

# $\beta$ 防御素在牛健康组织和病变组织中的分布

杨宇琴\*, 王细花\*, 吕悦, 程广宇, 周向梅\*\*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

**摘要:**  $\beta$ -防御素作为抗菌肽的一种, 对机体防病抗病具有重要的意义。为研究牛  $\beta$ -防御素在牛各组织脏器的分布, 本试验通过制备兔抗牛  $\beta$ -防御素 (BNBD) 4 和 5 的多克隆抗体, 利用免疫组化的方法观察健康牛肺、脾、肝、肾组织以及渗出性炎症、结核性肉芽肿、增生性炎症情况下牛肺组织中两种防御素的表达。结果发现牛  $\beta$ -防御素 4、5 主要分布于各组织中的淋巴细胞、巨噬细胞胞浆及其周围分泌物中, 以及肺泡上皮细胞胞浆及其分泌物中; 同健康组织相比, 病变组织中 BNBD-4 表达量升高, 而 BNBD-5 表达量降低。本研究为探讨  $\beta$ -防御素的功能奠定了基础。

**关键词:** 牛;  $\beta$ -防御素; 健康组织; 病变组织; 分布

中图分类号: S859.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2015)12-0025-06

## Distribution of bovine $\beta$ -defensin in normal and pathological tissues

YANG Yuqin\*, WANG Xihua\*, LÜ Yue, CHENG Guangyu, ZHOU Xiangmei\*\*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:**  $\beta$ -defensin, an antibacterial peptide, has important role in the prevention and treatment of disease. To investigate the distribution of bovine  $\beta$ -defensin (BNBD), BNBD-4 and BNBD-5 was detected in normal tissues (lung, kidney and spleen) and pathologic lung tissues by immunohistochemical method using rabbit polyclonal antibodies. The results showed that in normal tissues, BNBD-4 and BNBD-5 were mainly located in the cytoplasm of lymphocytes, macrophages and alveolar epithelial cells, and the secretion around these cells. Compared with the normal tissues, the expression level of BNBD-4 was higher but the BNBD-5 level was lower in pathological lung tissues.

**Key words:** bovine;  $\beta$ -defensin; normal tissues; pathological tissues; distribution

1991 年 Diamond 等首次在牛的气管黏膜上皮细胞中发现了一种新的防御素, 随后又在牛的其他部位接连发现了多种与其基因序列高度相似, 但是其共有序列 (consensus sequence) 与  $\alpha$ -防御素不同的防御素, 称之为  $\beta$ -防御素。

$\beta$ -防御素家族中除了最初从牛的气管黏膜上皮细胞中发现的  $\beta$ -防御素 (TAP), 还包括后来发现的牛的另外两种  $\beta$ -防御素: 舌  $\beta$ -防御素 (LAP) 和肠  $\beta$ -防御素 (EBD), LAP 分布于牛舌的鳞状上皮细胞、呼吸道、胃肠道、结膜和泌尿生殖道以及脑和胎盘<sup>[1-2]</sup>, EBD 主要分布于牛的远端小肠和结肠<sup>[3]</sup>。此外, 研究发现在牛的嗜中性粒细胞中存在 13 种  $\beta$ -防御素 (BNBD-1 ~ 13)<sup>[4]</sup>。

牛  $\beta$ -防御素的本质为一种富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽, 在动物机体内广泛存在且作用强大。除了熟知的广谱抗菌、抗病毒活性和非特异的细胞毒性作用外, 还可以调节动物体内适应性免疫及其他抗微生物免疫活性。 $\beta$ -防御素可以直接杀灭细菌, 对革兰阴性菌和革兰阳性菌均有杀伤作用; 致病微生物表面物质可以诱导表达诱导型  $\beta$ -防御素, 同时机体产生的炎性因子的刺激能够进一步提高表达量; 此外,  $\beta$ -防御素的选择性趋化作用可以趋使天然免疫系统中的白细胞向炎症部位集中, 通过吞噬作用消灭病原微生物<sup>[5]</sup>。

