

**BIỂU HIỆN GEN CỦA CÁC CYTOKINE VÀ CÁC PHẦN TỬ TRUYỀN DẪN THÔNG TIN
DỊCH MÃ mRNA Ở TẾ BÀO ĐƠN NHÂN NGOẠI VI (PBMCS) CỦA LỢN
ĐỒNG NHIỄM VIRUS GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP (PRRSV)
VÀ VIRUS GÂY HỘI CHỨNG CÒI CỘC Ở LỢN CON (PCV2)**

Đồng Văn Hiếu^{1*}, Phan Hồng Diễn², Trần Thị Hương Giang¹, Wen Bin Chung²

¹*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Thú y, Đại học Khoa học và Công nghệ Bình Đông, Đà Loan*

Email : dvhieuvet@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 18.03.2015

Ngày chấp nhận: 18.05.2015

TÓM TẮT

Lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 đã trở nên phổ biến, vì vậy sự tương tác của các virus trong cơ thể vật chủ giữ vai trò hết sức quan trọng trong sinh bệnh học. Cơ chế tương tác này tới nay vẫn còn chưa được sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của các cytokine cũng như các phân tử dẫn truyền thông tin mRNA (Toll-like receptor signaling molecules) tương tác miễn dịch trong các tế bào đơn nhân ngoại vi (PBMCS) từ những lợn nhiễm PRRSV và/hoặc PCV2 đã được nghiên cứu. Sự biểu hiện của các cytokine và các phân tử truyền dẫn tín hiệu liên quan tới TLR mRNA đã được xác định bằng phản ứng định lượng RT-PCR. Lợn đồng nhiễm cả hai loại PRRSV và PCV2 dẫn tới làm tăng biểu hiện của IL-1 β và IL-10 mRNA và giảm biểu hiện đối với TNF- α và IL-6, IFN- α và IFN- β trong tế bào PBMCS. Sự tăng biểu hiện của CD14 mRNA cũng đã được ghi nhận ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2. Sự giảm biểu hiện của IRF-1 và IRF-3 cũng có thể làm giảm sự biểu hiện của các IFNs, lý do làm tăng sự nhân lên của virus PCV2 ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2.

Từ khóa: Đồng nhiễm, lợn, PRRSV, PCV2, PBMCS.

**Gene Expression of Cytokine and Toll-like Receptor Signaling molecule mRNA
in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCS) from Pigs Co-infected with
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus**

ABSTRACT

Field and experimental studies have shown that co-infection of PRRSV and PCV2 in pigs were quite common and thus the interactions between both viruses in the host might be critical to the pathogenesis of the disease. The exact interaction mechanisms are unknown and remained to be elucidated. In this study, the expression of cytokine mRNA as well as Toll like receptor signaling molecules associated with innate immunity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) from pigs infected with PRRSV and/or PCV2 were investigated. Cytokine mRNA and TLR signaling molecule expression were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. Co-infection of pigs with PRRSV and PCV2 led to up-regulated expression of IL-1 β and IL-10 mRNA and down-regulated expression of TNF- α and IL-6, IFN- α and IFN- β in PBMCS of pigs co-infected with PRRSV and PCV2. An increased expression of CD14 mRNA was noticed in pigs co-infected with PRRSV and PCV2. A down-regulated expression of IRF-1 and IRF-3 mRNA might also suppress the expression of IFNs that leads to the enhanced replication of PCV2 in pigs co-infected with PRRSV and PCV2.

Keywords: Co-infection, PCV2, pig, PBMCS, PRRSV.

Biểu hiện gen của các cytokin và các phần tử truyền dẫn thông tin dịch mã mRNA ở tế bào đơn nhân ngoại vi (PBMCS) của lợn đồng nhiễm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRSV) và virus gây hội chứng còi cọc ở lợn con (PCV2)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

PCV2 là một yếu tố chính gây ra hội chứng còi cọc ở lợn (PMWS) lần đầu tiên được ghi nhận ở Canada năm 1991. PCV2 có thể xuất hiện cùng lúc với rất nhiều bệnh khác là rối loạn sinh sản, hội chứng viêm da suy thận (PDNS) và hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS). Lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 có biểu hiện bệnh lý nghiêm trọng hơn đơn nhiễm một trong hai loại virus. Đồng nhiễm hai loại virus PCV2 và PRRSV phổ biến ở lợn và có biểu hiện các triệu chứng cấp tính và tăng cường quá trình nhân lên của PCV2. Các cytokine được tiết bởi nhiều loại tế bào giữ vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học, đặc biệt là quá trình viêm (Rossi and Gaidano, 2003). Lợn nhiễm PRRSV tăng tiết IL-1 β , IL-8, IL-10 và IFN- γ (Lunney et al., 2010), tăng biểu hiện của IL-1 β và IL-6 ở tế bào đại thực bào phế nang (Liu et al., 2009). PCV2 làm giảm biểu hiện của IFN- γ , IL-2 và IL-4 mRNA và làm tăng biểu hiện của IL-10 mRNA ở tế bào PBMCs (Darwich et al., 2003; Darwich et al., 2008). Nghiên cứu của Shi et al. (2010) trên lợn con chỉ ra rằng IL-2, IL-4, IL-6, IL-12p40 và IFN- γ giảm biểu hiện, trong khi TNF- α và IL-10 lại tăng biểu hiện ở tế bào PBMCs của lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2.

