

文章编号:1001-6880(2014)10-1589-05

# 刺五加多糖对断奶仔猪外周血淋巴细胞信号传导的影响

韩 杰,边连全\*,刘显军,张 飞

沈阳农业大学畜牧兽医学院,沈阳 110866

**摘要:**为了初步探讨刺五加多糖(ASPS)调节仔猪免疫功能的作用机制,试验研究了ASPS对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞信号传导的影响。试验取28日龄断奶仔猪的外周血制备淋巴细胞悬液,分离其中的T、B淋巴细胞,分别与培养体系终浓度为0、40、80、160、320 μg/mL ASPS共同孵育,MTT法测定T、B淋巴细胞转化率;在培养体系中加入TLR4抗体初步探讨ASPS影响淋巴细胞的信号传导途径。结果表明,ASPS能显著促进体外培养的仔猪外周血T淋巴细胞转化率以及淋巴细胞IL-2的分泌量( $P < 0.05$ ),而对B淋巴细胞转化率和IL-4水平无显著影响( $P > 0.05$ )。当培养体系中无TLR4抗体时,ASPS对淋巴细胞分泌TNF-α、NO、iNOS和NF-κB因子水平有显著影响( $P < 0.05$ ),而当培养体系中加入TLR4抗体后,ASPS对上述指标无显著影响( $P > 0.05$ )。上述结果提示,T细胞可能是ASPS直接作用的靶细胞之一,ASPS调节淋巴细胞免疫功能可能是通过TLR4/NF-κB信号通路起作用。

**关键词:**刺五加多糖;淋巴细胞增殖;信号分子;仔猪

中图分类号:R828.9

文献标识码:A

## Effects of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide on Signal Transduction of Peripheral Lymphocyte of Weaning Piglets

HAN Jie, BIAN Lian-quan\*, LIU Xian-jun, ZHANG Fei

Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract:** The experiment concerning *in vitro* effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASPS) on signal transduction of peripheral lymphocyte was conducted to investigate the mechanism of immunoregulation effect of ASPS. Peripheral blood lymphocyte suspension was prepared, and T, B cells of which were separated and co-incubated with or without various concentrations of ASPS (40, 80, 160, 320 μg/mL) separately to determine lymphocyte proliferation measured by MTT assay. Anti-TLR4 was designed to discuss the lymphocyte receptor. The results showed that ASPS significantly improved the T cell proliferation and the concentration of IL-2 secreted by lymphocyte ( $P < 0.05$ ), but had no significant effect on the B cell proliferation and the concentration of IL-4 ( $P > 0.05$ ). ASPS induced the production of TNF-α, NO, iNOS as well as NF-κB secreted by lymphocyte when TLR4 antibody was not supplemented in culture solution ( $P < 0.05$ ), and these indices were not affected when TLR4 antibody was added in the culture solution ( $P > 0.05$ ). These results suggested that T lymphocyte probably as one of the direct target cells was mediated by ASPS through TLR4/NF-κB signaling pathway.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus* polysaccharide; lymphocyte proliferation; signal molecules; piglets

受免疫系统尚未发育成熟以及断奶引发的断奶应激的影响,仔猪特别容易受到环境中病原微生物的侵袭而发生免疫应激,免疫应激使仔猪在行为上表现为嗜睡、采食量减少;代谢上则使机体将用于生长的营养物质转向用于参与免疫防御,最终导致仔

猪出现生长抑制<sup>[1]</sup>。由于长期添加抗生素促生长剂引发的畜产品安全和人体健康等问题,禁止在畜禽生产中使用抗生素的呼声越来越高,开发绿色环保型饲料添加剂具有重要意义。刺五加多糖(*Acanthopanax senticosus* polysaccharide, ASPS)是从传统中草药刺五加中分离出的生物大分子多糖,其在体内、外对人类和啮齿类动物的免疫调节活性已经被一些研究所证实。但在断奶仔猪饲料中添加ASPS调节仔猪生长和免疫功能的研究鲜有报道。我们课

收稿日期:2012-12-16 接受日期:2014-04-21

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD28B01-02);科技部科技成果转化项目(2009GB2B000068);2014辽宁省博士科研启动基金资助项目(20141061)

