

猪 Btl5 基因的克隆、表达分析及对 NF- κ B 信号通路的调控作用

包琦^{1, 2, 3} 赵凯¹ 段子渊²

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 高原生物适应与进化重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所 高原鱼类进化与功能基因组学实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所 遗传资源中心, 北京 100101; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 猪类嗜乳脂蛋白 5 (Btl5) 属于嗜乳脂蛋白家族, 其同源蛋白多为免疫调节蛋白, 为探索 Btl5 的序列特征及其功能, 利用反转录 PCR (RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术对 Btl5 基因 cDNA 全长进行克隆及序列分析, 采用定量 PCR 技术检测 Btl5 在猪不同组织中的表达丰度, 利用报告基因法检测 Btl5 对 NF- κ B 信号通路的影响。克隆得到 Btl5 基因 cDNA 全长共 3 334 bp, 包含 1 680 bp 的开放读码框, 可编码长度为 559 个氨基酸残基的多肽链。蛋白结构预测表明 Btl5 编码的蛋白含有信号肽、两段免疫球蛋白结构域、跨膜结构域和 B30.2 结构域。定量 PCR 分析表明, 在检测的 11 个组织中, Btl5 只在空肠中具有较高水平的表达。报告基因检测结果显示 Btl5 对 NF- κ B 信号通路有一定的抑制作用。研究结果说明, Btl5 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路参与调节肠道免疫。

关键词: 猪; 类嗜乳脂蛋白 5; 表达分析; 报告基因检测; 核因子 κ B

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016-1151

Cloning, Expression Analysis and Regulation to NF- κ B Pathway of Btl5 in Porcine

BAO Qi^{1, 2, 3} ZHAO Kai¹ DUAN Zi-yuan²

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Laboratory of Plateau Fish Evolutionary and Functional Genomics, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Genetic Resource Center, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Porcine butyrophilin-like 5 (Btl5) belongs to butyrophilin family and most of its homologous proteins are immune regulators. In order to explore the sequence characteristics and function of Btl5, full-length cDNA of Btl5 was cloned and characterized by reverse transcription PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Then the mRNA expression abundances of Btl5 in different tissues were detected using quantitative PCR, and its effect on NF- κ B pathway was detected by reporter gene assay. The full length cDNA of Btl5 was 3 334 bp containing a 1 680 bp open reading frame (ORF) encoding 559 amino acids. Structural analysis showed that this protein was a transmembrane protein, and its extracellular region contained a signal peptide, two immunoglobulin domains, its intracellular region was B30.2 domain. Quantitative PCR analysis showed that Btl5 transcripts almost exclusively expressed in jejunum among 11 detected tissues. Reporter gene analysis indicated that Btl5 suppressed the NF- κ B pathway. The above results suggest that Btl5 may involve in intestinal immune regulation through inhibiting NF- κ B signaling pathway.

Key words: porcine; butyrophilin-like 5; expression analysis; reporter gene assay; nuclear factor κ B

收稿日期: 2016-12-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2013CB835200)