Các thụ thể (Toll-like receptors, TLRs) giữ vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch thụ động của vật chủ. Mỗi loại TLR xác định các loại phân tử kháng nguyên (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) và sinh ra một hệ thống tín hiệu, kết quả là kích hoạt quá trình dịch mã sinh ra các cytokine gây viêm hoặc kháng viêm trong cơ thể vật chủ (Krishnan et al., 2007). Sự kết hợp của các PAMPs và các TLRs kích hoạt hàng loạt các phần tử truyền dẫn tín hiệu giữ một vai trò quan trọng trong quá trình sinh đáp ứng miễn dịch thụ động thông qua các cytokine và các chemokine (Lombardo, 2008). Mục đích của nghiên cứu này là xác định sự biểu hiện của các cytokine và các tín hiệu dẫn truyền liên quan tới TLR ở PBMCs của lợn nhiễm PRRSV và/hoặc PCV2 và cung cấp một cái nhìn khái quát hơn về quá trình sinh bệnh ở lợn đồng nhiễm cả hai loại virus này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. *Chủng virus*

PRRSV HF6-7 được phân lập ở lợn bệnh tại Đài Loan năm 2004. Virus thích nghi trên tế bào MARC-145. Virus được chuẩn bị với liều 1×10^6 TCID₅₀/ml. Chủng PCV2 THF601-7 phân lập từ lợn nhiễm PMWS tự nhiên được nhân lên trên tế bào PK15. Virus được chuẩn bị với liều 1×10^6 TCID₅₀/ml.

2.1.2. *Động vật thí nghiệm*

26 con lợn (Specific Pathogen Free, SPF) 5 tuần tuổi không mắc PRRSV và PCV2 được đưa về nuôi trong các chuồng nuôi cách ly tại Trung tâm chẩn đoán bệnh động vật, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Quốc gia Bình Đông, Đài Loan.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. *Thiết kế thí nghiệm*

Lợn ở tuần tuổi thứ 6 được ngẫu nhiên chia làm 4 nhóm thí nghiệm. Nhóm 1 (đối chứng âm, n=6) được kích thích bằng 1ml môi trường 3 ngày liên tiếp và được sử dụng như đối chứng âm. Nhóm 2 (n=6) được gây nhiễm bởi 1ml PRRSV với liều 1×10^6 TCID₅₀/ml được pha loãng thành 2ml với môi trường trước khi gây nhiễm. Lợn được gây nhiễm qua đường mũi và gây nhiễm 3 ngày liên tiếp. Nhóm 3 (n=7) được gây nhiễm bởi PCV2 với liều 1×10^6 TCID₅₀/ml cũng được pha loãng thành 2ml với DMEM trước khi gây nhiễm. Lợn được gây nhiễm 1ml PCV2 mỗi mũi trong 3 ngày liên tiếp. Thêm vào đó lợn cũng được gây nhiễm 1ml PCV2 theo đường tiêm bắp một lần duy nhất vào ngày đầu tiên với liều 1×10^6 TCID₅₀/ml. Nhóm 4 (n=7) được gây đồng nhiễm với cả 2 loại virus với đường đưa, liều lượng và tần suất như nhóm 2 và 3.

Lợn thí nghiệm được cung cấp các điều kiện sống như nhau, ví dụ cùng ăn thức ăn hỗn hợp 2 lần/ngày, uống nước tự do, nhiệt độ chuồng và ẩm độ. Mẫu máu được thu thập ở ngày thứ 7, 14 và 21 sau khi gây nhiễm (days post infection, dpi). Tế bào PBMCs được thu thập và lưu ở nhiệt

độ -80°C cho tới khi sử dụng. Toàn bộ lợn được mổ khám kiểm tra vào ngày gây nhiễm thứ 21.

2.2.2. Chiết tách tế bào PBMCs

Mẫu máu lấy từ vịnh tĩnh mạch cổ của lợn được cho vào các ống chứa Ethylenediamine tetraacetic axit (EDTA). Tế bào PBMCs được tách bằng Histopaque (Sigma-Aldrich, MO, USA) và được chuẩn bị với mật độ tế bào 1×10^6 tế bào/ml.