据报道牛肺泡巨噬细胞分泌牛  $\beta$ -防御素 4、5, 对于一些胞内存活菌也具有明显的抑菌效果。本实验室制备了真核表达的牛  $\beta$ -防御素 4、5, 通过研究表明该防御素对大肠杆菌、沙门菌以及结核分枝杆菌都具有显著的抑菌作用<sup>[6]</sup>。不同的防御素发挥杀菌抑菌作用的部位不一样, 为了弄清楚  $\beta$ -防御素 4、5 发挥作用的场所或部位, 我们制备了兔抗牛  $\beta$ -防御素 4、5 (BNBD-4、5) 多克隆抗体, 并用免疫组化方法来测定其分布情况。

收稿日期: 2015-05-27; 修回日期: 2015-10-07

基金项目: 科技部 863 计划项目 (2012AA101302); 国家大学生创新训练项目

\* 共同第一作者

作者简介: 杨宇琴 (1993-), 女, 本科生; 王细花 (1991-), 女, 本科生

\*\* 通信作者, 周向梅, 主要研究方向为牛结核病致病机制和防控, E-mail: zhouxm@cau.edu.cn

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

BNBD-4、5 重组蛋白由中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室康静静<sup>[6]</sup>提供。其简要制作过程为：采用克隆技术分别将牛中性粒细胞防御素 4 和 5 的成熟肽基因插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中，从而获得 2 个重组毕赤酵母表达质粒 mBNBD4-pPIC9K 和 mBNBD5-pPIC9K，然后使用含甲醇培养基诱导外源蛋白在毕赤酵母中表达，并通过蛋白纯化系统获得纯化的 BNBD-4、5 重组蛋白。BNBD-4、5 重组蛋白大小均为 7 ku。

新西兰大白兔和饲料购自北京海淀区兴隆动物养殖场。QuickAntibody 免疫佐剂及羊抗兔二抗购自北京博奥龙免疫技术有限公司。生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒 (Biotin-Streptavidin HRP Detection Systems) 及浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。健康牛各脏器及病变牛肺组织取自某大型牛屠宰场饲养的黑白花奶牛。切片制备及实验所需各种仪器、普通试剂和耗材由中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 兔抗牛 β-防御素 4、5 多克隆抗体的制备

买入新西兰大白兔 2 只，分组编号后适应性饲养 1 周，以减少应激；随后耳缘静脉采集阴性血清，再适应性饲养 2 d；依照 QuickAntibody 佐剂 (北京博奥龙免疫技术有限公司) 推荐的免疫剂量和免疫程序进行免疫：一免：后腿肌肉注射 (125 μL 蛋白 (0.35 μg/μL) + 125 μL 佐剂)<sup>[7]</sup>；3 周后二免：后腿肌肉注射 (125 μL 蛋白 (0.35 μg/μL) + 125 μL 佐剂)；再 3 周后三免：后腿肌肉注射 (125 μL 蛋白 (0.35 μg/μL) + 125 μL 佐剂)；三免后第 10 天 ELISA 测效价，根据结果加强免疫 1 次；ELISA 测定

多抗滴度评价免疫效果；采集血清并纯化抗体。

### 1.2.2 抗体纯化

采用 G 蛋白亲和柱法纯化抗体。先用离心机以 5 000 r/min 离心 30 min，收集上清液；随后将上清液通过 0.45 μm 的过滤器过滤；将过滤后的上清加入 G 蛋白柱，收集滤液；之后每一个柱子用 7 CV 的结合缓冲液洗涤；随后再用 5 CV 的洗涤缓冲液洗涤 A 蛋白柱，收集洗脱液；之后用 1 mol/L 的 Tris-HCl 中和洗脱的抗体样品；最后以 15% 的 SDS 凝胶电泳分析样品。

