDH 抗体, 并将转完的 PVDF 膜置于凝胶成像系统中进行显影。

### 1.2.3 IPEC-J2 的 P65、P38、JNK、ERK 蛋白表达水平检测

按 1.2.1 的方法, 用 0、 $10^9$  cfu/mL 的灭活 *S. aureus* 或 0.0、1.0  $\mu$ g/mL 的 PG 处理 IPEC-J2 24 h, 随后提取细胞总蛋白: 弃掉细胞培养上清, 用 PBS 缓冲液清洗并收集细胞, 再用 RIPA 裂解液将细胞裂解完全, 静置大约 30 min 后 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 即为总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。

### 1.2.4 数据统计与分析

数据运用 Excel 2017 进行统计分析及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度灭活 *S. aureus* 和 PG 对 IPEC-J2 细胞活力的影响

从图 1 可知, 随灭活 *S. aureus* 或 PG 浓度的递增, IPEC-J2 细胞活力慢慢降低, 但不同灭活 *S. aureus* 或 PG 浓度处理间细胞活力的差异无统计学意义, 其中  $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 的抑制较明显, 后续选择此浓度进行试验。

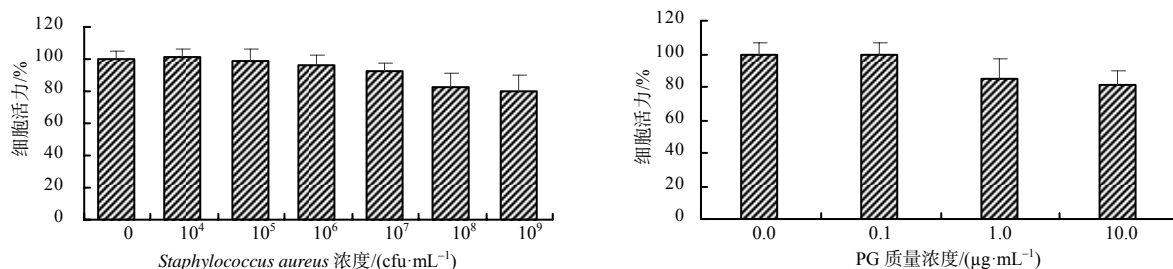


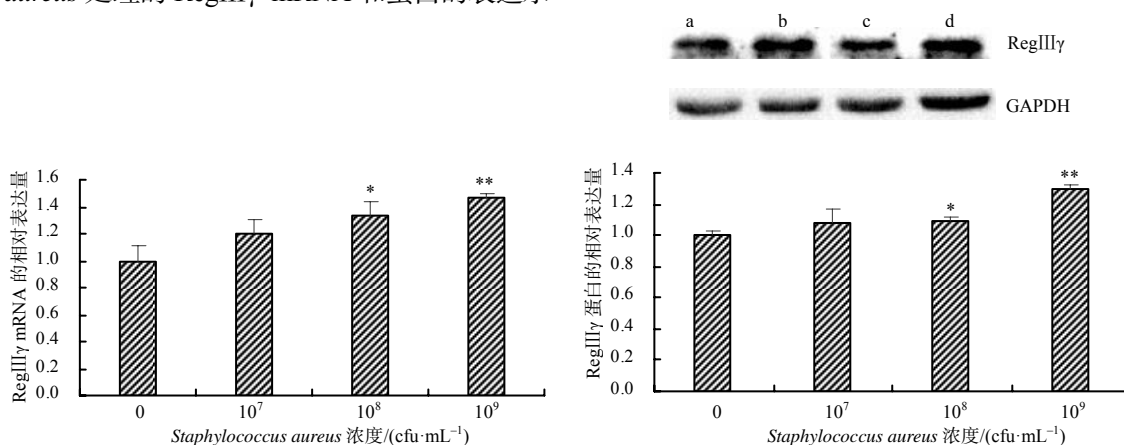
图 1 不同浓度灭活 *Staphylococcus aureus* 或 PG 处理的 IPEC-J2 的细胞活力

Fig.1 The cells activity of IPEC-J2 treated with different concentrations inactivated *Staphylococcus aureus* or PG