2.2.3. Chiết tách RNA và phản ứng RT-PCR

RNA được chiết tách bởi Tripure (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) theo quy trình của nhà sản xuất.

cDNA được phiên mã ngược sử dụng PrimeScriptTMRT Kit theo quy trình của nhà

sản xuất (TaKaRa, Shiga, Japan). Mẫu cDNA định lượng và lưu giữ ở -20°C.

Phản ứng real-time PCR: Hỗn hợp 10µl gồm 1µl cDNA, 0,5µl (10µM) mỗi xuôi và mỗi ngược mỗi loại (Bảng 1), 5µl Smart Quant Green Master Mix (Protech, Taipei, Taiwan) và 3µl nước PCR (Roche, Mannheim, Germany). Hỗn hợp được đặt trong máy LightCycler 96 real time PCR (Roche, Mannheim, Germany) với chu trình nhiệt như sau 90°C trong 10 phút; 95°C trong 10 giây, 45 vòng và nhiệt độ bắt mỗi trong 15 giây. Sự biểu hiện gen của các chỉ tiêu nghiên cứu được tính theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta CT}$ đã được mô tả trước đó (Pfaffl, 2001).

Bảng 1. Các cặp mồi trong phản ứng RT-PCR

Gen	Trình tự các cặp mồi F: Mồi xuôi; R: Mồi ngược	Mã số truy cập trên Genbank
β-actin	F 5'-ACCACTGGCATTGTCA-3' R 5'-CTCCTGCTCGAAGTCC-3'	U07786
IL-1β	F 5'-AACGTGCAGTCTATGGAGT-3' R 5'-GAACACCACTTCTCTCTTCA-3'	NM214055.1
IL-4	F 5'-GCCGGGCTCGACTGT-3' R 5'-TCCGCTCAGGAGGCTCTTC-3'	NM214123
IL-6	F 5'-CTGGCAGAAAACAACCTGAACC-3' R 5'-TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC-3'	M86722
IL-10	F 5'-CGGCGCTGTCATCAATTTCTG-3' R 5'-CCCCTCTCTTGAGCTTGCTA-3'	NM214041.1
IL-12p35	F 5'-CGTGCCTCGGGCAATTATA-3' R 5'-CGCAGGTGAGGTCGCTAGTT-3'	NM213993.1
TNF-α	F 5'-AACCTCAGATAAGCCCGTCG-3' R 5'-ACCACCAGCTGGTTGTCTTT-3'	X57321
RANTES	F5'-AGCATCAGCCTCCCCATATG-3' R5'-TTGCTGCTGGGTAGAAATATTCC-3'	NM001129946.1
IFN-α	F 5'-GGACCTGGAAGCCTGTGTCA-3' R 5'-CACGGGCAGGATGATACAGAAA-3'	M28623
IFN-β	F 5'-TCAGGTGAAGAATGGTCATGTCT-3' R 5'-TAGCACTGGCTGGAATGAAACC-3'	NM001003923.1
CD14	F5'-AAACCCCCAAAGTCTGCCAA-3' R5'-AGGGCTGTGGCTCCTTTAAC-3'	NM001097445.2
LBP	F5'-ACACTCCTCCTTTTCCGCAG-3' R5'-AGCCAGTAGGGGAAGATGGT-3'	NM001128435.1
IRF-1	F5'-GCACCAGCGACCTGTACAAC-3' R5'-TCCTCATCTGTTGCAGCTTCA-3'	NM001097413.1
IRF-3	F5'-CATGGAAGTGGCCTCGGATG-3' R5'-TTTCACGGAAGTCCAGGTTG-3'	NM213770.1

Biểu hiện gen của các cytokin và các phần tử truyền dẫn thông tin dịch mã mRNA ở tế bào đơn nhân ngoại vi (PBMCS) của lợn đồng nhiễm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRSV) và virus gây hội chứng còi cọc ở lợn con (PCV2)

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích với trung bình bình phương tối thiểu (Least-square means) bằng cách sử dụng GLM (General linear models) của phần mềm SAS (Version 9.1.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Giá trị $P < 0,05$ được sử dụng để xác định sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm gây nhiễm virus, đồng nhiễm virus với nhóm đối chứng thông qua các chỉ tiêu nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự biểu hiện của các cytokine mRNA trong tế bào PBMCs

IL-1 β mRNA đã tăng biểu hiện ($P < 0,05$) ở nhóm lợn đồng nhiễm tại ngày gây nhiễm thứ 14 ($2,54 \pm 0,40$) và ngày thứ 21 ($2,87 \pm 0,48$) so với nhóm đối chứng tại cùng các thời điểm (lần lượt là $1,18 \pm 0,44$ và $1,19 \pm 0,44$). Các tác động hiệp đồng trội được ghi nhận ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 trong sự biểu hiện của IL-1 β mRNA ở ngày gây nhiễm thứ 14 ($P = 0,05$) và ngày thứ 21 ($P < 0,05$) (Hình 1).