### 1.2.3 免疫组化法 (SP 法) 测定在牛各脏器组织上 BNBD-4、5 的分布情况

将组织制作成切片，用免疫组织化学染色 (SP 法)，经脱蜡、水化、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 覆盖组织、封闭等常规步骤后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 滴加一抗 (已制得的 BNBD-4、5 多克隆抗体)，湿盒中 4 ℃ 过夜孵育后，经 37 ℃ 复温 45 min，用二抗 (生物素标记的山羊抗兔 IgG) 室温孵育 15 min，再用辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 15 min，然后 DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检。

### 1.2.4 数据分析

应用图像分析软件 Image-pro plus 6.0 版对免疫组化切片进行统计分析。每个切片选取 5 张 200 倍视野下照片，利用软件分析系统测定免疫组化阳性面光密度并计算平均值。利用 t 检验方法，比较各组数据之间差异显著性，“\*”表示差异显著，“\*\*”表示差异极显著。

# 2 结果

## 2.1 多抗血清效价测定

对兔子进行 3 次免疫后，经 ELISA 测定效价后再加强免疫 1 次，之后心脏采血，分离血清并测定效价，结果如下表 (表 1)。

表 1 兔抗牛 β-防御素 4、5 血清效价测定

抗 BNBD-4 血清												
稀释倍数	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 51 200	1 : 102 400	1 : 204 800	1 : 409 600
免疫血清	3.52	3.542	3.555	3.514	3.471	3.367	3.211	2.929	1.895	1.153	0.664	0.434
阴性血清	2.047	1.462	0.959	0.602	0.414	0.26	0.206	0.167	0.123	0.121	0.111	0.108
抗 BNBD-5 血清												
稀释倍数	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 51 200	1 : 102 400	1 : 204 800	1 : 409 600
免疫血清	3.51	3.461	3.392	3.293	3.02	2.575	1.668	1.042	0.506	0.297	0.212	0.13
阴性血清	1.957	1.233	0.883	0.439	0.321	0.197	0.282	0.101	0.1	0.147	0.078	0.061

由表 1 可知，制备的多抗血清效价很高，均高出 40 万。BNBD-4 的多抗效价明显高于 BNBD-5 的多抗效价。

## 2.2 抗体纯化

纯化结果表明，抗 BNBD-4、5 抗体洗脱液在 50 ku 左右出现明显条带。通过 G 蛋白柱纯化后，抗体

的浓度为 85% 以上的收率大约为: BNBD-5 抗体, 32.4 mg, 浓度为 1 mg/mL; BNBD-4 抗体, 37.8 mg, 浓度为 1 mg/mL。

### 2.3 免疫组化结果

#### 2.3.1 牛健康组织的免疫组化

##### 2.3.1.1 肠组织

免疫组化的结果显示, BNBD-4 组在健康牛肠组织固有层肠腺分泌液、肠腺上皮细胞及周围间质细胞 (图 1a) 均有棕黄色显色; BNBD-5 组在健康牛肠组织固有层肠腺分泌液及周围间质细胞 (图 1b) 均有棕黄色显色。同时, 相同稀释倍数 (1:250) 下 BN-

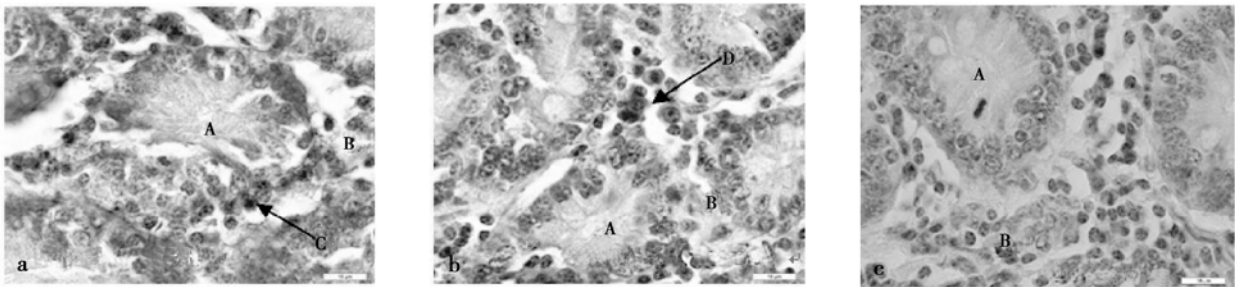
BD-4 比 BNBD-5 显色范围要广一些。

##### 2.3.1.2 肺组织

免疫组化结果显示, 在肺中, 并没看到明显对 BNBD-4 的棕黄色; 显色; 在健康牛肺组织的细支气管上皮 (图 2a) 和肺泡上皮 (图 2b) 对 BNBD-5 中有棕黄色显色。