\* 通讯作者 Tel:86-015524235093; E-mail:bianlq@163.com

题组前期的研究表明饲料添加 ASPS 能缓解免疫应激仔猪的生长抑制,改善断奶仔猪的免疫机能<sup>[2]</sup>,但 ASPS 调解断奶仔猪免疫功能的作用机制尚不清楚。本试验在前期研究基础上,通过体外培养仔猪外周血淋巴细胞,从淋巴细胞内信号传导的角度初步探讨 ASPS 影响仔猪免疫功能的作用机制,旨在为 ASPS 这种绿色饲料添加剂在养猪生产上的应用提供理论参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 不同浓度刺五加多糖溶液的配制

取刺五加根,采用热水浸提乙醇分级沉淀工艺提取,苯酚-硫酸法测得多糖纯度为 92.7%。气相色谱表明该多糖主要由葡萄糖和半乳糖组成。称取 320 mg ASPS 溶解于适量含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中,用 5% NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.2~7.4,定容至 100 mL 容量瓶中,0.22 μm 滤器过滤除菌,配制成含 3.2 mg/mL ASPS RPMI-1640 细胞培养液,于 4 ℃ 保存备用。临用前取 1 mL 上述 ASPS 细胞培养液,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液分别稀释至 8、4、2、1 mL,配制成浓度分别为 400、800、1600、3200 μg/mL ASPS 细胞培养液。

### 1.2 体外培养细胞的来源

取自 1 头 28 d 断奶、体重约 8 kg 的健康仔猪的外周血。

### 1.3 外周血淋巴细胞悬液的制备及 T、B 淋巴细胞的分离

取 2 mL 肝素抗凝全血与生理盐水 1:1 混匀后,缓缓加入 4 mL 淋巴细胞分离液,2000 rpm 离心 20 min,取乳白色淋巴细胞层约 0.6 mL,加入 5 mL RPMI-1640 完全培养液混匀,2000 rpm 离心 20 min,沉淀经 2 次离心洗涤后即得所需的淋巴细胞。将细胞悬浮于 RPMI-1640 完全培养液中,用 0.5% 台盼蓝染色计数活细胞数(>95%),调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL。T、B 淋巴细胞的分离参照高巍等(2007)方法<sup>[3]</sup>。

### 1.4 测定指标

#### 1.4.1 淋巴细胞增殖试验

取 0.08 mL T 细胞悬液含 Con A(终浓度为 5 mg/L)或 B 细胞悬液含 LPS(终浓度为 20 mg/L),加入到 96 孔平底培养板中,再加入预先稀释成不同浓度的 ASPS 溶液 0.01 mL、RPMI-1640 完全培养液 0.01 mL,使培养体系 ASPS 终浓度分别为 0、40、80、

160、320 μg/mL,每组设 5 个重复。将细胞板置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h。培养结束前 6 h,每孔加入 10 μL MTT(初始浓度为 5 mg/mL)继续培养。结束每孔加入 80 μL 10% SDS-0.04 mol/L HCl 溶液再培养 2 h,使紫色结晶完全溶解,酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长 OD 值。

#### 1.4.2 白细胞介素-2(IL-2)和白细胞介素-4(IL-4)的测定

将淋巴细胞悬液进行细胞培养,步骤同 1.4.1 淋巴细胞增殖试验,在培养的第 24、48 和 72 h,取上清液用 IL-2 和 IL-4 试剂盒(美国 R&D)测定。

#### 1.4.3 T 淋巴细胞分泌可诱导一氧化氮合成酶(iNOS)水平测定

96 孔平底培养板中每孔加入含 Con A(终浓度为 5 mg/L)的 T 细胞悬液 0.08 mL、0.01 mL anti-TLR4(初始浓度为 50 μg/mL),孵育 1 h 后加入不同浓度 ASPS 溶液 0.01 mL,使培养体系 ASPS 终浓度分别为 0、40、80、160、320 μg/mL,置细胞板于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 培养箱中培养 6 h,取上清液用 iNOS 试剂盒(美国 R&D)测定,严格按照试剂盒说明书进行。