作者简介: 包琦, 女, 博士研究生, 研究方向: 分子生物学; E-mail: baoqi1988@126.com

通讯作者: 赵凯, 男, 研究员, 研究方向: 功能基因组学; E-mail: zhaokai@nwipb.cas.cn

段子渊, 男, 研究员, 研究方向: 分子生物学; E-mail: zyduan@genetics.ac.cn

嗜乳脂蛋白家族包含嗜乳脂蛋白 (Butyrophilin, BTN)、类嗜乳脂蛋白 (Butyrophilin-like, BTNL) 及 Skint (Selection and upkeep of intraepithelial T cells) 等成员,属于免疫球蛋白超家族^[1]。首先被发现的嗜乳脂蛋白是牛嗜乳脂蛋白 1A1 (Butyrophilin 1A1, BTN1A1),因其可与乳脂结合,控制乳脂分泌而被定义为嗜乳脂蛋白^[2,3]。之后的研究发现,多数嗜乳脂蛋白基因定位于主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 区段内^[4],且胞外结构域与 B7 共刺激分子同源,暗示该类基因可能参与免疫调节过程^[5]。目前针对嗜乳脂蛋白家族的研究主要集中于人和小鼠中^[6]。根据 Ensembl 数据库 (<http://asia.ensembl.org/index.html>),人的基因组共包含 12 个嗜乳脂蛋白基因:BTN1A1、BTN2A1、BTN2A2、BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3、BTNL2、BTNL3、BTNL8、BTNL9、ERMAP (红细胞膜相关蛋白)和 MOG (髓鞘少突胶质细胞糖蛋白),其中 BTN3A1 具有激活 γ 982 T 细胞的功能^[7,8],BTNL2 的剪切突变与结节病相关^[9],BTNL8 可增强 T 细胞活化^[10],MOG 是风疹病毒感染宿主的受体^[11]。鼠的基因组中包含 18 个嗜乳脂蛋白基因: *Btn1a1*、*Btn2a2*、*Btnl1*、*Btnl2*、*Btnl4*、*Btnl6*、*Btnl9*、*Btnl10*、ERMAP、MOG 和 *Skint1-Skint8*,其中 *Btn1a1*、*Btn2a2* 和 *Btnl2* 具有抑制 T 细胞活化的功能^[12-14],*Skint1* 可调节表皮 γ δ T 细胞的发育^[15,16],*Btnl1* 具有抑制肠上皮细胞炎症因子表达的功能^[17],*Btnl1* 与 *Btnl6* 组成异源复合体促进 T 细胞的增殖^[18]。

在猪的基因组中,经 Ensembl 数据库预测得到 14 个嗜乳脂蛋白家族基因,但皆缺乏相关的功能研究。其中猪 *Btnl5* 位于 7 号染色体正链:28093234-28108144,定位于 MHC 区段内。根据 EST 数据信息,*Btnl5* 基因主要在肠道中表达^[19]。研究显示,同在肠道表达的鼠源 *Btnl1* 可抑制炎症因子 KC/CXCL1、MIP1 β /CCL4、IL-15 和 IL-6 的表达^[17],推测 *Btnl1* 可能通过抑制核因子 κ B (NF- κ B) 从而抑制上述炎症因子的表达^[17]。NF- κ B 是转录调控因子,参与多种基因的转录调控。在肠道中,模式识别受体识别病原微生物后激活 NF- κ B,从而激活 IL-1、IL-6 和 TNF α 等细胞因子的分泌,而上述细胞因子可促进 NF- κ B 进一步活化,导致炎症的放大和持续^[20]。在

炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 和肠炎模型中皆伴随有 NF- κ B 的过度活化^[21,22],因此,NF- κ B 是肠道炎症的关键调控因子。为探索 *Btnl5* 基因的序列特征,以及是否具有与鼠源 *Btnl1* 相似的生物学功能,本研究对 *Btnl5* 基因 cDNA 全长进行克隆,并对其序列进行生物信息学分析,进一步检测该基因在不同组织中的表达水平及其对 NF- κ B 信号通路的影响,旨在研究猪 *Btnl5* 基因的功能以及该基因在猪肠道疾病中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取体重均匀,生长状况良好的 1 月龄巴马香猪 3 头,屠宰后立即摘取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、空肠、结肠、大脑、肌肉、胸腺和肠系膜淋巴结保存于液氮中。肠上皮细胞系 IPEC-1 由中国农业大学伍国耀老师惠赠。NF- κ B 启动子报告基因、MyD88 质粒、 β -gal 质粒、pcDNA3.1-myc-his 质粒由本实验室保存。RNAiso plus、M-MLV 反转录酶、Prime STAR 高保真 PCR 酶、T-载体 PCR 产物克隆试剂盒、去除基因组 DNA 的反转录试剂盒、SYBR 定量 PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 购自 Takara 公司 (中国大连)。RLM-RACE 试剂盒、胎牛血清、DMEM/F12 培养基、Lipofectamine 2000 购自 life 公司 (美国)。Bright-Glo 荧光素酶检测试剂盒、RNA 提取试剂盒购自 promega 公司 (美国)。质粒小提试剂盒、琼脂糖回收试剂盒购自 OMEGA 公司 (美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照 Ensembl 中提供的猪 *Btnl5* 预测序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,扩增 *Btnl5* 片段,根据扩增得到的序列设计 5' 和 3' 端基因特异性的 RACE 引物。根据定量 PCR 要求设计 *Btnl5* 和内参基因 *GAPDH* 的引物。序列分析确定 *Btnl5* 的开放读码框后,设计包含限制性内切酶位点的上下游引物,将 *Btnl5* 的开放读码框连入 pcDNA3.1-myc-his 真核表达载体中。引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。