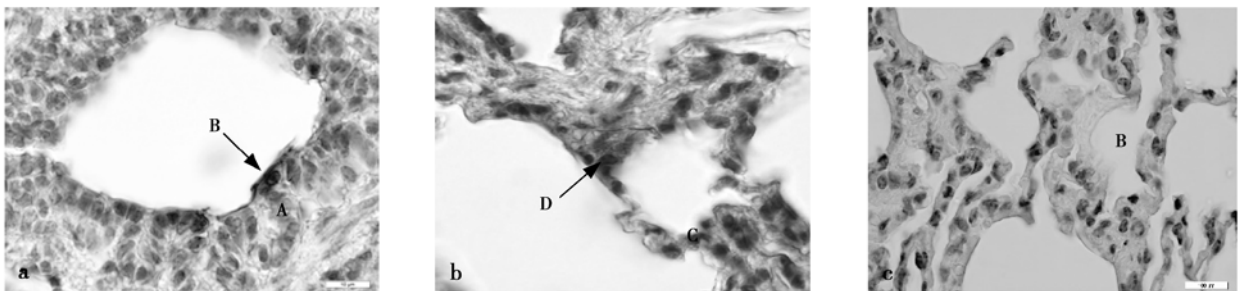
##### 2.3.1.3 脾组织

免疫组化结果显示, BNBD-4 组在健康牛脾红髓脾索 (图 3a) 中有棕黄色显色; BNBD-4 和 BNBD-5 组在健康牛脾红髓的淋巴细胞及巨噬细胞胞浆中有棕黄色显色。



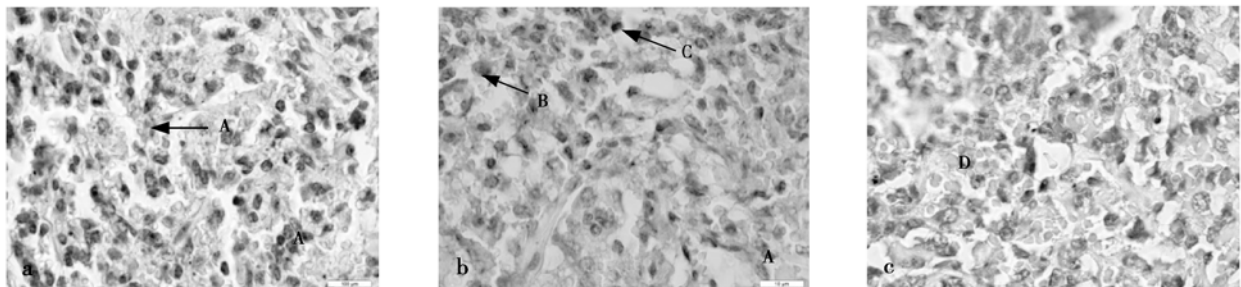
A. 固有层肠腺; B. 固有层间质; C. 肠腺上皮细胞及周围间质细胞; D. 肠组织固有层肠腺周围间质细胞