IL-4 mRNA tăng biểu hiện ($P < 0,05$) ở ngày nhiễm thứ 14 ($4,80 \pm 0,60$) so với nhóm đối chứng ($1,09 \pm 0,65$). Sự biểu hiện của IL-6 mRNA ở nhóm lợn đồng nhiễm thấp hơn ($P < 0,05$) so với nhóm đối chứng ở ngày nhiễm thứ 7 ($0,28 \pm 0,26$ so với $1,15 \pm 0,28$), 14 ($0,32 \pm 0,26$ so với $1,10 \pm 0,28$) và 21 ($0,17 \pm 0,31$ so với $1,29 \pm 0,28$). Các tác động hiệp đồng giảm được ghi nhận ở lợn đồng nhiễm trong sự biểu hiện IL-6 mRNA ở các ngày gây nhiễm thứ 7 ($P = 0,01$) và 14 ($P < 0,01$).

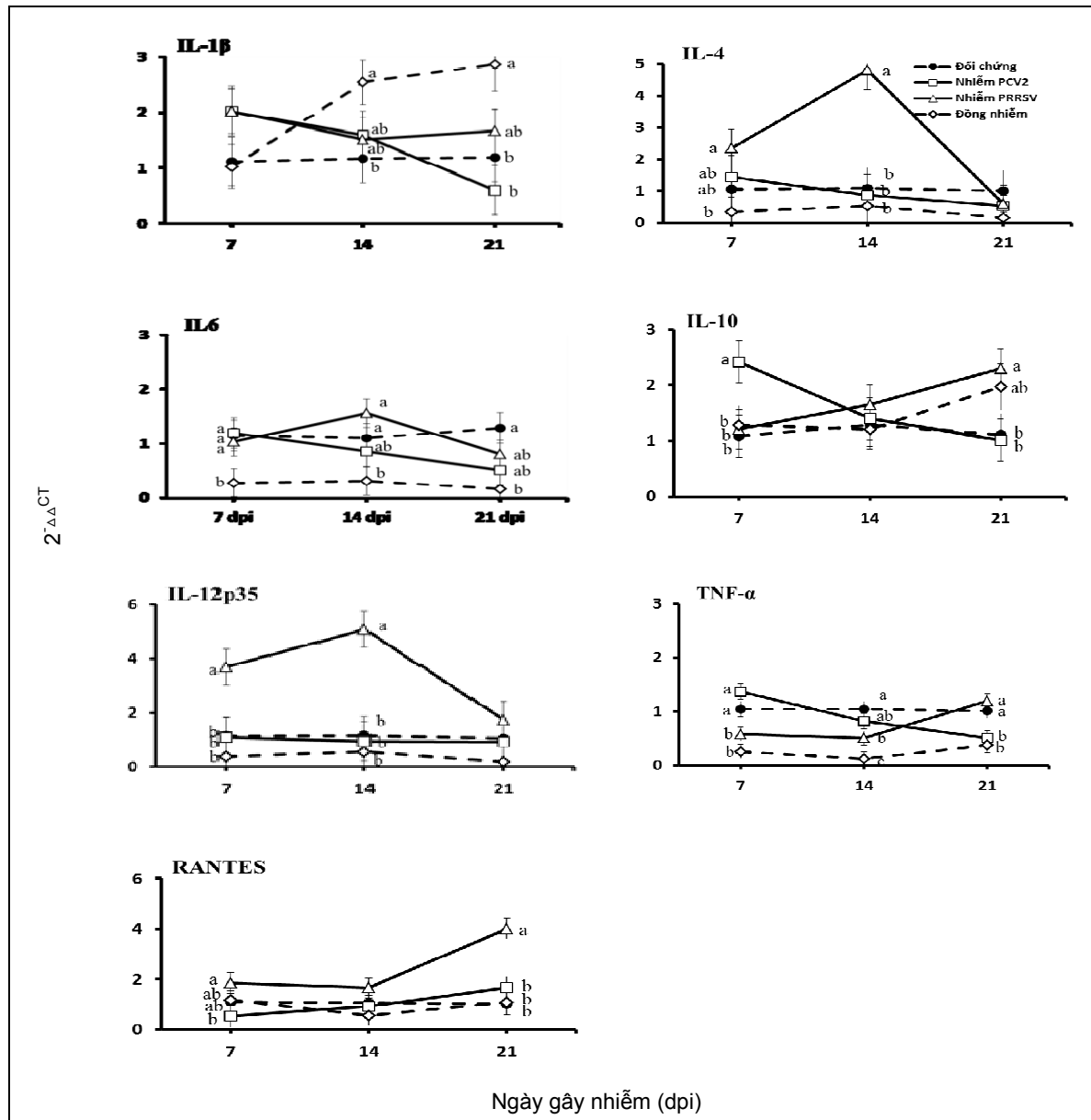
Sự biểu hiện của IL-10 mRNA ở lợn nhiễm PCV2 ngày gây nhiễm 7 ($2,42 \pm 0,38$) so với nhóm đối chứng cùng thời điểm ($1,09 \pm 0,38$). IL-10 mRNA cũng được ghi nhận tăng ở lợn nhiễm PRRSV ($2,30 \pm 0,35$) so với lô đối chứng ($1,11 \pm 0,38$). IL-10 mRNA tăng biểu hiện ở nhóm lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 ($P = 0,08$) ở ngày gây nhiễm thứ 21 ($1,97 \pm 0,42$) so với nhóm đối chứng ($1,11 \pm 0,38$).