## 2.2 不同浓度灭活 *S. aureus* 和 PG 诱导对 IPEC-J2 RegIII $\gamma$ mRNA 与蛋白表达的影响

从图 2 可知, 随灭活 *S. aureus* 浓度的增加, RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平呈上升趋势; 与不添加灭活 *S. aureus* 的处理相比, 添加  $10^8$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 处理的 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水

平显著增加; 添加  $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 处理的 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平极显著增加。本研究中, 灭活 *S. aureus* 能够诱导 RegIII $\gamma$  蛋白的表达,  $10^9$  cfu/mL 的 *S. aureus* 浓度是诱导 IPEC-J2 表达 RegIII $\gamma$  的最佳浓度, 后续试验也选择此浓度。

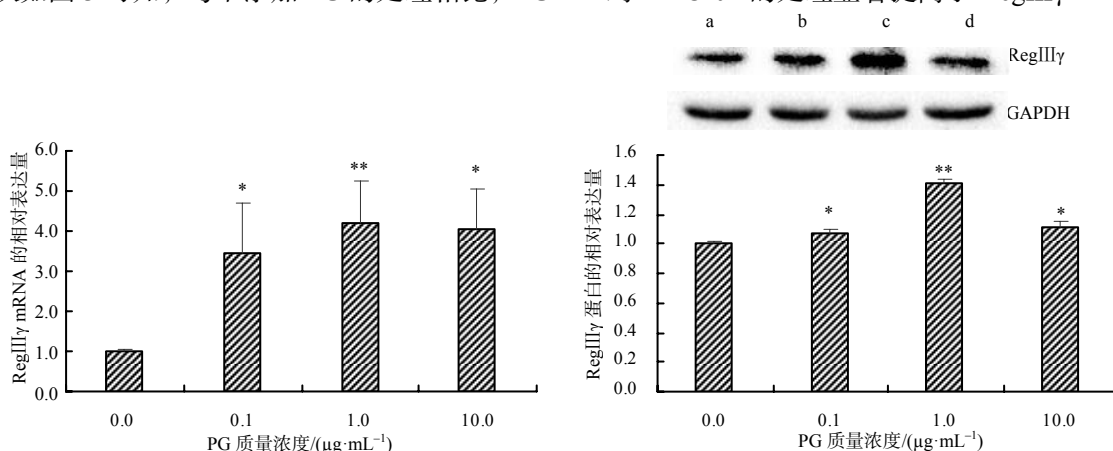


a、b、c、d 分别为添加 0、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 的处理; 图柱上“\*”“\*\*”分别示该处理与不添加灭活 *S. aureus* 的处理间的差异分别在 0.05、0.01 水平有统计学意义。

图 2 灭活 *Staphylococcus aureus* 处理的 IPEC-J2 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平

Fig.2 The expression levels of RegIII $\gamma$  mRNA and protein in IPEC-J2 treated with inactivated *Staphylococcus aureus*

从如图 3 可知, 与不添加 PG 的处理相比, PG 对 IPEC-J2 的处理显著提高了 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋



a、b、c、d 分别为添加 0.0、0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  PG 的处理; 图柱上“\*”“\*\*”分别示该处理与不添加 PG 的处理间的差异分别在 0.05、0.01 水平有统计学意义。

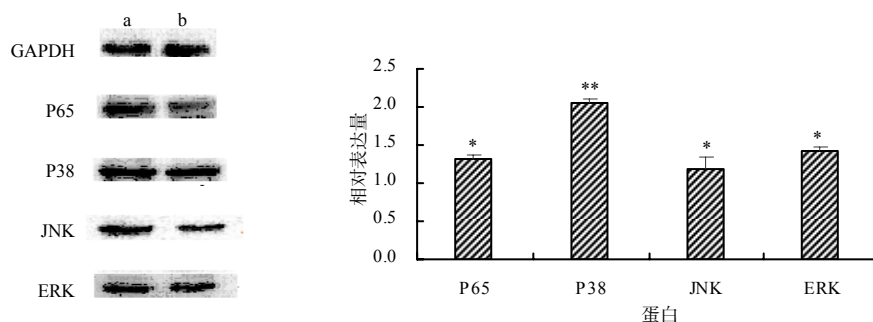
图 3 PG 处理的 IPEC-J2 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的表达水平