#### 1.4.4 淋巴细胞分泌 NO 的测定

细胞培养同 1.4.3,37 ℃ 培养箱中培养 24 h,取 50 μL 上清液加入等体积 Greiss 试剂反应 20 min,测定 550 nm OD 值。将 6.9 mg NaNO<sub>2</sub> 溶于 1000 mL 双蒸水中,分别取 200、160、120、80、40、20、10、0 μL 于酶标板中,再对应分别加入 0、40、80、120、160、180、190、200 μL Greiss 试剂反应 20 min 后测定 550 nm OD 值。以 OD 值为纵坐标,浓度为横坐标做标准曲线。

#### 1.4.5 核转录因子(NF-κB)活性和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的测定

细胞板加样同 iNOS 的测定,将加样后的细胞板置于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 培养箱中培养 72 h,测定采用 NF-κB 和 TNF-α 试剂盒(美国 R&D)。

## 1.5 数据统计分析

数据经 Excel 初步处理后,采用 SPSS 13.0 统计软件的 ANOVA 进行不同处理间的单因素方差分析,采用 Duncan 法进行多重比较检验,以 P < 0.05 为显著性标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺五加多糖对外周血淋巴细胞转化率的影响

由图 1 可知,ASPS 显著提高了仔猪外周血 T 淋

巴细胞转化率( $P < 0.05$ )。与对照组相比,较高剂量的 ASPS(160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )显著促进了T淋巴细胞转化率( $P < 0.05$ ),而低剂量的 ASPS(40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )显著抑制了T淋巴细胞转化率( $P < 0.05$ )。

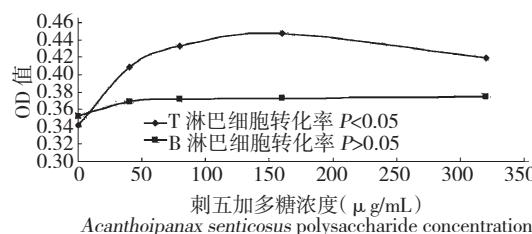


图1 刺五加多糖对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞转化率的影响( $n=5$ )

Fig. 1 Effect of ASPS on lymphocytes proliferation of cultured peripheral blood of weaned pigs ( $n=5$ )

表1 刺五加多糖对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞分泌IL-2和IL-4的影响( $n=5$ )

Table 1 Effect of ASPS on the concentration of IL-2 and IL-4 secreted by cultured peripheral blood lymphocytes of weaned pigs ( $n = 5$ )

项目 Items	刺五加多糖水平 ASPS levels ( μg/mL)					平均标准误 SEM	二次回归 P 值 Quadratic regression P-value
	0	40	80	160	320		
白介素-2 IL-2 ( pg/mL)							
24 h	19.000 <sup>a</sup>	27.543 <sup>ab</sup>	29.833 <sup>ab</sup>	49.293 <sup>b</sup>	48.967 <sup>b</sup>	4.236	0.0471
48 h	55.000 <sup>a</sup>	94.500 <sup>ab</sup>	157.000 <sup>ab</sup>	205.167 <sup>b</sup>	186.308 <sup>b</sup>	17.385	0.038
72 h	64.000 <sup>a</sup>	133.000 <sup>c</sup>	229.917 <sup>b</sup>	268.333 <sup>b</sup>	144.167 <sup>c</sup>	20.584	<0.001
白介素-4 IL-4 ( pg/mL)							
24 h	22.833	22.167	19.167	23.500	19.833	0.893	0.223
48 h	25.417	25.835	24.731	27.683	26.981	1.141	0.987
72 h	33.200	33.317	35.521	29.908	35.883	1.152	0.45

注:同行数据标注不同字母者表示差异显著( $P < 0.05$ )。下表同。

Note: Data in the same row with different superscripts had significant difference ( $P < 0.05$ ). Same as below.