IL-12p35 mRNA tăng biểu hiện ($P < 0,05$) ở nhóm lợn nhiễm PRRSV ngày gây nhiễm thứ 7 ($3,68 \pm 0,67$) và 14 ($5,08 \pm 0,67$) so với nhóm đối chứng ($1,13 \pm 0,72$ và $1,16 \pm 0,72$). Các tác động hiệp đồng giảm ở nhóm lợn đồng nhiễm trong sự biểu hiện của IL-12p35 mRNA ở ngày gây nhiễm 7 ($P < 0,05$) và 14 ($P < 0,01$).

TNF- α mRNA giảm biểu hiện đáng kể ($P < 0,05$) ở lợn nhiễm PRRSV và đồng nhiễm ngày gây nhiễm thứ 7 (các số liệu lần lượt là $0,58 \pm 0,13$ và $0,26 \pm 0,13$) và 14 ($0,51 \pm 0,13$ và $0,13 \pm 0,13$) so với nhóm lợn đối chứng ở cùng thời điểm ($1,04 \pm 0,14$ và $1,05 \pm 0,14$). Sự biểu hiện của cytokine này cũng được ghi nhận giảm ($P < 0,05$) ở nhóm nhiễm PCV2 ($0,51 \pm 0,14$) và đồng nhiễm ở ngày gây nhiễm thứ 21 ($0,39 \pm 0,15$) so với lô đối chứng ($1,02 \pm 0,14$). Các tác động hiệp đồng giảm ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 được ghi nhận ở các ngày gây nhiễm 7 ($P < 0,01$), 14 ($P < 0,01$) và 21 ($P < 0,05$).

RANTES mRNA tăng biểu hiện ($P < 0,05$) ở nhóm lợn nhiễm PRRSV ngày gây nhiễm thứ 21 ($4,00 \pm 0,41$) so với nhóm đối chứng cùng thời điểm gây nhiễm ($1,02 \pm 0,45$).

Sự giảm biểu hiện của IL-4 và IL-12p35 ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 có thể dẫn tới một ức chế miễn dịch ở cơ thể lợn mắc bệnh. IL-10 giữ vai trò quan trọng như một chất ức chế đáp ứng miễn dịch (Sabat, 2011). IL-10 ức chế miễn dịch thông qua việc ức chế hoạt động của tế bào Th1, tế bào giết tự nhiên và đại thực bào (Couper et al., 2008). Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng IL-10 mRNA tăng biểu hiện cả ở 2 nhóm nhiễm PRRSV hoặc PCV2. Ở nhóm đồng nhiễm IL-10 mRNA có xu hướng tăng biểu hiện ($P = 0,08$) hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Shi et al. (2010) khi nghiên cứu sự đồng nhiễm hai loại virus này ở lợn con. Sự tăng biểu hiện của IL-10 mRNA cùng với sự giảm biểu hiện của IL-2, IL-4, IL-12p35 và TNF- α có thể là nguyên nhân ức chế nhân ức chế sinh đáp ứng miễn dịch ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2.



Hình 1. Sự biểu hiện của các cytokine mRNA ở tế bào PBMCs của lợn đối chứng, nhiễm PRRSV, PCV2 và đồng nhiễm cả hai loại virus

Ghi chú: Số liệu được xác định bằng phản ứng RT-PCR và biểu hiện bởi tỷ lệ của cytokine/ β -actin. Số liệu được thể hiện mean $\pm$ SE. Các ký tự chữ thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

