

应诗家, 戴子淳, 郭佳佳, 等. 鹅输卵管 *TLR* 家族基因差异表达的研究[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1395-1399.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.031

## 鹅输卵管 *TLR* 家族基因差异表达的研究

应诗家<sup>1</sup>, 戴子淳<sup>1,2</sup>, 郭佳佳<sup>1</sup>, 李 辉<sup>1</sup>, 雷明明<sup>1</sup>, 施振旦<sup>1</sup>, 沈明君<sup>3</sup>

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 3.扬州朝天歌农牧科技有限公司, 江苏 扬州 225000)

**摘要:** 本试验旨在研究已公开的 10 种鸟类 Toll 样受体(TLRs)家族基因在鹅输卵管不同功能部位的差异表达。分别采用 RT-PCR 和 qRT-PCR 技术检测输卵管基因表达谱和表达水平。结果显示除 *TLR1-1* 和 *TLR5* 分别在膨大部 and 子宫部组织无表达外, 其他 *TLR* 家族基因在输卵管不同部位均表达, 其中 4 个基因在阴道部高表达, 2 个基因分别在伞部和峡部高表达, 1 个基因分别在膨大部和子宫部高表达; *TLR2-2* 和 *TLR21* 在输卵管不同功能部位间表达差异不显著 ( $P>0.05$ ); 阴道部 *TLR1-1* 表达显著高于伞部 ( $P<0.05$ ), *TLR3* 表达显著高于伞部、峡部和膨大部 ( $P<0.05$ ), *TLR5* 表达显著高于伞部和膨大部 ( $P<0.05$ ), *TLR15* 表达显著高于子宫部 ( $P<0.05$ ); 伞部 *TLR1-2* 和 *TLR2-1* 表达显著高于峡部和阴道部 ( $P<0.05$ ); 峡部 *TLR4* 表达显著高于子宫部和阴道部 ( $P<0.05$ ), *TLR5* 显著高于伞部和膨大部 ( $P<0.05$ ); 膨大部 *TLR2-1* 表达显著高于峡部和阴道部 ( $P<0.05$ ); 子宫部 *TLR7* 表达显著高于伞部、峡部、膨大部和阴道部 ( $P<0.05$ )。表明鹅输卵管不同功能部位差异化表达 *TLR*, 存在抵御病原微生物感染的非特异性免疫反应机制。

**关键词:** 鹅; 输卵管; Toll 样受体; 基因表达

**中图分类号:** S835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1395-05

## Differential gene expressions of Toll-like receptors in goose oviduct

YING Shi-jia<sup>1</sup>, DAI Zi-chun<sup>1,2</sup>, GUO Jia-jia<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, LEI Ming-ming<sup>1</sup>, SHI Zhen-dan<sup>1</sup>, SHEN Ming-jun<sup>3</sup>

(1. Institute of Animal Science/Laboratory of Animal Improvement and Reproduction, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Yangzhou Goosing Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Yangzhou 225000, China)

**Abstract:** This study aims to investigate the gene expression of Toll-like receptors (TLRs) in different segments of goose oviduct. The profiles and levels of *TLRs* gene expressions in all segments of goose oviduct were examined by RT-PCR

and qRT-PCR, respectively. Except for non-detectable *TLR1-1* and *TLR5* expressions in magnum and uterus, respectively, the others were all expressed in oviduct. Among 10 *TLRs* genes, 4 were highly expressed in vagina tissue, 2 in infundibulum and isthmus tissues, respectively, and 1 in magnum and uterus tissues, respectively. Gene expressions of *TLR2-2* and *TLR21* differed insignificantly in various segments of oviduct ( $P>0.05$ ).

收稿日期: 2015-07-10

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)5041]; 江苏省自然科学基金项目(BK20130718); 国家水禽产业技术体系(CARS-43-16)

作者简介: 应诗家(1984-), 男, 安徽巢湖人, 博士, 助理研究员, 研究方向为家禽环境控制。(Tel) 025-84390772; (E-mail) ysj@jaas.ac.cn

通讯作者: 施振旦, (Tel) 025-84390956; (E-mail) zdshi@jaas.ac.cn

Compared with gene expression in vagina, *TLR1-1* mRNA expression in infundibulum, *TLR3* mRNA expressions in infundibulum, isthmus and magnum, *TLR5* mRNA expressions in infundibulum and magnum, and *TLR15* mRNA expression in uterus were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with gene expression in infundibulum, *TLR1-2* and *TLR2-1* mRNA expressions in isthmus and vagina were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). *TLR4* and *TLR5* mRNA expressions in isthmus were higher than those in uterus and vagina and those in infundibulum and magnum, respectively. *TLR2-1* mRNA expression in magnum was higher than those in isthmus and vagina, and *TLR7* mRNA expression in uterus was higher than those in the other tissues. In conclusion, differential expression of Toll-like receptors genes may play essential roles in oviductal innate immunity for host defense