图 1 肠 BNBD-4 (a)、BNBD-5 (b) 和阴性对照 (c) 免疫组化结果



A. 细支气管; B. 细支气管上皮; C. 肺泡; D. 肺泡上皮

图 2 肺细支气管 BNBD-5 (a)、肺泡上皮 BNBD-5 (b) 和阴性对照 (c) 免疫组化结果



A. 红髓中脾索; B. 巨噬细胞; C. 淋巴细胞; D. 红髓

图 3 脾 BNBD-4 (a)、BNBD-5 (b) 和阴性对照免疫组化结果

综上，健康牛的肠固有层、细支气管、肺泡上皮细胞、脾红髓，和这些组织中散在分布的淋巴细胞、巨噬细胞胞浆及其分泌物中均存在 BNBD-4 和 BNBD-5，同时 BNBD-4 多存在于肠固有层肠腺分泌液、肠腺上皮、肠腺周围间质和脾红髓中，BNBD-5 多存在于肠固有层肠腺分泌液、肠腺周围间质、细支气管上皮、肺泡上皮和脾红髓脾索中。

健康组织中，BNBD-4 在肠中的表达量最高，在肺的表达量最低。BNBD-5 在脾中的表达量最高，在肠组织中最低，并呈现显著性差异；就各器官 BNBD-4、5 之间表达量比较而言，在肺里 BNBD-5 显著高于 BNBD-4（图 4）。

2.3.2 病变肺组织中 BNBD-4 和 BNBD-5 的表达情况

2.3.2.1 渗出性炎症的肺组织

该样本炎症反应严重，肺泡及支气管内充满炎性

细胞及渗出物。

免疫组化结果显示，BNBD-4 在肺组织的淋巴细胞胞浆、肺泡上皮细胞胞浆及支气管黏膜下层结缔组织等处分布（图 5）。

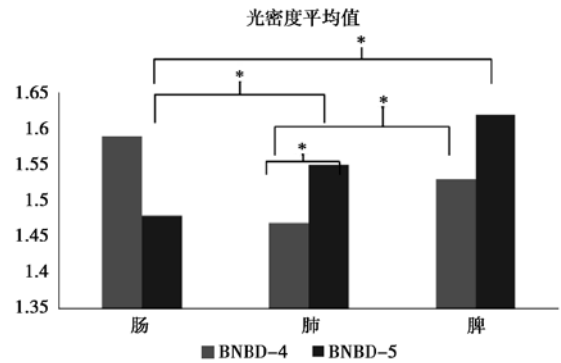
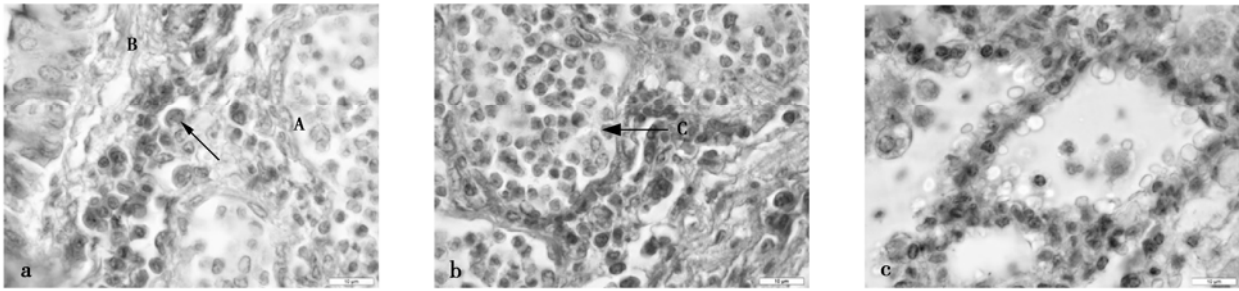