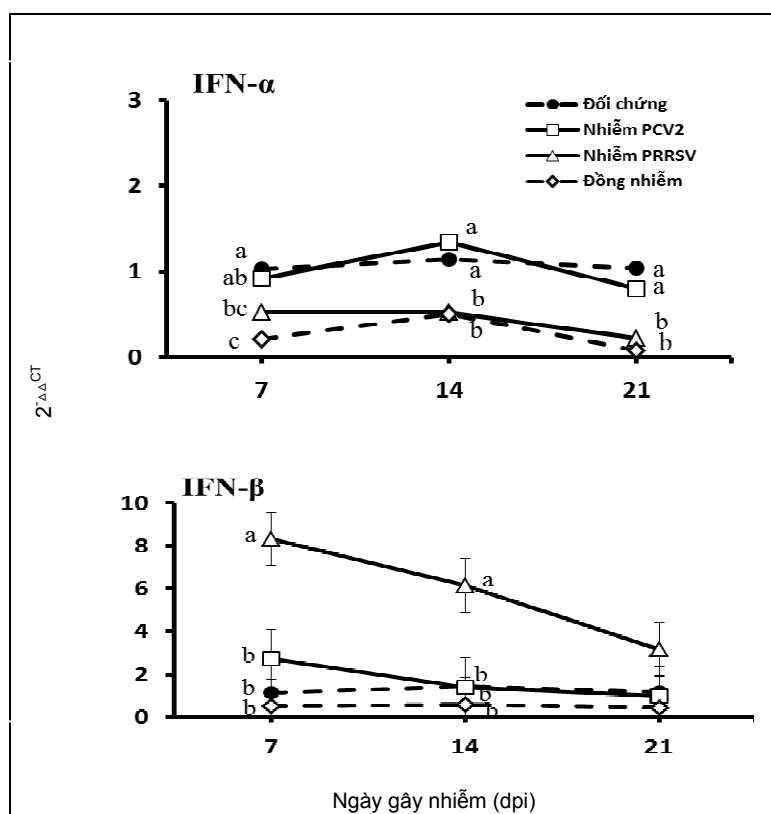
3.2. Sự biểu hiện của các interferon type I ở tế bào PBMCs

Sự biểu hiện của IFN- α mRNA ở nhóm lợn nhiễm PRRSV và đồng nhiễm thấp hơn ($P < 0,05$) ở lợn đối chứng ở ngày gây nhiễm thứ 7 (các số liệu lần lượt là $0,52 \pm 0,17$; $0,21 \pm 0,17$ và $1,03 \pm 0,19$), 14 ($0,52 \pm 0,17$; $0,50 \pm 0,17$ và $1,14 \pm 0,17$) và 21 ($0,22 \pm 0,17$; $0,08 \pm 0,20$ và $1,04 \pm 0,19$) IFN- β

mRNA tăng biểu hiện ở nhóm lợn nhiễm PRRSV ở ngày gây nhiễm 7 ($8,31 \pm 1,25$) và 14 ($6,14 \pm 1,25$) so với nhóm đối chứng ở cùng thời điểm ($1,16 \pm 1,36$ và $1,45 \pm 1,36$) (Hình 2).

Yoo et al. (2010) đã kết luận rằng lợn nhiễm PRRSV giảm tiết IFN- α . Ngược lại, IFN- β mRNA tăng biểu hiện ở lợn nhiễm PRRSV (Genini et al., 2008; Gudmundsdottir and Risatti,

Biểu hiện gen của các cytokin và các phần tử truyền dẫn thông tin dịch mã mRNA ở tế bào đơn nhân ngoại vi (PBMCS) của lợn đồng nhiễm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRSV) và virus gây hội chứng còi cọc ở lợn con (PCV2)



Hình 2. Sự biểu hiện của các Interferon type I mRNA ở tế bào PBMCS của lợn đối chứng, nhiễm PRRSV, PCV2 và đồng nhiễm cả hai loại virus

Ghi chú: Số liệu được xác định bằng phản ứng RT-PCR và biểu hiện bởi tỷ lệ của cytokine/ β -actin.

Số liệu được thể hiện mean $\pm$ SE. Các ký tự chữ thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

2009). Nghiên cứu hiện tại đều ghi nhận sự giảm biểu hiện của IFN- α và IFN- β mRNA ở lợn đồng nhiễm cả hai loại virus dẫn tới một ức chế sinh đáp ứng miễn dịch ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2.