**Key words:** goose; oviduct; Toll-like receptor (*TLR*); gene expression

禽类输卵管的伞部、峡部、膨大部、子宫部和阴道部在种蛋形成过程中具有重要的作用,其阴道部和泄殖腔特有的生理结构极易导致粪便中的病原微生物经阴道沿输卵管腔感染输卵管其他部位<sup>[1]</sup>。此外,种鹅的赖水习性也极易引起养殖水体病原微生物通过交配进入种鹅生殖道,诱发输卵管炎症反应,影响种蛋受精率和孵化率<sup>[2-3]</sup>。因此,种鹅输卵管自身的非特异性免疫功能对抵御病原微生物侵害至关重要。

Toll 样受体 (TLRs) 是一类病原识别模式受体,识别病原微生物及其代谢产物,启动胞内信号级联效应,诱导非特异性免疫反应,抵御病原微生物侵袭<sup>[4-5]</sup>。已发现的禽类 *TLR* 家族包括 *TLR1-1*、*TLR1-2*、*TLR2-1*、*TLR2-2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR15* 和 *TLR21* 共 10 个基因<sup>[6]</sup>。这些 *TLRs* 的时空表达对识别病原微生物,启动非特异性免疫反应,维持组织器官功能具有重要的作用。Ozoe 等对 *TLR1-1*、*TLR1-2*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR14*、*TLR5* 和 *TLR7* 的研究发现 *TLR1-1* 在输卵管各部位均不表达,*TLR2*、*TLR3* 和 *TLR14* 在阴道、子宫和伞部组织表达显著高于膨大部<sup>[7]</sup>。华国洪和刘少丰等分别研究了鹅 *TLR2-1* 和 *TLR15*<sup>[8]</sup>、*TLR3* 和 *TLR5*<sup>[9]</sup> 基因在皮肤、脾脏和法氏囊等 11 种组织器官中的差异表达。然而,国内外对鹅输卵管 *TLR* 家族基因的研究尚无报道。

本试验拟系统地研究已发现的 10 种禽 *TLR* 家族基因在产蛋高峰期种鹅输卵管伞部、峡部、膨大部、子宫部和阴道部的表达变化,为种鹅输卵管启动非特异性免疫反应,抵御病原微生物侵染的分子调控机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

在扬州朝天歌农牧科技有限公司所属的瑞农农

业专业合作社随机选择 5 只产蛋高峰期扬州鹅,产蛋后 8 h (新生蛋运行至子宫部<sup>[10]</sup>) 颈动脉放血屠宰,取输卵管伞部、峡部、膨大部、子宫部和阴道部以及脾脏组织样,液氮保存。

### 1.2 主要试剂

100 bp Marker 和 PrimeScript™ RT Master Mix 购自宝生物工程(大连)有限公司, *Taq* PCR Master Mix 购自南京博尔迪生物科技有限公司, *astStart* Universal SYBR Green Master 购自罗氏诊断产品(上海)有限公司,含 Dase I 的 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.3 总 RNA 提取和反转录

取小块伞部、峡部、膨大部、子宫部、阴道部和脾脏组织,按天根试剂盒说明书提取总 RNA。RNA 质量检测合格后,参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书,合成 cDNA 第 1 链, -20 ℃ 保存备用。反应体系为 10.00 μl (2.00 μl 5× PrimeScript® Buffer, 8.00 μl RNA)。反转录程序: 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 4 ℃ 保存。

### 1.5 PCR 反应和测序

根据 GenBank 登录号,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,其中 *TLR1-1*、*TLR1-2* 和 *TLR21* 的引物根据鸭相应的序列信息设计,引物信息见表 1,由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系为 10.00 μl: 2×*Taq* PCR Master Mix 5.00 μl, ddH<sub>2</sub>O 3.50 μl, 上游和下游引物各 0.25 μl, RT 产物 1.00 μl。

反应程序为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 50/57/60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,由上海英骏生物技术有限公司测序。

