

谭红连, 杨 剑, 尹 丹, 等. 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞活性及炎症相关因子的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 166-168.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.046

# 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞活性及炎症相关因子的影响

谭红连, 杨 剑, 尹 丹, 郝祝兵, 韦英益, 胡庭俊

(广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

**摘要:**首先通过 MTT 法检测马尾藻多糖对 3D4/2 细胞活性的影响, 然后用 ELISA 法检测炎症相关因子。试验结果, PCV-2 感染 3D4/2 细胞后明显降低细胞活性, 马尾藻多糖 25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  处理后, 均能提高感染细胞的活性; PCV-2 感染 3D4/2 细胞后均能显著提高 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1 等炎症因子的水平, 马尾藻多糖处理后, 25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  均能在一定程度上降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、MCP-1 的分泌水平, 且其中 25、50  $\mu\text{g/mL}$  的效果最明显。结果表明, 马尾藻多糖具有较好的体外抗炎作用, 且其抗炎作用机制可能与其抑制炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 等的分泌有关。

**关键词:**马尾藻多糖; PCV-2; 3D4/2 细胞; 炎症因子

**中图分类号:** S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0166-03

马尾藻(*Sargassum*)是褐藻中的一类海藻, 属褐藻门鹿角菜目马尾藻科, 从中提取出的马尾藻多糖(*Sargassum polysaccharides*, SP)是一种易溶于水的多糖复合物。目前, 对马尾藻多糖的提取工艺以及抗氧化活性和免疫活性等方面的初步研究表明, 马尾藻多糖具有抗病毒、抗肿瘤和抗凝血以及免疫活性等多种作用<sup>[1-3]</sup>。

猪圆环病毒 II 型(porcine circovirus type II, PCV-II)是断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要致病原, 已成为影响全球养猪业的重大疾病, 导致巨大的经济损失。PCV-II 病毒复制的主要场所是机体的单核-巨噬细胞和抗原递呈细胞, PCV-II 感染后, 病猪体内肺、肝、肾、扁桃体、胸腺、外周血单核细胞、支气管淋巴结、腹股沟淋巴结中均能检测到 PCV-II 病毒核酸<sup>[4]</sup>, PCV-II 感染主要表现为淋巴细胞缺失和单核细胞浸润等。本试验就马尾藻多糖对感染 PCV-II 的 3D4/2 细胞增殖活性及炎症相关细胞因子分泌的影响进行观察, 探讨马尾藻多糖抗炎作用分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 猪圆环病毒 II 型(SH 株)(PCV-II)为南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室分离保存, 经 PK-15 细胞增殖后测得病毒滴度为  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。猪肺泡巨噬细胞系 3D4/2 细胞由广西大学动物科

学技术学院预防兽医学教研室提供。

1.1.2 试验药物 马尾藻多糖, 广西大学动物科学技术学院药理实验室提供。

1.1.3 主要仪器和试剂 Multimode Plate Reader 多功能酶标仪(TECAN); RPMI 1640 培养液(Gibco); 胎牛血清(Gibco); 噻唑蓝 MTT(索莱宝); 小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、白介素-10(IL-10)、巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)ELISA 检测试剂盒(欣博盛)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞活性的影响 分别设置细胞对照组、病毒对照组和 6 个不同药物浓度组(25、50、100、200、400、800  $\mu\text{g/mL}$ ), 当细胞密度至  $1 \times 10^6$  cell/mL 时, 接至 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下过夜使其贴壁。细胞对照组加入无血清 1640 培养液 200  $\mu\text{L}$ , 病毒组及药物组加入等量  $10^{-1}$  PCV-2 病毒液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中吸附 2 h, 弃去病毒液, PBS 缓冲液清洗 3 次后, 细胞对照组、病毒对照组每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 5% FBS-1640 培养液, 药物组加入等量不同浓度 SP 继续培养 8 h, 用于检测细胞活性。

1.2.2 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞炎症相关因子的影响 分别设置细胞对照组、病毒对照组和 5 个不同药物浓度组(25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ ), 调节细胞浓度为  $1 \times 10^6$  cell/mL 铺于 24 孔板中, 1 000  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养使细胞贴壁。弃上清, 细胞对照组加入 1 000  $\mu\text{L}$ /孔培养液, 病毒组、药物组加入  $10^{-1}$  PCV-2 病毒液 1 000  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 2 h, 弃上清, 细胞对照组、LPS 组、病毒对照组加入 1 000  $\mu\text{L}$ /孔培养液, 药物组分别加入不同浓度马尾藻多糖, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 12 h, 收集细胞上清液, 用于 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1 等炎症相关因子的检测。

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31260619)。

作者简介: 谭红连(1991—), 女, 广西来宾人, 硕士研究生, 从事中药免疫药理学研究。

通信作者: 胡庭俊, 博士, 教授, 研究方向为中药免疫药理学。

E-mail: tingjunhu@126.com。

1.2.3 MTT 法检测细胞活性 按上述处理细胞培养 3D4/2 细胞 8 h 后,每孔吸弃 10  $\mu\text{L}$  上清,各组细胞每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。培养结束后,弃掉孔内液体,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO,摇匀,静置 10 min,置酶标仪上测定  $D_{570\text{ nm}}$  值。