3.3. Sự biểu hiện của các tín hiệu dẫn truyền (Toll-like receptor signaling molecules) mRNA

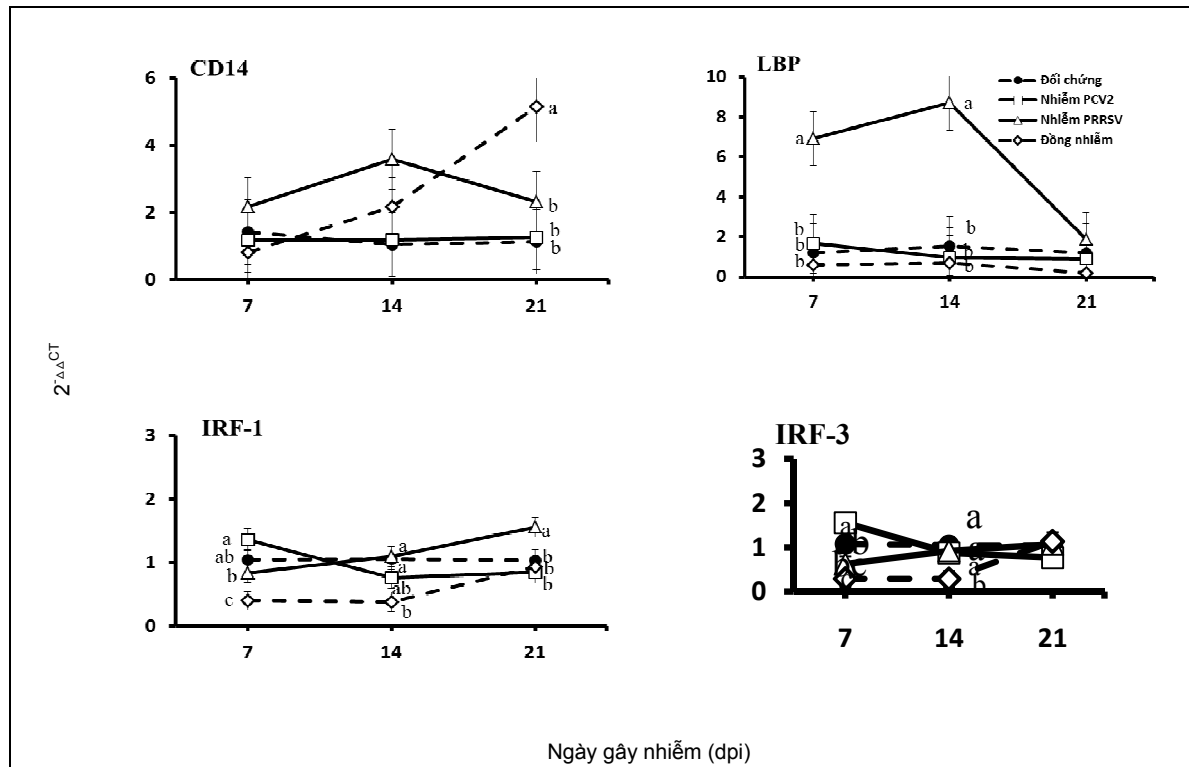
CD14 mRNA tăng biểu hiện ($P < 0,01$) ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 ngày gây nhiễm thứ 21 ($5,14 \pm 1,05$) so với lợn đối chứng ($1,13 \pm 0,96$). Một tác động hiệp đồng tăng được ghi nhận ở lợn đồng nhiễm trong sự biểu hiện CD14 mRNA ở ngày gây nhiễm thứ 21 ($P < 0,01$). (Hình 3).

Sự biểu hiện của IRF-1 mRNA giảm ở ngày gây nhiễm thứ 7 ($0,40 \pm 0,15$) và 14 ($0,38 \pm 0,15$)

so với nhóm đối chứng cùng các thời điểm ($1,04 \pm 0,17$ và $1,06 \pm 0,17$). Ở nhóm mắc PRRSV, sự biểu hiện của IRF-1 mRNA ($1,55 \pm 0,15$) cao hơn ($P < 0,05$) ở lợn đối chứng ($1,04 \pm 0,17$) ở ngày gây nhiễm thứ 21. Các tác động hiệp đồng giảm được ghi nhận ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 trong sự biểu hiện IRF-1 mRNA ở ngày gây nhiễm thứ 7 ($P < 0,01$) và 14 ($P < 0,01$).

IRF-3 mRNA giảm biểu hiện ($P < 0,01$) ở lợn đồng nhiễm ngày gây nhiễm thứ 7 ($0,29 \pm 0,18$) và 14 ($0,29 \pm 0,18$) so với lợn đối chứng ($1,08 \pm 0,19$ và $1,05 \pm 0,19$).