Fig.3 The expression levels of RegIII $\gamma$  mRNA and protein in IPEC-J2 treated with PG

白的表达水平,其中,PG 质量浓度为 1.0  $\mu\text{g/mL}$  时,RegIII $\gamma$  的 mRNA 和蛋白表达水平极显著升高,且为各处理中的最高。可见,PG 能够诱导 RegIII $\gamma$  蛋白的表达,1.0  $\mu\text{g/mL}$  的 PG 浓度是诱导 IPEC-J2 表达 RegIII $\gamma$  的最佳浓度。

### 2.3 灭活 *S. aureus* 和 PG 对 IPEC-J2 细胞 P65、P38、JNK、ERK 蛋白表达水平的影响

由图 4 可知,与不添加灭活 *S. aureus* 的处理相比,添加  $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 处理的 IPEC-J2 显著提高了 P65、JNK、ERK 蛋白的表达水平,极显著提高了 P38 蛋白的表达水平。



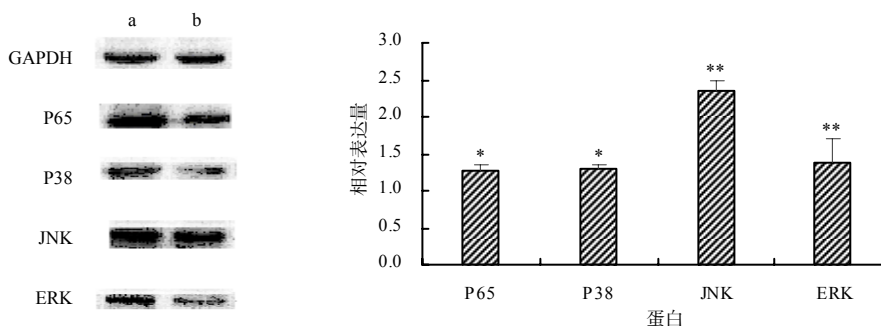
a、b 分别为添加 0、 $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 的处理;图柱上“\*”“\*\*”分别示添加 0、 $10^9$  cfu/mL 灭活 *S. aureus* 的处理间蛋白相对表达量的差异分别在 0.05、0.01 水平有统计学意义。

图 4 灭活 *Staphylococcus aureus* 诱导的 IPEC-J2 P65、P38、JNK、ERK 蛋白的表达水平

Fig.4 The expression levels of P65, P38, JNK and ERK proteins in IPEC-J2 induced by inactivated *Staphylococcus aureus*

由图 5 可知,与不添加 PG 的处理相比,添加 1.0  $\mu\text{g/mL}$  PG 处理的 IPEC-J2 P65 和 P38 蛋白的表

达水平显著升高,JNK、ERK 蛋白的表达水平极显著升高。



a、b 分别为添加 0.0、1.0  $\mu\text{g/mL}$  PG 的处理;图柱上“\*”“\*\*”分别示添加 0.0、1.0  $\mu\text{g/mL}$  PG 的处理间蛋白相对表达量的差异分别在 0.05、0.01 水平有统计学意义。

图 5 PG 诱导的 IPEC-J2 P65、P38、JNK、ERK 蛋白的表达水平

Fig.5 The expression levels of P65, P38, JNK and ERK protein in IPEC-J2 induced by PG

## 3 结论与讨论

杜霞等<sup>[18]</sup>研究显示,在刚出生的仔猪(0 周)肠道即可检测到 RegIII $\gamma$  蛋白的表达,同时具有随发育进程不断增加的趋势。这可能由于某些微生物进入肠道后,在某种程度上诱导了 RegIII $\gamma$  蛋白的表达。UDOMSOPAGIT 等<sup>[19]</sup>研究表明,不同的饮食方案能改变小鼠肠道菌群的组成,诱导 RegIII $\beta$  和 RegIII $\gamma$  表达水平的变化。HUANG 等<sup>[20]</sup>研究发现,与 RegIII $\gamma$  相关的乳杆菌能诱导抗炎巨噬细胞迁移