1.2.4 ELISA 法测定炎症相关因子分泌水平 按照上述处理后收集细胞上清,根据 ELISA 法检测炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1)分泌水平,严格按照炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1)测定试剂盒说明进行操作。

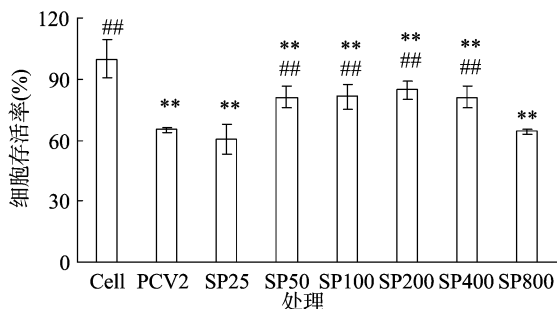
### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 12 h 存活率的影响

由图 1 可见,PCV-2 感染 3D4/2 细胞明显降低细胞活性,与细胞对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ );加入马尾藻多糖处理后,50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能提高感染 3D4/2 细胞活性,与病毒对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。表明马尾藻多糖能显著提高 PCV-2 感染 3D4/2 细胞活性。



\*表示与细胞对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*表示与细胞对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ); #表示与PCV-2 对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), ##表示与细胞对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。下同

图1 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 12 h 存活率的影响

### 2.2 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 TNF- $\alpha$ 分泌的影响

由图 2 可见,PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 TNF- $\alpha$  水平,与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ );加入马尾藻多糖处理后,与病毒对照组相比,25、50、100  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能极显著降低 TNF- $\alpha$  水平( $P < 0.01$ );200  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能显著降低 TNF- $\alpha$  水平( $P < 0.05$ );400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能降低 TNF- $\alpha$  水平,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.3 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-1 $\beta$ 分泌的影响

由图 3 可见,PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 IL-1 $\beta$  水平,与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ );加入马尾藻多糖处理后,与病毒对照组相比,25、50  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能极显著降低 IL-1 $\beta$  水平( $P < 0.01$ ),100、400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能降低 IL-1 $\beta$  水平,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

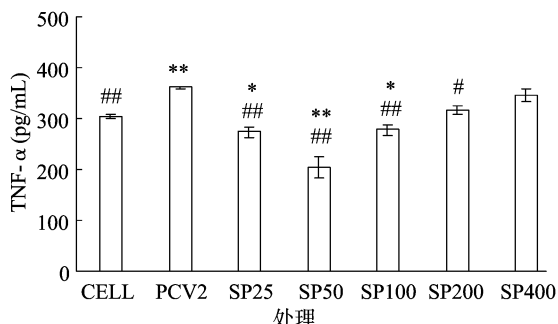


图2 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 TNF- $\alpha$  分泌的影响

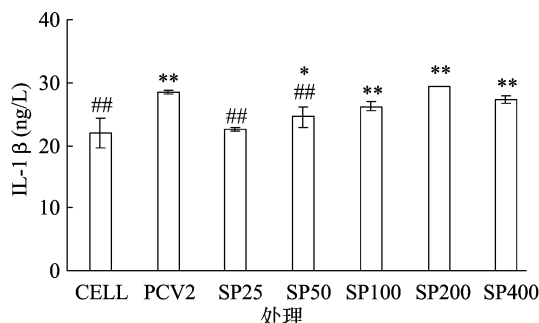


图3 SP 对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-1 $\beta$  分泌的影响

### 2.4 不同浓度 SP 对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-6 分泌的影响

由图 4 可见,PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 IL-6 水平,与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ );加入马尾藻多糖处理后,与病毒对照组相比,25  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖降低 IL-6 水平,但差异不显著( $P > 0.05$ );50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖均能显著或极显著升高 IL-6 水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

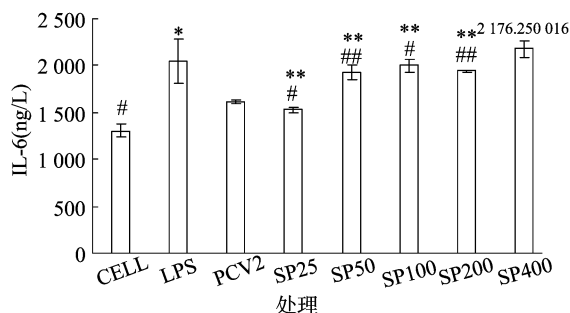


图4 SP 对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-6 分泌的影响

### 2.5 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-8 分泌的影响

由图 5 可见,PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 IL-8 水平,与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ );加入马尾藻多糖处理后,与病毒对照组相比,25、50、100  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能极显著降低 IL-8 水平( $P < 0.01$ );200  $\mu\text{g/mL}$  SP 能显著降低 IL-8 水平( $P < 0.05$ );400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能降低 IL-8 水平,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