表 1 定量 PCR 引物信息

Table 1 Primer pairs used for real-time PCR

目的基因	引物序列(5'→3')	登录号	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>β-actin</i>	TGACGCAGATCATGTTTGAGA GCAGAGCGTAGCCCTCATAG	M26111	159	60
<i>TLR1-1</i>	CTAACTGATGTTCACAAA CATTAAAGTCAAGCTCTG	JN572685	157	50
<i>TLR1-2</i>	CACGCCTTCATTTCTAC ATTGACACCACTCGCTCT	JN572686	220	60
<i>TLR2-1</i>	CAGCACCTCCACATTCACG CTTCGGGGCTCATACAGA	JN982474	199	60
<i>TLR2-2</i>	ATAAGCATAAGAAGGGTAGA CAATCCCAGGCACACTAGC	JQ687404	196	60
<i>TLR3</i>	TAATCTGGCTATTTCTCCT CCAAAGTCGTGCTAAATTA	KC292270	160	57
<i>TLR14</i>	GGTGCCACATCCATACAAT TAGGTCAGTCAGAGAGGATA	HQ436371	173	60
<i>TLR5</i>	GGGGAAGAACATATCAACA GATCACTAAAGTACCTGCT	KC845942	139	60
<i>TLR7</i>	CAACCTTTCCAGAGCATT TCCTCAGCCTAACATACCG	JQ910168	191	60
<i>TLR15</i>	ATATGAGGCTCAGACGAAG GGTAGTCCACAGCGTTAG	JQ014619	100	60
<i>TLR21</i>	TGGTACTTCAGCCGCCAGT TGTGCTTCTACCTCTTACCG	JN573269	106	60

### 1.6 Real-time PCR 分析

以管家基因 *β-actin* 为内参,每个样品重复 3 次,取平均 *Ct* 值进行计算,所得试验数据按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  结果统计分析。

定量 PCR 反应体系为 20 μl:1.00 μl RT 产物,上游引物和下游引物各 0.60 μl,7.80 μl ddH<sub>2</sub>O,10.00 μl FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)。反应程序为:50℃ 2 min,95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s,50/57/60℃ 退火 30 s,72℃ 30 s,共 40 个循环。

### 1.7 统计分析

数据采用 SPSS 13.0 软件统计分析,结果以“平均值 ± 标准误”表示。试验数据采用单因子方差分

析,Duncan 法多重比较。

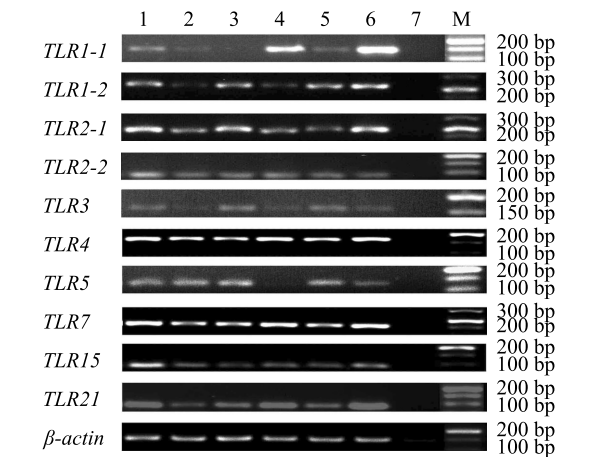
## 2 结果与分析

### 2.1 鹅输卵管 TLRs 家族基因表达谱

分别采用设计的引物进行 RT-PCR 扩增,并以脾脏的扩增产物为阳性对照,PCR 产物电泳检测结果与欲扩增目的片段大小一致(图 1)。通过测序,并与 GenBank 已登录的序列(表 1)比对,相似性达到 97%以上,表明 PCR 扩增片段为鹅 TLR 家族基因片段。

基因表达试验结果(图 1)显示,目前已发现的禽类 10 种 TLR 家族基因均在鹅输卵管中表达,除膨大部未发现 *TLR1-1* 表达和子宫部组织未发现

*TLR5* 表达外,输卵管伞部、峡部、膨大部、子宫部和阴道部均表达其他 *TLR* 家族基因。



1、2、3、4、5、6 和 7 分别表示伞部、峡部、膨大部、子宫部、阴道部、脾脏和空白对照;M 表示 DNA 分子量标记。

图 1 鹅输卵管和脾脏 *TLR1-1* 家族基因表达谱

Fig.1 Gene expression profiling of Toll-like receptors in geese oviduct and spleen tissues