Machida et al. (2006) khẳng định rằng sự kết nối của đáp ứng miễn dịch thụ động với LPS liên quan tới một hệ thống các thụ thể bao gồm TLR4, MD2, CD14 và protein gắn LPS. Lợn nhiễm PRRSV làm tăng biểu hiện của IL-1 mRNA trong đáp ứng miễn dịch với LPS. Ở



nguyên cứu này IL-1 β và CD14 mRNA tăng biểu hiện rất cao vào ngày gây nhiễm thứ 21 ở nhóm lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2. Sự tăng biểu hiện của CD14 có thể là một cơ chế giải thích sự tăng tiết của IL-1 β ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2. TLR3 có thể nhận biết sợi đôi RNA của virus và kích thích một tín hiệu kích hoạt IRF-3 và NF- κ B, hay sản sinh IFN- β . Trong quá trình nhân lên của PRRSV, sợi đôi RNA được nhận biết bởi thụ thể TLR3 (Sang et al., 2008). Sự hoạt hóa TLR3 sinh ra một loạt sự dịch mã hàng loạt các gen mã hóa các chất trung gian kháng virus bao gồm cả IFN- α và β (Matsumoto et al., 2004). Nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng ở lợn nhiễm PRRSV, IRF-1 mRNA tăng biểu hiện so với nhóm đối chứng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó chỉ ra rằng một lượng lớn IRF-1 được sinh ra trong đáp ứng miễn dịch kháng PRRSV (Gudmundsdottir and Risatti, 2009). IRF-3 đã giảm biểu hiện ở lợn nhiễm PRRSV phù hợp với báo cáo trước đó (Beura et al., 2010). Ở nghiên cứu này, IRF-1 và IRF-3 mRNA giảm biểu hiện ở lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 ở ngày gây nhiễm 7 và 14, kết quả này

có thể đưa tới một giả định rằng sự ức chế biểu hiện của các IFN ở tế bào PBMCs của lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 có thể liên quan tới cơ chế ức chế biểu hiện của IRF-1 và IRF-3 (Hình 3). Sự biểu hiện của các tín hiệu truyền dẫn liên quan tới TLRs mRNA ở tế bào PBMCs của lợn đối chứng, nhiễm PRRSV, PCV2 và đồng nhiễm cả hai loại virus. Số liệu được xác định bằng phản ứng RT-PCR và biểu hiện bởi tỷ lệ của cytokine/ β -actin. Số liệu được thể hiện mean $\pm$ SE. Các ký tự chữ thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

4. KẾT LUẬN

Lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2 làm tăng biểu hiện của IL-1 β và IL-10 mRNA và giảm biểu hiện đối với TNF- α , IL-6, IFN- α , IFN- β , IRF-1 và IRF-3 trong tế bào PBMCs. CD14 mRNA tăng biểu hiện ở tế bào PBMCs của lợn đồng nhiễm PRRSV và PCV2.

Nghiên cứu này cung cấp sự hiểu biết sâu hơn, giải thích quá trình sinh bệnh ở lợn nhiễm cùng lúc hai loại virus là PRRSV và PCV2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beura LK, Sarkar SN, Kwon B, Subramaniam S, Jones C, Pattnaik AK, Osorio FA (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol.*, 84(3):1574-84.
- Couper KN, Blount DG, and Riley EM (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of immunology* 180: 5771-5777.
- Darwich L, Balasch M, Plana-Duran J, Segales J, Domingo M, and Mateu E (2003). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol.*, 84: 3453-3457.
- Darwich L, Segales J, Resendes A, Balasch M, Plana-Duran J, and Mateu E. (2008). Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Research in veterinary science*, 84: 194-198.
- Genini S, Delputte PL, Malinverni R, Cecere M, Stella A, Nauwynck HJ, Giuffra E (2008). Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 89 (10): 2550-2564.
- Gudmundsdottir I and Risatti GR (2009). Infection of porcine alveolar macrophages with recombinant chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus: effects on cellular gene transcription and virus growth. *Virus research*, 145: 145-150.
- Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, and Choi S (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Experimental & molecular medicine*, 39: 421-438.
- Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fount S, and Lai MM (2006). Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *Journal of virology*, 80: 866-874.
- Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, and Seya T (2004). Toll-like receptor 3: A link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol.*, 48: 147-154.
- Liu CH, Chaung HC, Chang HL, Peng YT, and Chung WB (2009). Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology*, 136: 266-276.
- Lombardo E (2008). Toll-like receptor signaling: Involvement in graft transplantation. *Abril-Junio* 27: 69-77.
- Lunney JK, Fritz ER, Reecy JM, Kuhard, Prucnal E, Molina R, Christopher-Hennings J, Zimmerman J, and Rowland RR (2010). Interleukin-8, interleukin-1 beta, and interferon-gamma levels are linked to PRRS virus clearance. *Viral Immunol.*, 23: 127-134.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29: e45.
- Rossi D and Gaidano G (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 88: 212-218.
- Sabat R (2011). IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21: 315-324.
- Sang Y, Ross CR, Rowland RR, and Blecha F (2008). Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection. *Viral Immunol.*, 21: 303-313.
- Shi KC, Guo X, Ge XN, Liu Q, Yang HC (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 140: 155-160.
- Yoo D, Song C, Sun Y, Du Y, Kim O, Liu HC. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 154: 48-60.