图 4 健康组织中牛防御素 4、5 分布差异



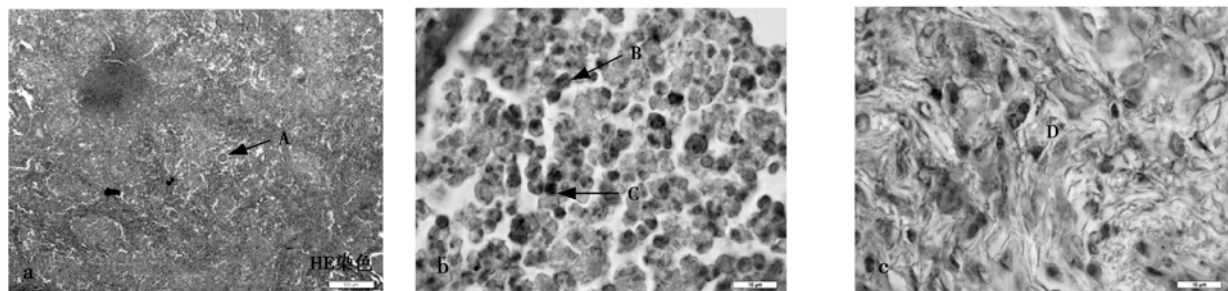
A. 淋巴细胞胞浆；B. 支气管黏膜下层结缔组织；C. 肺泡上皮细胞胞浆

图 5 渗出性炎症肺组织 BNBD-4 (a、b) 及阴性对照 (c) 免疫组化结果

2.3.2.2 结核性肉芽肿的肺组织

该组织病理组织学 HE 染色和抗酸染色鉴定为结核性肉芽肿（图 6a）。免疫组化结果显示（图 6b、

c），BNBD-4 在淋巴细胞和巨噬细胞胞浆内存在，另外我们发现在细支气管周围的上皮样细胞及细胞间质也出现棕黄色显色。



A. 多核巨噬细胞；B. 巨噬细胞；C. 淋巴细胞；D. 细支气管周围上皮样细胞

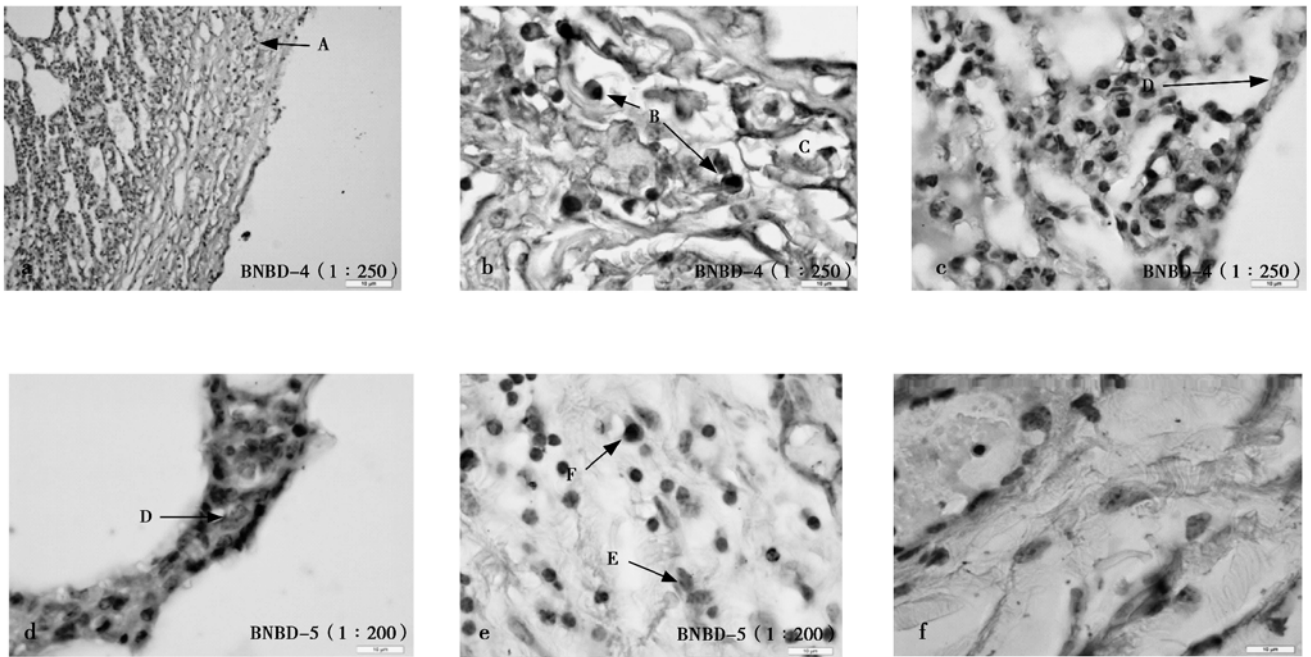
图 6 肺结核性肉芽肿 HE 染色 (a) 及免疫组化 (b、c) 结果

2.3.2.3 增生性炎症的肺组织

镜下可见肺胸膜下结缔组织增厚明显，肺泡壁增

宽。免疫组化结果显示（图 7），BNBD-4 在增厚的胸膜下纤维结缔组织（浆细胞，弹性纤维）以及肺

泡上皮细胞中存在；BNBD-5在肺泡上皮以及淋巴细胞、巨噬细胞中存在较多。相比较而言，BNBD-5表



A. 增厚的胸膜下纤维结缔组织；B. 增厚的胸膜下组织中的浆细胞；C. 增厚的胸膜下组织中的弹性纤维；D. 肺泡上皮；E. 巨噬细胞；F. 淋巴细胞