2.2 鹅 *TLR* 家族基因在输卵管不同功能部位的差异表达

鹅 *TLR* 家族基因在输卵管不同功能部位的差异表达见表 2。*TLR2-2* 和 *TLR21* 在输卵管伞部、峡部、膨大部、子宫部和阴道部表达差异不显著 ( $P>0.05$ );*TLR1-1*、*TLR3*、*TLR5* 和 *TLR15* 4 个基因在阴道部高表达;*TLR14* 和 *TLR5* 2 个基因在峡部高表达;*TLR1-2* 和 *TLR2-1* 2 个基因在伞部高表达;*TLR2-1*和 *TLR7* 分别在膨大部和子宫部中高表达。

阴道部 *TLR1-1* 表达显著高于伞部 ( $P<0.05$ ), *TLR3* 表达显著高于伞部、峡部和膨大部 ( $P<0.05$ ), *TLR5* 表达显著高于伞部和膨大部 ( $P<0.05$ ), *TLR15* 表达显著高于子宫部 ( $P<0.05$ );伞部 *TLR1-2* 和 *TLR2-1* 表达显著高于峡部和阴道部 ( $P<0.05$ );峡部 *TLR14* 表达显著高于子宫部和阴道部 ( $P<0.05$ ), *TLR5* 显著高于伞部和膨大部 ( $P<0.05$ );膨大部 *TLR2-1* 表达显著高于峡部和阴道部 ( $P<0.05$ );子宫部 *TLR7* 表达显著高于伞部、峡部、膨大部和阴道部 ( $P<0.05$ )。

表 2 鹅 *TLR* 家族基因在输卵管不同功能部位的差异表达

Table 2 Differential expression of *TLRs* gene in all segments of geese oviduct

基因	伞部	峡部	膨大部	子宫部	阴道部
<i>TLR1-1</i>	11.19±3.48b	62.95±37.90ab	—	36.46±11.76ab	137.41±59.65a
<i>TLR1-2</i>	19.18±11.21a	1.55±0.41b	2.83±1.03ab	2.20±0.46ab	1.51±0.35b
<i>TLR2-1</i>	0.87±0.18a	0.15±0.03c	1.21±0.32a	0.32±0.07bc	0.41±0.08b
<i>TLR2-2</i>	0.18±0.11	0.06±0.02	0.30±0.18	0.15±0.11	0.22±0.04
<i>TLR3</i>	3.68±1.84b	3.90±1.75b	3.18±1.27b	9.17±3.12ab	13.41±3.73a
<i>TLR14</i>	0.29±0.05ab	0.69±0.23a	0.30±0.18ab	0.24±0.09b	0.16±0.03b
<i>TLR5</i>	1.01±0.33b	105.75±23.59a	2.53±0.58b	—	209.85±181.73a
<i>TLR7</i>	3.30±0.64b	2.80±1.40b	2.45±0.81b	22.47±10.21a	3.89±0.99b
<i>TLR15</i>	4.12±0.84ab	4.33±2.17ab	3.22±0.87ab	1.09±0.04b	6.81±1.84a
<i>TLR21</i>	0.75±0.29	1.38±0.45	1.27±0.16	0.64±0.28	1.82±0.45

同一行不同小写字母表示鹅 *TLRs* 家族基因在输卵管不同功能部位的表达差异显著 ( $P<0.05$ );—表示未检测到基因表达。

3 讨论

非特异性免疫反应是机体抵抗感染性疾病的第一道屏障,而 *TLR* 家族基因是非特异性免疫反应的关键调节基因<sup>[11-12]</sup>,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁<sup>[13]</sup>。目前已发现禽类 *TLR* 家族包含 10 种基因,其中大多数基因在禽类卵巢<sup>[6]</sup>、输卵管<sup>[7]</sup>和睾丸<sup>[14]</sup>中表达,参与性腺免疫反应,维持性腺功能稳态。本试验系统研究了 10 种 *TLR* 家族基

因在鹅输卵管不同功能部位的差异表达,结果显示禽类 10 种 *TLR* 家族基因均在鹅输卵管中表达,表明鹅输卵管存在抵御病原微生物侵染的非特异性免疫反应。与鸡输卵管的研究结果类似<sup>[7]</sup>,*TLR1-1*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4* 和 *TLR7* 均在输卵管各个功能部位表达,*TLR5* 在鹅输卵管的子宫部不表达。*TLR5* 具有识别细菌鞭毛蛋白的功能<sup>[15]</sup>,因此,本试验的结果也表明家禽和水禽输卵管非特异性免疫反应存在种间差异,并且鹅输卵管子宫部识别细菌鞭毛蛋