## 2.3 刺五加多糖对淋巴细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、NO、iNOS 和 NF- $\kappa$ B 水平的影响

由表2可知,当培养体系无TLR4抗体时,ASPS处理对淋巴细胞分泌TNF- $\alpha$ 、NO、iNOS和NF- $\kappa$ B水平有显著影响( $P < 0.05$ )。与对照组比较,40、80、160、320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASPS处理显著提高了淋巴细胞分泌iNOS水平( $P < 0.05$ ),160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASPS组仔猪

表2 刺五加多糖对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞分泌 iNOS、NO、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $n=5$ )

Table 2 Effect of ASPS on the concentration of iNOS, NO, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  secreted by cultured peripheral blood lymphocytes of weaned pigs ( $n = 5$ )

mL)对T淋巴细胞转化率无显著影响( $P > 0.05$ )；不同浓度的ASPS对体外培养的仔猪外周血B淋巴细胞转化率均无显著影响( $P > 0.05$ )。

## 2.2 刺五加多糖对淋巴细胞分泌 IL-2 和 IL-4 水平的影响

由表1可知,在作用第24和48 h,ASPS处理虽使仔猪外周血淋巴细胞IL-2产生量显著增加( $P < 0.05$ ),但与对照组相比,只有160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASPS处理组达到了显著水平( $P < 0.05$ );在作用第72 h时,ASPS处理显著提高了淋巴细胞IL-2的分泌量,并呈二次的剂量依赖关系( $P < 0.05$ )。在作用第24、48和72 h,ASPS处理对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞分泌IL-4的影响均不显著( $P > 0.05$ )。

项目 Items	刺五加多糖水平 ASPS levels ( μg/mL)					平均标准误 SEM	二次回归 P 值 Quadratic regression P-value
	0	40	80	160	320		
白介素-2 IL-2 ( pg/mL)							
24 h	19.000 <sup>a</sup>	27.543 <sup>ab</sup>	29.833 <sup>ab</sup>	49.293 <sup>b</sup>	48.967 <sup>b</sup>	4.236	0.0471
48 h	55.000 <sup>a</sup>	94.500 <sup>ab</sup>	157.000 <sup>ab</sup>	205.167 <sup>b</sup>	186.308 <sup>b</sup>	17.385	0.038
72 h	64.000 <sup>a</sup>	133.000 <sup>c</sup>	229.917 <sup>b</sup>	268.333 <sup>b</sup>	144.167 <sup>c</sup>	20.584	<0.001
白介素-4 IL-4 ( pg/mL)							
24 h	22.833	22.167	19.167	23.500	19.833	0.893	0.223
48 h	25.417	25.835	24.731	27.683	26.981	1.141	0.987
72 h	33.200	33.317	35.521	29.908	35.883	1.152	0.45

外周血淋巴细胞 iNOS 分泌量最高。40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASPS 显著增加了淋巴细胞 NF- $\kappa\text{B}$  分泌水平 ( $P < 0.05$ )。80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ASPS 显著增加了淋巴细胞分泌 TNF- $\alpha$  的水平 ( $P < 0.05$ )。当培养体系含 TLR4 抗体时, 不同浓度 ASPS 对淋巴细胞 TNF- $\alpha$ 、iNOS 和 NF- $\kappa\text{B}$  的分泌量均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表2 刺五加多糖对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞分泌 iNOS、NO、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $n=5$ )

Table 2 Effect of ASPS on the concentration of iNOS, NO, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  secreted by cultured peripheral blood lymphocytes of weaned pigs ( $n = 5$ )

对照组	366.5556 <sup>a</sup>	733.333 <sup>b</sup>	838.333 <sup>b</sup>	880.000 <sup>b</sup>	691.166 <sup>b</sup>	53.113	<0.001
TLR4 抗体处理组	375.895	394.844	494.992	481.945	438.167	31.647	0.293
一氧化氮 NO (μg/μL)							
对照组	0.2631 <sup>a</sup>	1.375 <sup>b</sup>	2.0110 <sup>c</sup>	2.887 <sup>c</sup>	1.709 <sup>b</sup>	0.201	0.048
TLR4 抗体处理组	0.412	0.398	0.407	0.294	0.376	0.010	0.103
核转录因子 NF-κB (ng/L)							
对照组	538.333 <sup>a</sup>	788.889 <sup>bd</sup>	865.000 <sup>b</sup>	1194.444 <sup>c</sup>	677.055 <sup>ad</sup>	48.083	0.409
TLR4 抗体处理组	470.222	511.111	566.411	549.278	504.667	32.825	0.080