图7 肺增生性炎症 BNBD-4 (a、b、c)、BNBD-5 (d、e) 和阴性对照 (f)

达较少。综上所述，在病变的牛肺中，BNBD-4、5同健康组织一样主要存在于肺泡上皮细胞，组织中的巨噬细胞以及淋巴细胞。但在增生性炎症的肺组织中发现浆细胞中也出现棕黄色显色。

应用图像分析软件对免疫组化切片进行统计分析。结果表明病变肺组织与健康肺组织相比，BNBD-4表达量升高，而BNBD-5表达量降低（图8~9），

统计学上差异显著。根据健康组织中的分布，推测可能是因为BNBD-4与BNBD-5在免疫功能上有所不同。BNBD-5主要在免疫初期作为第一道防线，被过量消耗，而BNBD-4可能主要在后期协助淋巴细胞发挥作用。关于BNBD-4、5的具体功能，截止目前尚无相关报道。本试验获得的结果可为今后研究提供参考。

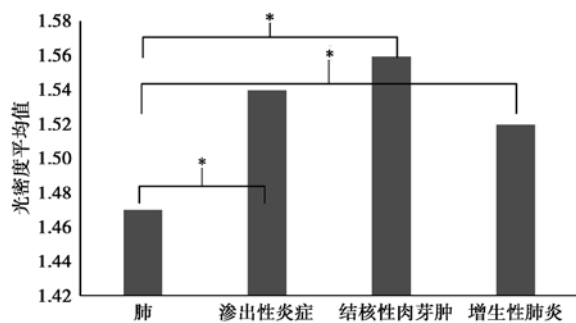


图8 BNBD4在病变肺组织中的分布

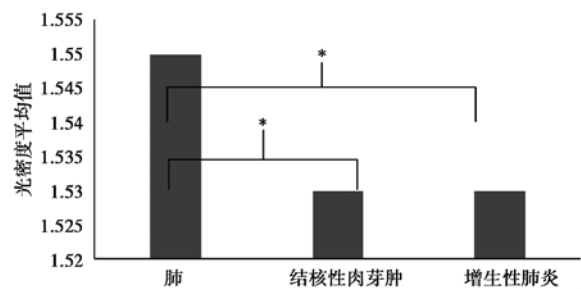


图9 BNBD5在病变肺组织中的分布

### 3 讨论

BNDN-4和BNDN-5具有明显的抑菌作用，但其在体内的具体分布情况尚未见文献报道。为了阐明

这两种防御素在组织中的分布情况，本试验制备BNDN-4、BNDN-5多克隆抗体，纯化后进行免疫组化。试验发现BNBD-4、5多存在于肠固有层肠腺分泌液、肠腺上皮和肠腺周围间质中，这与邵艳红<sup>[7]</sup>