1.2.2 *Btnl5* 基因 cDNA 全长克隆 空肠组织总 RNA 按照 promega RNA 提取试剂盒提取,分别使用 1% 琼脂糖电泳及紫外分光光度计检测 RNA 完整性、纯

表 1 引物序列信息

引物	序列 (5'-3') (酶切位点加下划线)	用途
Btnl5 F	TGCTGCTGAGTTGAGAGACGCTT	片段扩增
Btnl5 R	GCTGAGCATAAAGCAGCAACTGA	片段扩增
Gene Racer 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5' 全长克隆 (试剂盒提供)
5' RACE Primer	GCCCGCCCTACATAACCAGCCAAC	5' 全长克隆
3' RACE Primer 1	TCTGCCGCTTCAAGCCTTGTAGT	3' 全长克隆
Gene Racer 3' Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	3' 全长克隆 (试剂盒提供)
3'RACE Primer 2	TGTGTGTTTATGAGAATAGTCAGTTCTGTC	3' 全长克隆
3' Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	3' 全长克隆 (试剂盒提供)
Btnl5 QF	CTGGCTTGTGGGAAGTTTACTGA	定量 PCR
Btnl5 QR	TGTGGAGAACCTGCTGAAGGGATAG	定量 PCR
GAPDH F	GGTGAAGCTCGGACTGAACG	定量 PCR
GAPDH R	CCGTGGTGGAAATCATACTG	定量 PCR
Btnl5-myc-F	TGAACACTCGAGGGAAATGGAGGAT	构建 Btnl5 表达载体
Btnl5-myc-R	GGGAATTCCTGGGGACACAGCCTC	构建 Btnl5 表达载体

度及浓度。空肠 cDNA 第一链按照 M-MLV 反转录酶说明书反转录获得,用于 Btnl5 片段扩增。5'RACE cDNA 第一链及 3'RACE cDNA 第一链按照 RLM-RACE 试剂盒说明书反转录获得。PCR 扩增使用 Prime STAR 高保真酶,反应体系皆为 50 μ L : 2 \times Prime STAR Max Premix 25 μ L, 上下游引物各 1.25 μ L, cDNA 2 μ L, dd H₂O 20.5 μ L。Btnl5 片段扩增条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,59 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。5'RACE 扩增退火温度为 55 $^{\circ}$ C,其余条件如 Btnl5 片段扩增。3'RACE 扩增以 Gene Racer 3'Primer 和 3'RACE Primer 1 为引物扩增 16 个循环,PCR 产物回收后作为模板以 3' RACE Primer 2 和 3'Nested Primer 为引物扩增 18 个循环,其他扩增条件如 Btnl5 片段扩增。所有 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、琼脂糖凝胶回收后进行加 A 反应,与 PMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。

1.2.3 生物信息学分析 将测序得到的 3 段序列使用 SeqMan^[23] 拼接,得到 Btnl5 基因的 cDNA 全长。比对 Btnl5 的 cDNA 全长序列与基因组序列,得到外显子、内含子相对位置及长度。使用 NCBI 的 ORF Finder 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测基因的开放读码框,并将基因编码序列翻译为相应的氨基酸序列。使用 pI/Mw 网站 ([\[expasy.org/compute_pi/\]\(http://web.expasy.org/compute_pi/\)\) 计算 Btnl5 蛋白的分子量和理论等电点。使用 TMHMM Server v. 2.0 \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>\) 网站预测 Btnl5 是否为跨膜蛋白。使用 SMART 网站 \(<http://smart.embl-heidelberg.de/>\) 预测 Btnl5 的结构域及大小。](http://web.</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.2.4 相对定量 PCR 按照 RNAiso plus 说明书,分别提取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、空肠、结肠、大脑、肌肉、胸腺及肠系膜淋巴结总 RNA,检测 RNA 完整性及纯度。使用去除基因组 DNA 的反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。以持家基因 *GAPDH* 为内参,对 Btnl5 mRNA 在各个组织中的表达量进行相对定量分析,引物见表 1。定量 PCR 体系 10 μ L : SYBR Premix Ex Taq 5 μ L, 上下游引物各 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.6 μ L。定量 PCR 反应在 Bio-Rad CFX96 进行,反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,60 $^{\circ}$ C 检测 30 s,40 个循环;65 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C,0.5 $^{\circ}$ C/5 s 绘制溶解曲线。每个组织设二次技术重复,相对定量结果采用 2^{- Δ CT} 法进行计算。

