

郭 晓,商云霞,王梦远,等. 中药复方多糖对鸡淋巴细胞免疫信号分子表达的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):167-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.048

中药复方多糖对鸡淋巴细胞免疫信号分子表达的影响

郭 晓¹,商云霞¹,王梦远¹,刘晓婷¹,杨红洋¹,陈 洁¹,谷新利¹

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832000)

摘要:探讨在体外环境下不同质量浓度中药复方多糖对鸡外周血淋巴细胞信号分子表达的影响。分别采用 200、100、50、25、0 $\mu\text{g/mL}$ 5 个中药复方多糖质量浓度梯度在体外条件下刺激鸡外周血淋巴细胞,采用 ELISA 法测定中药多糖作用 1、2、4 h 时细胞内环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)的含量,以及作用 24 h 时钙离子(Ca^{2+})、一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(iNOS)的分泌水平。结果表明,与对照组相比,试验组能显著提高细胞培养上清中 cAMP、cGMP 的水平($P < 0.05$)。当作用 1 h 时,100 $\mu\text{g/mL}$ 多糖处理组与其他试验组的 cAMP 差异显著($P < 0.05$);作用 2、4 h 时,200 $\mu\text{g/mL}$ 多糖组的 cAMP、cGMP 分泌水平显著高于其他试验组。与对照组相比,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 多糖组能显著提高细胞培养上清液中 Ca^{2+} 、NO 的分泌水平($P < 0.05$),25、50 $\mu\text{g/mL}$ 多糖组对淋巴细胞中 Ca^{2+} 、NO 的分泌水平无显著影响($P > 0.05$)。中药复方多糖能显著提高淋巴细胞分泌 iNOS 的水平($P < 0.05$),而与其他多糖组相比,100 $\mu\text{g/mL}$ 多糖组淋巴细胞分泌 iNOS 的水平显著提高($P < 0.05$)。中药复方多糖可通过改变 Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、NO、iNOS 等细胞内信号分子的活性或含量而启动细胞信号传导,从而调节细胞的活性和功能,促进相关基因的表达和释放,发挥免疫调节作用。

关键词:中药复方;多糖;黄麻鸡;淋巴细胞;免疫信号分子

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0167-03

中草药具有安全、低毒、低残留、不易产生抗药性等优点,被广泛研究并运用到畜禽生产中以有效增强畜禽机体抵抗病原的能力。研究发现,中草药中提取的多糖是能够调节畜禽免疫力的主要物质之一^[1]。单一活性多糖是近年来中药免疫药理学研究的热点,却鲜见关于中药复方多糖的研究。目前,中药多糖免疫调节作用的机制尚未明确。已有研究发现,中药多糖通过与免疫细胞表面受体结合,改变环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、钙离子(Ca^{2+})、一氧化氮

(NO)、一氧化氮合成酶(iNOS)等免疫细胞内信号分子的活性或含量而启动细胞信号传导,调节细胞的活性和功能,促进相关基因的表达和释放,发挥免疫调节作用^[2-3]。

朱晓庆等研究发现,中药复方免疫增强剂能在一定质量浓度范围内增强鸡的免疫调节作用^[4]。本试验以鸡外周血淋巴细胞为研究对象,在体外条件下研究一定纯度中药复方多糖对淋巴细胞中环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、钙离子(Ca^{2+})、一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)等信号分子产生的影响,为进一步揭示中药复方多糖的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

中药复方多糖是由笔者所在实验室自主开发的中药复方免疫增强剂,经水提-醇沉法提取后,由 AB-8 大孔吸附树

收稿日期:2016-01-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460673)。

作者简介:郭 晓(1989—),女,硕士研究生,主要从事中草药开发与利用研究。E-mail:1498379318@qq.com。

通信作者:谷新利,教授,博士生导师,主要从事中草药开发与利用研究。E-mail:xlgu@shz.edu.cn。

Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality[J]. Poultry Science, 2009, 88(10):2033-2041.

[10] Zhang Z F, Zhou T X, Ao X, et al. Effects of beta-glucan and *Bacillus subtilis* on growth performance, blood profiles, relative organ weight and meat quality in broilers fed maize-soybean meal based diets[J]. Livestock Science, 2012, 150(1/2/3):419-424.

[11] 李萍萍. 酵母多糖对鸡生产性能和免疫功能的影响[D]. 南宁:广西大学, 2011.

[12] 邹华锋,文美英,魏星华,等. 生猪宰前不同静养时间和屠宰方式对背长肌肌肉 pH 值和滴水损失的影响[J]. 肉类工业, 2013(5):19-21.

[13] 杨玉荣,梁宏德,尹清强,等. 益生菌和抗菌肽联合应用对肉鸡生长性能、肉品质和鸡舍氨气浓度的影响[J]. 饲料博览, 2012

(9):1-4.