到脂肪组织中并维持其稳态。本研究中,选取不同浓度(0、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL)的灭活 *S. aureus* 或不同质量浓度(0.0、0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$ )的 PG 作用于 IPEC-J2,灭活 *S. aureus* 和 PG 对 IPEC-J2 的细胞活力均有抑制作用;随后选取 0、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/mL 的灭活 *S. aureus* 或 0.0、0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的 PG 处理 IPEC-J2,检测到 RegIII $\gamma$  mRNA 和蛋白的相对表达量都增加,其中  $10^9$  cfu/mL 的灭活 *S. aureus* 和 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的 PG 是诱导

IPEC-J2 表达 RegIII $\gamma$  的最佳浓度。后续信号通路相关蛋白的检测也将选择此浓度。

NF- $\kappa$ B 和 MAPK 在机体的免疫系统有着十分重要的作用。WANG 等<sup>[21]</sup>在研究牛乳腺炎的致病机制时,发现在 *S. aureus* 刺激牛乳腺上皮细胞(bMECs)中,抑制性  $\kappa$ B $\alpha$ 、P65、P38、ERK 蛋白磷酸化水平有较大提高,表明 *S. aureus* 对 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路产生了一定的影响。MA 等<sup>[22]</sup>在哮喘小鼠模型中发现 TLR2 参与炎症反应过程,在肺组织中检测到 NF- $\kappa$ B-P65、P38-MAPK、JNK-MAPK 和 ERK-MAPK 等信号因子。当敲除 *TLR2* 基因,哮喘小鼠气管炎症明显减轻,其机制可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路来缓解炎症。本研究中,为进一步探究 RegIII $\gamma$  表达的作用分子机理,检测了 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路中的 P65、P38、JNK、ERK 蛋白的表达水平,结果显示,灭活 *S. aureus* 或 PG 刺激 IPEC-J2 24 h 后, P65、P38、JNK、ERK 等蛋白表达水平显著或极显著提高,这说明 RegIII $\gamma$  蛋白表达量的增加可能是由 NF- $\kappa$ B-P65、P38-MAPK、JNK-MAPK、ERK-MAPK 通路所调控。

#### 参考文献:

- [1] 王婷婷, 綦文涛, 易建明, 等. 益生肠球菌应用于断奶仔猪的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2009, 30(1): 95-100.
- [2] 王健, 吴洁, 陈韬. REG3 $\gamma$  的研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2016, 19(2): 49-51.
- [3] SALZMAN N H, HUNG K, HARIBHAI D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology[J]. Nature Immunology, 2010, 11(1): 76-82.
- [4] SATO T, VAN ES J H, SNIPPERT H J, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts[J]. Nature, 2011, 469: 415-418.
- [5] IOVANNA J L, DAGORN J C. The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2005, 1723(1/2/3): 8-18.
- [6] CASH H L, WHITHAM C V, BEHRENDT C L, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin[J]. Science, 2006, 313: 1126-1130.
- [7] CASH H L, WHITHAM C V, HOOPER L V. Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 48(1): 151-159.
- [8] MP LOONEN L M, STOLTE E H, TJ JAKLOFSKY M, et al. REG3 $\gamma$ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum[J]. Mucosal Immunology, 2014, 7(4): 939-947.
- [9] KEILBAUGH S A, SHIN M E, BANCHEREAU R F, et al. Activation of RegIII $\beta$ /gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut[J]. Gut, 2005, 54(5): 623-629.
- [10] VAISHNAVA S, BEHRENDT C L, ISMAIL A S, et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(52): 20858-20863.
- [11] BRANDL K, PLITAS G, SCHNABL B, et al. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2007, 204(8): 1891-1900.
- [12] KINNEBREW M A, UBEDA C, ZENEWICZ L A, et al. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5: dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2010, 201(4): 534-543.
- [13] PARK H S, JUNG H Y, PARK E Y, et al. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF- $\kappa$ B[J]. Journal of Immunology, 2004, 173(6): 3589-3593.
- [14] DOU X J, HAN J L, MA Q Y, et al. TLR2/4-mediated NF- $\kappa$ B pathway combined with the histone modification regulates  $\beta$ -defensins and interleukins expression by sodium phenyl butyrate in porcine intestinal epithelial cells[J]. Food & Nutrition Research, 2018, 62: 1493.
- [15] LU L, WU C, LU B J, et al. BabaoDan cures hepatic encephalopathy by decreasing ammonia levels and alleviating inflammation in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 249: 112301.
- [16] CUENDA A, ROUSSEAU S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Cell Research, 2007, 1773(8): 1358-1375.
- [17] HAGEMANN C, BLANK J L. The ups and downs of MEK kinase interactions[J]. Cellular Signalling, 2001, 13(12): 863-875.
- [18] 杜霞, 向琼昊, 刘泽彬, 等. 新生仔猪肠道抗菌肽的