关于绵羊胎儿  $\beta$  防御素的 sBDmRNA-2 基因在绵羊胎儿十二指肠黏膜层上皮细胞的胞质中有表达的研究结论相符；也与邵长胜<sup>[8]</sup> 关于猪  $\beta$  防御素的 pBD-1mRNA 基因在肠黏膜上皮的柱状上皮细胞胞质内大量表达，以及 pBD-2mRNA 基因在肠固有层和黏膜下层大量表达的结果相似。本试验发现 BNBD-4、5 存在于脾红髓及其间分布的淋巴细胞、巨噬细胞中，与杨银凤等<sup>[9]</sup> 发现驯鹿  $\beta$  防御素的 reBD-1mRNA 在脾脏实质的淋巴细胞和红髓的巨噬细胞内均有表达的结论相似。另外邵艳红<sup>[7]</sup> 的研究还证明绵羊胎儿  $\beta$  防御素基因在肺泡上皮细胞中有表达，与本试验结果一致。说明在各种哺乳动物中  $\beta$  防御素的表达部位相似。除此之外，本试验还在细支气管上皮细胞，肠腺间质细胞发现 BNBD-4、5 的存在。另外，在增生性炎症肺组织的浆细胞中也发现 BNBD-4、5 的分布。

分析认为 BNBD-4、5 存在于肠固有层上皮细胞以及 BNBD-5 存在于细支气管上皮、肺泡上皮细胞中，二者是作为第一道物理屏障——上皮层分泌的有效成分参与天然免疫。肠腺分泌液中存在 BNBD-4、5，说明肠隐窝中潘氏细胞可以少量分泌 BNBD-4、5。而在实质器官脾红髓的脾索中存在 BNBD-4、5 说明 BNBD-4、5 可能是作为免疫细胞的有效成分直接参与机体的免疫反应。

综上所述，本试验通过制备 BNBD-4、5 多克隆抗体并测得其分布情况，初步确定了 BNBD-4、5 发

挥作用的场所，可为进一步研究  $\beta$  防御素在抗菌抑菌中发挥的作用提供参考。

#### 参考文献：

- [1] Shamova O, Brogden K A, Zhao C, et al. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes [J]. *Infection & Immunity*, 1999, 67 (8): 4106-4111.
- [3] Cunliffe R N, FRAJ Rose, Keyte J, et al. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2001, 48 (2): 176-185.
- [4] Hiroki T, Jun Y, Zaragoza M M, et al. Paneth cell alpha-defensins from rhesus macaque small intestine [J]. *Infection & Immunity*, 2004, 72 (3): 1470-1478.
- [5] 孙岩, 温俊歌, 薄联峰, 等.  $\beta$ -防御素在天然免疫中的作用 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (5): 120-122.
- [6] 康静静. 牛中性粒细胞  $\beta$ -防御素 4 和 5 成熟肽的毕赤酵母表达及其抗分枝杆菌活性研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [7] 邵艳红.  $\beta$ -防御素 (sBD-2) 在绵羊胎儿肺、肠、生殖道内的表达变化与分布研究 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2008.
- [8] 邵长胜. 三个品种猪肠道  $\beta$ -防御素表达与特性分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [9] 杨银凤, 赵艳芳, 都格尔斯仁. 驯鹿  $\beta$  防御素-1 (reBD-1) 基因在组织中表达的原位杂交检测 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29 (9): 725-726.

## • 信息 • 欢迎订阅 《畜牧与兽医》合订本

2008—2012 年精装合订本，每年均分上下 2 册，每套定价 180 元。另加邮资每套 10 元。另有少量以下精装合订本供应：1992—1994 年间，每年每本 14 元；1995 年，每本 18 元；1996 年，每本 22 元；1997 年，每本 25 元；1998 年，每本 28 元；1999 年，每本 29 元；2000 年，每本 30 元；2001 年，每本 30 元；2002 和 2003 年，每套分上下 2 册，每套定价均为 60 元；2004 年分上下 2 册，每套定价 70 元；2005 年和 2006 年均分上下 2 册，每套定价 80 元；2007 年精装合订本，分上下 2 册，每套定价 100 元。需要者请直接汇款至本刊编辑部。

联系电话：(025) 84395701 地址：江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学内 邮编：210095