1.2.5 Btnl5-myc 真核表达载体的构建 以 Btnl5-T 载体为模板,以 Btnl5-myc-F 和 Btnl5-myc-R 为引物,使用高保真酶扩增 Btnl5 编码区。扩增体系 50 μ L : 2 \times Prime STAR Max Premix 25 μ L,上下游引物各 1.25 μ L,模板 2 μ L,dd H₂O 20.5 μ L。扩增条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,59 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延

伸 15 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。产物经电泳鉴定后进行胶回收, 回收产物和 pcDNA3.1-myc-his 载体分别经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后使用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 酶切鉴定并测序鉴定。

1.2.6 细胞培养及转染 猪肠上皮细胞系 IPEC-1 培养于完全培养基 (DMEMF/12, 10% FBS, 青链霉素双抗) 中, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 。按照每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板, 待细胞覆盖率达到 70%–80% 时, 按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染, 实验分 3 组, 每组 3 个复孔。每孔转染质粒 NF- κ B 50 ng、 β -gal 25 ng, 空白对照组同时转染 pcDNA3.1-myc-his 300 ng, MyD88 对照组同时转染 MyD88 100 ng、pcDNA3.1-myc-his 200 ng, 实验组同时转染 MyD88 100 ng、Btl5-myc 200 ng。

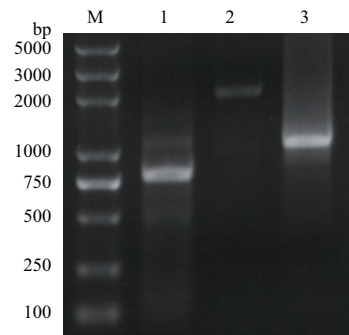
1.2.7 荧光素酶报告基因检测 IPEC-1 细胞系转染 24 h 后, 使用生理盐水清洗, 加入 100 μ L 细胞裂解液 (20 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Nonidet P-40, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂, pH 7.5), 4 $^{\circ}$ C 震荡裂解细胞 30 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清检测荧光素酶活性及 β -gal 活性。荧光素酶活性检测: 20 μ L 蛋白上清与 20 μ L 荧光素酶底物混匀后立即用荧光检测仪检测活性。 β -gal 活性检测: 20 μ L 蛋白上清、100 μ L ONPG 加 450 μ L Z buffer (60 mmol/L Na $_2$ HPO $_4$, 40 mmol/L NaH $_2$ PO $_4$, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO $_4$, pH 7) 颠倒混匀后 37 $^{\circ}$ C 静置反应至溶液变黄, 加 1 mol/L 的碳酸钠 200 μ L 终止反应, 酶标仪检测 410 nm 处吸收值。荧光素酶活性与 β -gal 活性比值即为报告基因的表达活性。

2 结果

2.1 Btl5 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

实验分 3 段克隆 Btl5 全长: 5'RACE、Btl5 片段和 3' RACE (图 1), 5'RACE 在 750 bp 左右有明显条带。Btl5 片段在 2 000 bp 左右有特异性条带。3' RACE 经巢式 PCR 扩增后在 1 000 bp 处得到明显条带。3 段均送多个阳性克隆进行测序鉴定。将测序得到的 3 段序列拼接得到 Btl5 基因 cDNA 全长共 3 334 bp, 与基因组序列比对得到 11 个外显子,