### 3 讨论

淋巴细胞增殖是检测淋巴细胞免疫功能的常用指标之一,T 细胞受促分裂素 Con A 刺激或 B 细胞受 LPS 刺激时的增殖情况在一定程度上可以分别反映细胞免疫和体液免疫的功能变化。本试验结果发现 ASPS 能协同 Con A 促进外周血 T 细胞增殖但不能协同 LPS 促进 B 细胞增殖,提示 T 细胞可能是 ASPS 作用的直接靶细胞之一。辅助性 T 细胞(Th)作为 T 细胞重要的亚型之一,其 Th1 型细胞分泌的细胞因子 IL-2 能有效促进 T 淋巴细胞增殖、刺激细胞免疫和介导炎症反应;Th2 型细胞产生的 IL-4 可促进 B 细胞增殖,刺激体液免疫,诱导抗体产生<sup>[4]</sup>。本研究发现 ASPS 能促进 Th1 型细胞因子 IL-2 的分泌而对 Th2 型细胞因子 IL-4 分泌无影响,此结果与以往曹丽等(2004)<sup>[5]</sup>和杨铁虹等(2005)<sup>[6]</sup>的报道相似,提示了 ASPS 可能通过作用于 T 细胞分泌 IL-2 影响机体的细胞免疫功能。

NO 由淋巴细胞内可诱导 iNOS 催化生成,是在调节免疫功能上具有广泛生物活性的信息分子。以往很多关于多糖影响 iNOS 的报道表明多糖能促进 iNOS 基因表达,提高 iNOS 活性进而促进 NO 分泌,多糖提高 iNOS 活性可能与激活 NF-κB 因子有关<sup>[7]</sup>。侯敢等(2006)报道了芦荟多糖能促进小鼠 Mφ NO 合成酶基因的表达,促进 NO 合成,用 NF-κB 抑制剂预先处理细胞,可抑制芦荟多糖诱导的 iNOS 酶基因表达,表明芦荟多糖促进的 NOS 基因表达与 NF-κB 因子的激活有关<sup>[8]</sup>。本试验表明,ASPS 显著提高了体外培养的外周血淋巴细胞内 iNOS 水平、NO 分泌量和 NF-κB 因子水平,160 μg/mL ASPS 组这些指标的水平均为最高,提示 NO 可能是 ASPS 作用于仔猪外周血淋巴细胞的信息分子,同时,ASPS 提高 iNOS 水平可能与激活 NF-κB 因子有关。

以往研究已经证明了多糖调节免疫功能是通过

首先与细胞表面受体结合介导免疫反应<sup>[9]</sup>。TLR4 受体是 Toll 受体超家族中最早被发现的成员之一,多糖受 TLR4 受体介导通过信号分子将胞外信号传导至胞内,使 NF-κB 迅速从胞浆移位到胞核促进细胞因子释放,从而调节免疫功能<sup>[10]</sup>。Yoon 等(2003)在研究桔梗根多糖时发现 TLR4 抗体预先与 Mφ 作用能使 NF-κB 迅速从胞浆移位到胞核与 DNA 结合,提示桔梗根多糖通过 TLR4/NF-κB 通路起作用<sup>[9]</sup>。本试验同 Yoon 等(2003)的试验结果相似。从本试验结果看,培养体系中无 TLR4 抗体时,淋巴细胞分泌 TNF-α、NO、iNOS 和 NF-κB 因子水平均显著升高,但这种作用在培养体系中含 TLR4 抗体时被抑制,提示 TLR4 可能是 ASPS 作用于淋巴细胞表面的受体之一,ASPS 通过 TLR4 受体介导由 NO 将细胞外信号传导至细胞内,从而调节 NF-κB 因子活性而促进细胞因子 TNF-α 的释放,ASPS 影响淋巴细胞免疫功能与 TLR4/NF-κB 信号传导系统密不可分。

综上所述,ASPS 能促进体外培养的仔猪外周血 T 细胞增殖和 IL-2 的分泌,其作用可能是受到淋巴细胞表面受体 TLR4 介导,通过 TLR4/NF-κB 信号通路起作用。

### 参考文献

- Spurlock ME. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: An overview of cytokine function. *J Anim Sci*, 1997, 75:1773-1783.
- Han J (韩杰), Bian LQ(边连全), Zhang YR(张一然), et al. Effects of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide on growth performance and blood physiology and biochemistry indexes of weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *Chin J Ani Nut*(动物营养学报), 2013, 25: 1054-1061.