[14] 吴 娟,程灵豪,高峰,等. 一水肌酸对肉鸭胴体组成及肉品质的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4):100-104.

[15] Cho J H, Zhang Z F, Kim I H. Effects of single or combined dietary supplementation of β -glucan and kefir on growth performance, blood characteristics and meat quality in broilers[J]. British Poultry Science, 2013, 54(2):216-221.

[16] 唐自钟,刘 珊,晋海军,等. 提高内切葡聚糖酶活力及其在毕赤酵母中的表达研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, 36(1):72-77.

[17] 王月超,蔡辉益,闫海洁,等. L-肉碱和赖氨酸对爱拔益加肉鸡生长性能和肉品质的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(11):2591-2600.

脂吸附解吸附后获得精制中药多糖,经苯酚-硫酸法测定中药多糖含量为 79.6%。采用灭菌蒸馏水将其配制成 200 μg/mL 的中药复方多糖母液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,于 4 ℃ 下储存备用。

1.2 试剂与仪器

葡萄糖标准品、苯酚、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙醇、丙酮、石油醚、浓硫酸均为 AR 级。鸡外周血淋巴细胞分离液(TBD,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),PBS 磷酸缓冲液(Hy Clone,赛默飞世而生物化学制品北京有限公司),胎牛血清(Gibco 公司),RPMI1640 培养基(Hy Clone),双抗(Gibco 公司)。鸡 cAMP、cGMP、Ca²⁺、NO、iNOSELISA 检测试剂盒均购自上海蓝基生物科技有限公司。

生物安全柜(Thermo 公司),CO₂ 培养箱(Thermo 公司),垂直离心机(Thermo 公司),OLYMPUS 倒置相差显微镜,Power Wave XS2 BioTek®型酶标仪。

1.3 试验动物

40 羽新疆黄麻鸡购自石河子市孵化场,按照试验动物饲养方法饲养至体质量达 1.5~2.0 kg。

1.4 试验方法

1.4.1 鸡外周血淋巴细胞的分离与培养 采用含 EDTA 的无菌采血管在鸡翅下静脉采集 2 mL 血液,将血液用等体积 PBS 液稀释混匀,将稀释的 4 mL 血液缓慢加入 4 mL 淋巴细胞分离液层上,采用 Ficoll 密度梯度离心法(22 ℃,800 g,垂直离心 30 min),收集中间层白色云雾状的外周血单核细胞(PBMC)。得到的细胞经 5 倍体积的 PBS(4 ℃)洗涤 2 次(2 500 r/min,离心 10 min),最后采用完全 RPMI1640 培养液洗涤 1 次(2 500 r/min,离心 10 min)。将细胞重悬在 1 mL 含 15% 胎牛血清的完全 RPMI1640 培养液中,于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 2 h,除去贴壁细胞,收集悬浮细胞。采用

PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次(1 500 r/min,离心 10 min),再用完全 RPMI1640 培养基重悬悬浮细胞,经台盼蓝染色,细胞存活率大于 95%,采用细胞计数板计数并调整细胞浓度至 5×10⁶ 个/mL。试验分为 5 个组,即空白对照组(多糖质量浓度为 0 μg/mL)以及不同质量浓度多糖组,多糖组的终质量浓度分别为 200、100、50、25 μg/mL。

1.4.2 淋巴细胞 cAMP 和 cGMP 的测定 按上述方法分离培养淋巴细胞,调整细胞浓度至 5×10⁶ 个/mL。取 6 个 24 孔培养板,按以上分组,每组 5 个孔,每孔加入 1 mL 淋巴细胞悬液并加入多糖,使其终质量浓度分别达到 200、100、50、25、0 μg/mL。将培养板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1、2、4 h,分时段离心收集细胞培养上清。按 ELISA 试剂盒说明书测定 cAMP、cGMP 的含量。

1.4.3 淋巴细胞 Ca²⁺、NO、iNOS 的测定 按以上方法分离培养并分组,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,以 3 000 r/min 离心 15 min,收集细胞上清液。采用 ELISA 法测定 Ca²⁺、NO、iNOS 的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.4 数据分析 各项免疫指标数据结果以“平均值±标准差”(x̄±s)表示。采用 SPSS 17.0 软件对各免疫性状结果进行单因素方差分析。统计分析结果均以 α=0.05 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 中药复方多糖对 cAMP、cGMP 含量的影响

由表 1 可知,与对照组相比,试验组显著提高了细胞培养上清中 cAMP、cGMP 的水平(P<0.05)。当作用 1 h 时,与其他试验组相比,100 μg/mL 多糖组的 cAMP 差异显著(P<0.05);当作用 2、4 h 时,200 μg/mL 多糖组的 cAMP、cGMP 分泌水平显著高于其他试验组。