外显子长度分别为 302、144、95、348、282、201、21、27、27、27 和 1 860 bp (图 2)。经 NCBI 网站的 ORF Finder 预测, 5' 非编码区 456 bp, 3' 非编码区 1 198 bp, 开放读码框为 1 680 bp, 编码 559 个氨基酸残基的多肽链。pI/Mw 网站推算 Btl5 蛋白分子量为 61.7 kD, 理论等电点为 5.1。TMHMM Server v. 2.0 预测 1–247 氨基酸为胞外区, 248–270 氨基酸为跨膜区, 271–559 氨基酸为胞内区。经 SMART 预测胞外区包含信号肽、两段免疫球蛋白结构域, 胞内区为 B30.2 结构域 (图 3)。



M: BM5000 DNA 相对分子质量标准; 1: 5'RACE 扩增产物; 2: Btl5 片段扩增产物; 3: 3'RACE 扩增产物

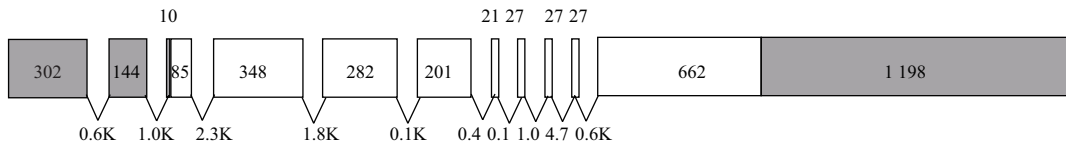
图 1 Btl5 基因 cDNA 全长的克隆

2.2 定量 PCR 检测 Btl5 在不同组织的表达水平

定量 PCR 结果显示, 所检测的心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、空肠、结肠、大脑、肌肉、胸腺及肠系膜淋巴结 11 种组织中, Btl5 主要表达于空肠, 在其余 10 种组织中表达水平极低 (图 4-A)。Btl5 与内参 *GAPDH* PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳显示, Btl5 与 *GAPDH* 扩增条带在 100 bp 左右, *GAPDH* 在 11 个组织中表达相似, Btl5 只在空肠有明显条带 (图 4-B)。

2.3 Btl5-myc 重组表达质粒的构建与鉴定

以 Btl5-T 质粒为模板进行 PCR 扩增, 在 2 000 bp 处得到单一条带, 与 Btl5 编码区长度一致 (图 5)。回收的 PCR 产物与 pcDNA3.1-myc-his 连接的重组质粒经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 重组质粒双酶切产物在 5 000 bp 和 2 000 bp 左右有清晰条带, 分别与空载体双酶切所产生条



白色框和灰色框分别对应编码区和非编码区；框内或框上方数字代表外显子的碱基数；框下方数字代表内含子的碱基数

图2 Btl5 基因外显子、内含子长度及编码区相对位置

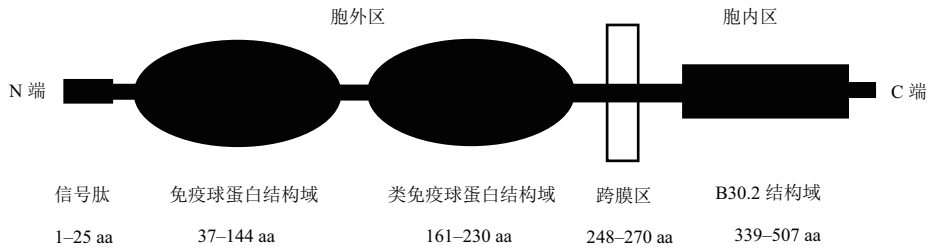
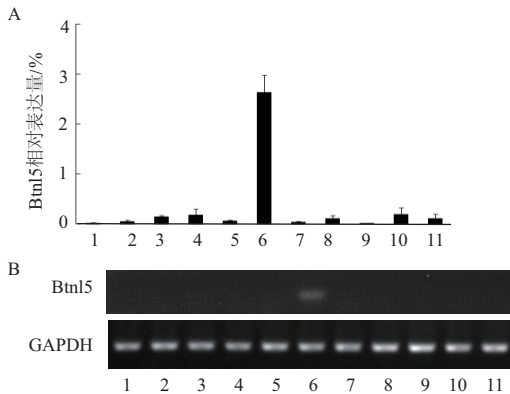