白的能力可能弱于鸡的子宫。

禽类的输卵管极易受多种病原微生物感染,如沙门氏菌<sup>[16-17]</sup>、支气管炎病毒<sup>[18]</sup>和禽流感病毒<sup>[19]</sup>等,而 TLR 家族基因可识别广泛的病原微生物及其代谢产物<sup>[20]</sup>。研究结果表明 TLR1 可识别肽聚糖、脂磷壁酸、阿拉伯糖甘露糖脂及酵母和真菌的酵母多糖<sup>[15]</sup>;TLR2 除具有 TLR1 的识别功能外还可识别革兰氏阴性菌释放的 LPS<sup>[15]</sup>;TLR3 识别双链 RNA,同时可以感受到 dsRNA 病毒、ssRNA 病毒和 DNA 病毒的感染<sup>[15,21]</sup>;TLR4 识别革兰氏阴性菌释放的 LPS<sup>[6,7,22]</sup>;TLR5 识别细菌鞭毛蛋白<sup>[15]</sup>;TLR7 识别单链 RNA<sup>[15]</sup>;TLR15 识别革兰氏阴性菌;TLR21 识别细菌基因组产生的未甲基化 CpG DNA 序列<sup>[20]</sup>。因此,鹅输卵管不同功能部位表达大多数 TLR 家族基因,可有效识别各类病原微生物及其代谢产物,启动非特异性免疫反应。本试验中,TLR 家族的 4 个基因在阴道部高表达,2 个基因分别在峡部和伞部高表达,仅 1 个基因在膨大部和子宫部高表达,说明鹅输卵管的两端部位识别病原微生物的能力最强。

#### 参考文献:

- [1] MIYAMOTO T, HORIE T, FUKATA T, et al. Changes in microflora of the cloaca and oviduct of hens after intraoocel or intravaginal inoculation with *Salmonella enteritidis*[J]. *Avian Dis*, 1998, 42(3): 536-544.
- [2] 林 勇,赵 伟,施振旦,等. 经济实用型发酵床旱养鸭舍设计与建造[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(8): 372-373.
- [3] JIANG D L, LIU L, WANG C L, et al. Raising on water stocking density reduces geese reproductive performances via water bacteria and lipopolysaccharide contaminations in 'Geese-Fish' production system[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(9): 1459-1466.
- [4] KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptor function and signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(5): 979-987, 988.
- [5] 应诗家,赵 伟,施振旦. 禽类生殖系统非特异性免疫反应的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(23): 87-90.
- [6] SUBEDI K, ISOBE N, NISHIBORI M, et al. Changes in the expression of toll-like receptor mRNAs during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in the ovarian follicles of laying hens[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(6): 1227-1235.
- [7] OZOE A, ISOBE N, YOSHIMURA Y. Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 127(3-4): 259-268.
- [8] 华国洪. 鹅 TLR2-1、15 基因的克隆、组织表达谱分析[D]. 广东: 广东海洋大学, 2012.
- [9] 刘少丰. 鹅 TLR3 和 TLR5 基因的克隆及其功能研究[D]. 广东: 广东海洋大学, 2012.
- [10] 马春祥,吴和光. 白罗曼母鹅排卵与鹅蛋之形成[J]. *畜牧兽医学报*, 1996, 27(1): 32-39.
- [11] SONODA Y, ABDEL MAGEED A M, ISOBE N, et al. Induction of avian beta-defensins by CpG oligodeoxynucleotides and proinflammatory cytokines in hen vaginal cells *in vitro* [J]. *Reproduction*, 2013, 145(6): 621-631.
- [12] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787.
- [13] AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(8): 675-680.
- [14] ZHANG M, NII T, ISOBE N, et al. Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of roosters[J]. *Poult Sci*, 2012, 91(8): 1997-2003.
- [15] KOGUT M H, IQBAL M, HE H, et al. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(9): 791-807.
- [16] TAKATA T, LIANG J, NAKANO H, et al. Invasion of salmonella enteritidis in the tissues of reproductive organs in laying Japanese quail: an immunocytochemical study [J]. *Poult Sci*, 2003, 82(7): 1170-1173.
- [17] WIGLEY P, HULME S D, POWERS C, et al. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 2986-2990.
- [18] CHOUSALKAR K K, ROBERTS J R. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 122(3-4): 223-236.
- [19] PROMKUNTOD N, ANTARASENA C, PROMMUANG P. Isolation of avian influenza virus A subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1081: 171-173.
- [20] BROWNIE R, ALLAN B. Avian toll-like receptors[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(1): 121-130.
- [21] LEE H K, DUNZENDORFER S, SOLDAU K, et al. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14[J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 153-163.
- [22] HEUMANN D, ROGER T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 323(1-2): 59-72.

(责任编辑:陈海霞)