表 1 中药复方多糖对鸡外周血淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量的影响

中药复方多糖终质量浓度 (μg/mL)	cAMP(ng/mL)			cGMP(ng/mL)		
	1 h	2 h	4 h	1 h	2 h	4 h
200	0.183±0.011b	0.207±0.016c	0.245±0.015c	0.165±0.011b	0.172±0.010c	0.182±0.015c
100	0.192±0.046c	0.194±0.010b	0.204±0.012b	0.143±0.004b	0.150±0.036b	0.155±0.010b
50	0.182±0.013b	0.191±0.008b	0.202±0.007b	0.133±0.026b	0.137±0.006b	0.143±0.008b
25	0.179±0.011b	0.182±0.015b	0.196±0.014b	0.127±0.007b	0.132±0.015b	0.139±0.014b
CK	0.167±0.014a	0.174±0.010a	0.182±0.010a	0.119±0.002a	0.121±0.010a	0.126±0.004a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

2.2 中药复方多糖对 Ca²⁺、NO、iNOS 含量的影响

由表 2 可知,与对照组相比,100、200 μg/mL 多糖组显著提高了细胞培养上清中 Ca²⁺、NO 的水平(P<0.05),25、50 μg/mL 多糖组对鸡外周血淋巴细胞产生 Ca²⁺、NO 的水平无显著影响。与对照组相比,试验组显著提高了细胞培养上

清中 iNOS 的水平(P<0.05),而与其他试验组相比,100 μg/mL 多糖组显著提高了淋巴细胞分泌 iNOS 的水平。

3 结论与讨论

作为细胞内重要的第二信使,cAMP、cGMP对机体免疫

表 2 中药复方多糖对鸡外周血淋巴细胞内 Ca²⁺、NO、iNOS 含量的影响

中药复方多糖终质量浓度 (μg/mL)	Ca ²⁺ (ng/mL)	NO (μmol/L)	iNOS (ng/mL)
200	0.152±0.014b	0.127±0.012b	0.441±0.048b
100	0.131±0.012b	0.162±0.532b	0.502±0.081c
50	0.125±0.333a	0.137±0.028a	0.406±0.047b
25	0.119±0.036a	0.130±0.016a	0.366±0.029b
CK	0.116±0.142a	0.127±0.017a	0.277±0.347a

功能具有重要作用。多数研究结果表明,多糖能够调节动物体内淋巴细胞产生 cAMP、cGMP 的含量,促进免疫细胞活化、增殖,使机体发挥免疫调节作用^[5]。研究发现,黄芪多糖能使小鼠脾淋巴细胞中 cGMP 浓度迅速升高,一定剂量的半枝莲多糖能使小鼠脾淋巴细胞内 cAMP 水平升高^[6]。赵飞艳等研究表明,沙葱多糖可显著提高淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量^[7]。本研究表明,一定纯度的中药复方多糖能显著提高淋巴细胞培养上清中 cAMP、cGMP 的水平,且 cAMP、cGMP 的平均水平随着时间的延长及中药复方多糖质量浓度的升高而增加,这与帅学宏等^[8]、高建峰等^[9]利用其他多糖的研究结果具有相似趋势。

钙离子是细胞信号转导的重要分子之一,对淋巴细胞信号转导和功能实现具有重要作用^[10]。淋巴细胞钙离子水平直接影响淋巴细胞的分裂、巨噬细胞的吞噬作用并促进 IL-2 的释放等。研究表明,多糖可引起淋巴细胞内钙离子浓度的改变,从而调节机体免疫功能^[11]。本研究表明,一定纯度的中药复方多糖能显著提高淋巴细胞培养上清中 Ca^{2+} 的水平,这与刘媛等的研究结果^[12]相一致。

一氧化氮(NO)是由一氧化氮合成酶(iNOS)催化,经多步氧化还原反应而生成的,在生物体内是一种重要的信使分子和效应分子^[13]。张明等研究发现,适宜剂量的中药复方多糖(CPPS)能显著提高小鼠脾淋巴细胞的增殖活性和细胞培养液中的 NO 含量,提示 CPPS 可能通过 NO 介导信号通路,引起 cGMP 生成,进而发挥其免疫调节作用^[14-16]。余桂朋等研究发现,艾叶多糖能增强巨噬细胞生成 NO 的能力,且在试验剂量范围内存在剂量-效应关系^[17]。本研究表明,一定纯度的中药复方多糖能促进鸡外周血淋巴细胞中 NO、iNOS 的生成,这与韩杰等关于一定浓度刺五加多糖对体外培养的仔猪外周血淋巴细胞内 NO、iNOS 影响的研究结果^[18]相一致。

一定纯度的中药复方多糖能通过提高细胞内 Ca^{2+} 、NO、iNOS 的水平来改变 cAMP、cGMP 分泌,影响免疫细胞信号的传导,从而发挥免疫调节作用。

参考文献:

- [1] 许坤钟,赵翠燕. 黄芪多糖在家禽上的研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(10):5903-5904.
- [2] 张媛,尚晓娅,徐春兰,等. 植物多糖对淋巴细胞免疫调节功能影响的研究进展[J]. 化学与生物工程,2012,29(12):1-6.
- [3] Kim H S, Kim Y J, Lee H K, et al. Activation of macrophages by polysaccharide isolated from *Paecilomyces cicadae* through toll-like
- [4] 朱晓庆,李效振,乔海博,等. 11 味中药多糖提取物对不同 MHC B-L β II 基因型鸡新城疫抗体水平和 IFN- γ 、IL-4 含量的影响[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(10):1685-1692.
- [5] 戴必胜,蒋林,刘朝亮,等. 中草药和芦荟多糖对肉鸡 cAMP/cGMP 与免疫功能的影响[J]. 湖北农业科学,2008,47(10):1189-1193.
- [6] 叶华,郑学宝. 半枝莲多糖对小鼠脾淋巴细胞 cAMP 含量的影响[J]. 广东医学院学报,2009,41(5):216-219.
- [7] 赵飞艳,敖长金,萨茹丽,等. 沙葱多糖对绵羊外周血淋巴细胞信号转导相关分子的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(11):1125-1128.
- [8] 帅学宏,苏子杰,胡庭俊,等. 山豆根多糖对鸡脾脏淋巴细胞信号转导相关分子水平的影响[J]. 动物医学进展,2010,31(1):36-41.
- [9] 高建峰,胡庭俊,高艳艳. 黄芪多糖对小鼠免疫细胞 NO-cGMP 信号系统的效应[J]. 畜牧与兽医,2008,40(5):65-67.
- [10] Paredes R M, Etlzler J C, Watts L T, et al. Chemical calcium indicators[J]. Methods,2008,46(3):143-151.
- [11] 汲晨峰,肖风,李宇彬. 青龙衣多糖对 S_{180} 小鼠红细胞 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活性及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响[J]. 中草药,2008,39(12):1842-1844.
- [12] 刘媛,赵红,蔡云,等. 马尾松花粉多糖硫酸酯化前后对小鼠脾细胞钙离子浓度的影响[J]. 药物生物技术,2011(5):396-398.
- [13] 杨伊妹,王化冰. NO 与自身免疫疾病的免疫调节[J]. 中国神经免疫学和神经病志,2004,11(5):306-308.
- [14] 张明. 复方中药多糖对体外脾淋巴细胞增殖、NO 生成和蛋白激酶 G 的影响[J]. 动物医学进展,2010,31(9):37-40.
- [15] 劳雪芬,邹慧,徐筱萌,等. 富硒女贞子水提物、粗多糖对小鼠免疫的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2015,36(1):72-77.
- [16] 贾俊刚. 补血草多糖对大鼠血清及骨骼肌生化指标的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2016,37(4):32-36.
- [17] 余桂朋,尹美珍,黄志,等. 艾叶多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及 NO 生成的影响[J]. 湖北理工学院学报,2012,28(5):54-58.
- [18] 韩杰,边连全,刘显军,等. 刺五加多糖对断奶仔猪外周血淋巴细胞信号传导的影响[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(10):1584-1592.

(上接第 163 页)

- 组成及抗氧化功能的影响[J]. 动物营养学报,2013,25(9):1976-1988.
- [8] 锡建中,赵超. 复方中草药对 AA 肉鸡饲养效果及肉质的影响[J]. 中国家禽,2015,37(10):38-42.
- [9] 王杉,孙会松,熊翔,等. 花椒籽对肉雏鸡生长性能的影响[J]. 饲料工业,2013,34(23):34-37.
- [10] 谢红兵,常新耀,魏刚才,等. 花椒对肉鸡生长性能、免疫指标和屠宰性能的影响[J]. 江苏农业学报,2011,27(3):581-586.
- [11] 李时珍. 本草纲目[M]. 长春:吉林大学出版社,2009.
- [12] Rivas A, Fabricant J. Indication of immunodepression in chick - ens
- infected with various strains of Marek's disease virus[J]. Avian Diseases,1988,32:1-8.
- [13] 曹日亮,赵娟,武果桃,等. 中草药复合添加剂对猪生长性能及猪肉品质的影响[J]. 肉品加工,2013(5):64-67.
- [14] 周光宏,徐幸莲. 肉品学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,1999:195-210.
- [15] 王剑锋,崔璐璐,谢恺舟,等. 扬州鹅及其 4 个杂交配套组合肌肉组织学特性研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2014,35(3):33-37.
- [16] 张细权,何丹林,张德祥,等. 优质鸡的肉质研究和肉质评价[J]. 山东家禽,2003(10):3-5.