图3 预测 Btl5 蛋白结构域及各结构域长度



A: 不同组织中 Btl5 定量 PCR 结果; B: 不同组织中 Btl5 和 GAPDH 的 PCR 产物电泳图 (1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脾脏; 4: 肺; 5: 肾脏; 6: 空肠; 7: 结肠; 8: 大脑; 9: 肌肉; 10: 胸腺; 11: 肠系膜淋巴结)

图4 定量 PCR 分析猪 Btl5 的表达

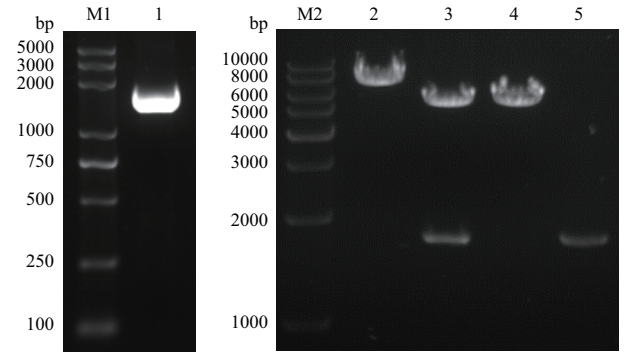
带和 Btl5 扩增产物大小相同 (图 5), 且经测序验证 Btl5 插入位置、序列均正确。

2.4 Btl5-myc 重组蛋白对 NF-κ B 信号通路的调控作用

实验表明, 肠上皮细胞系 IPEC-1 转染 MyD88 后, NF-κB 信号通路活化, 报告基因表达增高, 而同时转染 Btl5 时, 报告基因表达量降低约 50%, 差异显著 ($P=0.009$, 图 6)。

3 讨论

目前对嗜乳脂蛋白家族的研究数据较少, 但普遍认为嗜乳脂蛋白是新的免疫调节蛋白家族 [6, 24]。



M1: BM5000 DNA 相对分子质量标准; 1: Btl5 扩增产物; M2: 1kb DNA 相对分子质量标准; 2: 重组质粒单酶切产物; 3: 重组质粒双酶切产物; 4: 空载体双酶切产物; 5: Btl5 扩增产物

图5 Btl5 ORF 扩增和 Btl5-myc 表达载体酶切鉴定

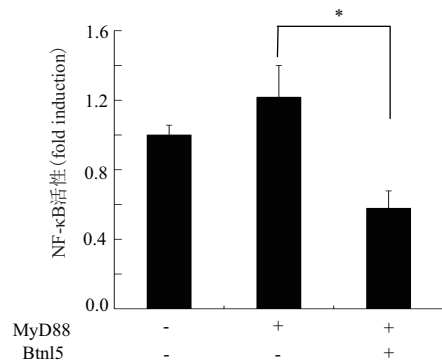


图6 Btl5 抑制 NF-κ B 信号通路

本研究克隆得到猪 Btl5 基因 cDNA 全长共 3 334 bp, 其中包含 456 bp 的 5' 非编码区和 1 198 bp 的 3'

非编码区,以及 1 680 bp 的开放读码框,编码 559 个氨基酸。经软件预测 Btl5 蛋白是一个跨膜蛋白,胞外是两段免疫球蛋白结构域,胞内是 B30.2 结构域。含有免疫球蛋白结构域的膜蛋白属于免疫球蛋白超家族,该类蛋白通过结合目的蛋白参与识别、粘附、信号传递等功能^[25]。而胞内的 B30.2 结构域是真核生物中最常见的结构域之一^[26],但其功能目前尚不清楚,Perfetto 等分析认为该结构域作为接头蛋白,与其他蛋白形成蛋白复合体发挥作用^[26]。因此推测 Btl5 可能通过与其他蛋白相互结合发挥功能。