- 表达特征[J]. 激光生物学报, 2018, 27(6): 545–550.
- [19] UDOMSOPAGIT T, MIWA A, SEKI M, et al. Intestinal microbiota transplantation reveals the role of microbiota in dietary regulation of RegIII $\beta$  and RegIII $\gamma$  expression in mouse intestine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 529(1): 64–69.
- [20] HUANG Y G, QI H B, ZHANG Z Q, et al. Gut REG3 $\gamma$ -associated *Lactobacillus* induces anti-inflammatory macrophages to maintain adipose tissue homeostasis[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1063.
- [21] WANG H, BI C L, WANG Y J, et al. Selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways[J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14: 197.
- [22] MA S Q, WEI H L, ZHANG X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(10): 3138–3146.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳 正

(上接第 143 页)

- [13] 赵中秋, 郑海雷, 张春光, 等. 土壤硒及其与植物硒营养的关系[J]. 生态学杂志, 2003, 22(1): 22–25.
- [14] 展文洁, 刘剑钊, 梁尧, 等. 不同耕作方式对玉米根系特性及养分吸收转运的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(5): 817–825.
- [15] 蒋鹏, 熊洪, 朱永川, 等. 施氮量和氮肥运筹模式对糯稻养分吸收积累和氮肥利用率的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(4): 349–353.
- [16] 余华清, 丁峰, 殷尧翥, 等. 不同水氮管理下麦茬杂交稻氮磷钾吸收和转运及其与产量的关系[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(4): 337–343.
- [17] LIMA LESSA J H, ARAUJO A M, FERREIRA L A, et al. Agronomic biofortification of rice (*Oryza sativa* L.) with selenium and its effect on element distributions in biofortified grains[J]. Plant and Soil, 2019, 444(1/2): 331–342.
- [18] ELKELISH A A, SOLIMAN M H, ALHAITHLOUL H A, et al. Selenium protects wheat seedlings against salt stress-mediated oxidative damage by up-regulating antioxidants and osmolytes metabolism[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 137: 144–153.
- [19] 刘飘, 黄科文, 代京桐, 等. 施用多裂翅果菊秸秆对葡萄幼苗生长及硒富集的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 35–39.
- [20] 袁光咏, 陈仲西, 金河成, 等. 土壤硒对油菜含硒量、生长和产量的影响[J]. 中国油料, 1992(1): 39–41.
- [21] SHINMACHI F, BUCHNER P, STROUD J L, et al. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat[J]. Plant Physiology, 2010, 153(1): 327–336.
- [22] ZHANG L H, HU B, LI W, et al. OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice[J]. New Phytologist, 2014, 201(4): 1183–1191.
- [23] DENG X F, ZHAO Z Q, LV C H, et al. Effects of sulfur application on selenium uptake and seed selenium speciation in soybean(*Glycine max* L.) grown in different soil types[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111790.
- [24] BOLDRIN P F, FAQUIN V, RAMOS S J, et al. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 31(2): 238–244.
- [25] LONGCHAMP M, ANGELI N, CASTREC-ROUELLE M. Selenium uptake in *Zea mays* supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions[J]. Plant and Soil, 2013, 362(1/2): 107–117.
- [26] FRANCISCO P C M, SATO T, OTAKE T, et al. Mechanisms of Se(IV) co-precipitation with ferrihydrite at acidic and alkaline conditions and its behavior during aging[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(8): 4817–4826.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正