在检测的 11 个组织(心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、空肠、结肠、大脑、肌肉、胸腺和肠系膜淋巴结)中, Btl5 仅在空肠检测到较高表达水平,具有明显的组织特异性,与 EST 信息相符^[19]。肠道是机体对抗外来入侵的第一道屏障,哺乳动物肠道内含有大量细菌,在肠道内执行重要的新陈代谢功能。这些细菌中的多数在其他组织中会引起强烈的宿主反应,却能与肠道细胞并存,甚至促进肠道的稳定。其机制远未研究清楚,但越来越清楚的是 NF- κ B 在维持肠道稳定方面起到了关键性的作用^[27]。

本研究发现 Btl5 对 MyD88 激活的 NF- κ B 信号通路有抑制作用。NF- κ B 信号通路对细胞存活、肠道紧密连接具有重要作用^[28],同时可通过调控炎症因子的表达对抗微生物感染,防止致病菌侵入。但过量的炎症因子会破坏细胞间的紧密连接,致使肠上皮细胞渗透性增加^[29],增加癌症及自身免疫疾病发生的风险^[30]。为防止 NF- κ B 信号通路过度活化,机体会同时启动 NF- κ B 的负向调节。如 NF- κ B 的活化启动 I κ B α (Inhibitor of NF- κ B) 的表达,终止下游基因转录^[31]; Lawrence 等^[32]研究发现,活化的 IKK α 加速 p65 的降解;此外, A20 亦可负调控 NF- κ B 的表达^[33]。通过报告基因检测发现, Btl5 同样具有抑制 NF- κ B 信号通路的作用,推测 Btl5 可能参与 NF- κ B 的负调控过程。但 Btl5 对 NF- κ B 下游基因是否具有广泛的抑制作用及其抑制 NF- κ B 信号通路的机制,还有待进一步研究。

4 结论

克隆了猪 Btl5 基因 cDNA 全长 3 334 bp,包含 1 680 bp 的开放读码框,编码 559 个氨基酸残基的

多肽链。在检测的 11 个组织(心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、空肠、结肠、大脑、肌肉、胸腺、肠系膜淋巴结)中, Btl5 只在空肠中具有较高水平的表达,并且具有抑制 NF- κ B 信号通路的作用。

致谢

本研究在实验和文稿修改过程中得到了中国科学院生物物理研究所李舸研究员及本实验室许崇凤、张瑞莹助理研究员的无私帮助和大力支持,本文工作得到国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB835200)资助,在此深表感谢。

参考文献

- [1] Afrache H, Gouret P, Ainouche S, et al. The butyrophilin (BTN) gene family: from milk fat to the regulation of the immune response [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64 (11): 781-794.
- [2] Heid HW, Winter S, Bruder G, et al. Butyrophilin, an apical plasma membrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 728 (2): 228-238.
- [3] Jeong J, Rao AU, Xu J, et al. The PRY/SPRY/B30.2 domain of butyrophilin 1A1 (BTN1A1) binds to xanthine oxidoreductase: implications for the function of BTN1A1 in the mammary gland and other tissues [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (33): 22444-22456.
- [4] Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, et al. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex [J]. *Genomics*, 2001, 71 (3): 351-362.
- [5] Arnett HA, Viney JL. Immune modulation by butyrophilins [J]. *Nature reviews Immunology*, 2014, 14 (8): 559-569.
- [6] Rhodes DA, Reith W, Trowsdale J. Regulation of Immunity by Butyrophilins [J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 28 (34): 151-172.
- [7] Wang H, Morita CT. Sensor function for butyrophilin 3A1 in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 195 (10): 4583-4594.
- [8] Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T Cells [J]. *Immunity*, 2014, 40 (4): 490-500.
- [9] Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2 [J]. *Nature*

- Genetics, 2005, 37 (4) : 357-364.
- [10] Chapoval AI, Smithson G, Brunick L, et al. BTNL8, a butyrophilin-like molecule that costimulates the primary immune response [J] . Molecular Immunology, 2013, 56 (4) : 819-828.
- [11] Cong HL, Jiang Y, Tien P. Identification of the myelin oligodendrocyte glycoprotein as a cellular receptor for rubella virus [J] . Journal of Virology, 2011, 85 (21) : 11038-11047.
- [12] Smith IA, Knezevic BR, Ammann JU, et al. BTN1A1, the mammary gland butyrophilin, and BTN2A2 are both inhibitors of T cell activation [J] . J Immunol, 2010, 184 (7) : 3514-3525.
- [13] Sarter K, Leimgruber E, Gobet F, et al. Btn2a2, a T cell immunomodulatory molecule coregulated with MHC class II genes [J] . J Exp Med, 2016, 213 (2) : 177-187.
- [14] Swanson RM, Gavin MA, Escobar SS, et al. Butyrophilin-like 2 modulates B7 costimulation to induce Foxp3 expression and regulatory T cell development in mature T cells [J] . Journal of Immunology, 2013, 190 (5) : 2027-2035.
- [15] Barbee SD, Woodward MJ, Turchinovich G, et al. Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (8) : 3330-3335.
- [16] Turchinovich G, Hayday AC. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells [J] . Immunity, 2011, 35 (1) : 59-68.
- [17] Bas A, Swamy M, Abeler-Dorner L, et al. Butyrophilin-like 1 encodes an enterocyte protein that selectively regulates functional interactions with T lymphocytes [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (11) : 4376-4381.
- [18] Lebrero-Fernandez C, Bergstrom JH, Pelaseyed T, et al. Murine butyrophilin-like 1 and btnl6 form heteromeric complexes in small intestinal epithelial cells and promote proliferation of local T lymphocytes [J] . Frontiers in Immunology, 2016, 7 (12) : 1-13.
- [19] Gorodkin J, Cirera S, Hedegaard J, et al. Porcine transcriptome analysis based on 97 non-normalized cDNA libraries and assembly of 1, 021, 891 expressed sequence tags [J] . Genome Biology, 2007, 8 (4) : 90-105.
- [20] Jobin C, Sartor R. The I kappa B/NF-kappa B system : a key determinant of mucosal inflammation and protection [J] . Am J Physiol-Cell Physiol, 2000, 278 (3) : C451-C462.
- [21] Rogler G, Brand K, Vogl D, et al. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa [J] . Gastroenterology, 1998, 115 (2) : 357-369.
- [22] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease [J] . Gut, 1998, 42 (4) : 477-484.
- [23] Swindell SR, Plasterer TN. SEQMAN. Contig assembly [J] . Methods in Molecular Biology, 1997, 70 (70) : 75-89.
- [24] Di Marco Barros R, Roberts NA, Dart RJ, et al. Epithelia use butyrophilin-like molecules to shape organ-specific $\gamma\delta$ T cell compartments [J] . Cell, 2016, 167 (1) : 203-218.
- [25] Barclay AN. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains – a master superfamily of interaction molecules [J] . Seminars in Immunology, 2003, 15 (4) : 215-223.
- [26] Perfetto L, Gherardini PF, Davey NE, et al. Exploring the diversity of SPRY/B30. 2-mediated interactions [J] . Trends in Biochemical Sciences, 2013, 38 (1) : 38-46.
- [27] Eckmann L, Neish AS. NF-kappa B and Mucosal Homeostasis [J] . Current Topics in Microbiology & Immunology, 2011, 349 (349) : 145-158.
- [28] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells : regulators of barrier function and immune homeostasis [J] . Nature Reviews Immunology, 2014, 14 (3) : 141-153.
- [29] Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, et al. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis [J] . Faseb Journal, 2000, 14 (12) : 1749-1753.
- [30] Karin M, Greten FR. NF-kappaB : linking inflammation and immunity to cancer development and progression [J] . Nature Reviews Immunology, 2005, 5 (10) : 749-759.
- [31] Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, et al. NF-kB controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway [J] . Science, 1993, 259 (5103) : 1912-1915.
- [32] Lawrence T, Bebiën M, Liu GY, et al. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation [J] . Nature, 2005, 434 (7037) : 1138-1143.
- [33] Majumdar I, Paul J. The deubiquitinase A20 in immunopathology of autoimmune diseases [J] . Autoimmunity, 2014, 47 (5) : 307-319.

(责任编辑 狄艳红)