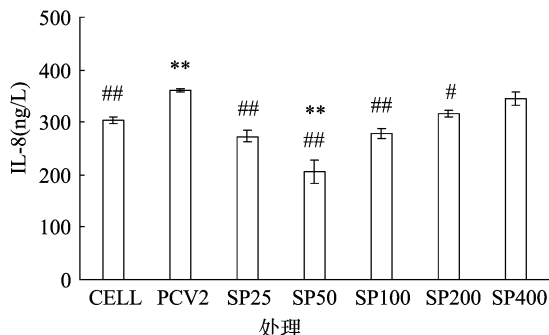


图5 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-8 分泌的影响

## 2.6 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-10 分泌的影响

由图 6 可见, PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 IL-10 水平, 与空白对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 加入马尾藻多糖处理后, 与病毒对照组相比, 25、50  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能极显著或显著降低 IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能降低 IL-10 水平, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

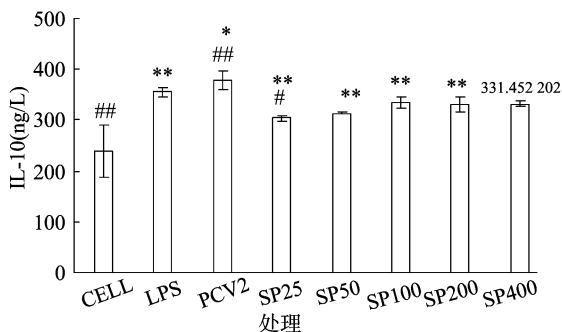


图6 马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 IL-10 分泌的影响

## 2.7 不同浓度马尾藻多糖对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 MCP-1 分泌的影响

由图 7 可见, PCV-2 感染 3D4/2 细胞后升高细胞 MCP-1 水平, 与空白对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 加入马尾藻多糖处理后, 与病毒对照组相比, 25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖能降低 MCP-1 水平但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

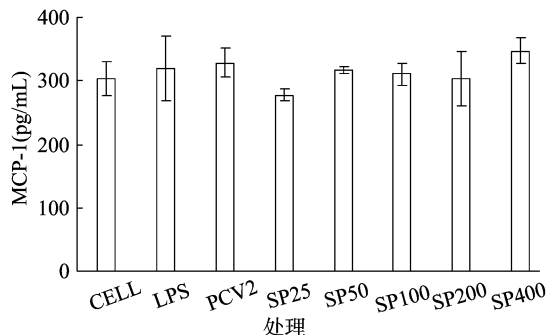


图7 SP 对 PCV-2 体外感染 3D4/2 细胞 MCP-1 分泌的影响

## 3 讨论

多糖、皂苷类和黄酮等是中药的有效成分, 具有促进细胞生长、参与免疫调节等功效。炎症是机体受到各种致炎因素的刺激和损伤后, 为灭活及移除这些致炎因素并为组织修复创造环境而产生的防御性反应, 是一种十分常见而又重要的基本病理过程, 是许多疾病的症状或并发症, 可引起局部或全身性反应。炎症主要由细菌和病毒引起, 也可因物理、化学、外伤等刺激而产生<sup>[5-7]</sup>。在炎症反应中, 巨噬细胞起着重要作用, 是体内启动炎症介质产生的中心细胞, 活化的巨噬细胞是参与炎症反应的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1 等细胞因子的重要来源<sup>[8-9]</sup>, 为调控炎症反应的主要细胞, 由炎症反应所致免疫防御和免疫功能紊乱过程中, 巨噬细胞是一个关键的参与者。

在本试验中, PCV-2 感染 3D4/2 细胞后显著促进了 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1 等炎症因子的分泌, 而用马尾藻多糖处理后, 25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  马尾藻多糖均在一定程度上抑制了 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、MCP-1 等炎症因子的分泌, 其中 20、50  $\mu\text{g/mL}$  效果较明显。

## 4 结论

马尾藻多糖能显著提高 PCV-2 感染的 3D4/2 细胞活性, 具有较好的体外抗炎作用, 且其抗炎作用机制可能与其抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、MCP-1 等的分泌有关。

## 参考文献:

- [1] 梁世忠, 李兴芳, 陈静, 等. 马尾藻多糖的抗肿瘤作用及其免疫功能的研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(3): 49-52.
- [2] Sinha S, Astani A, Ghosh T, et al. Polysaccharides from *Sargassum tenerimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity[J]. Phytochemistry, 2010, 71(2/3): 235-242.
- [3] 刘洪丽, 胡庭俊, 何颖, 等. 马尾藻多糖分离提取及抗氧化活性初步观察[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 337-339.
- [4] Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 115(3/4): 261-272.
- [5] 倪志宇. CCK-8 对炎症反应中促炎及抗炎性细胞因子表达的调控机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2005: 168-196.
- [6] 汪秀, 李菲, 黄利辉. 油茶籽壳总黄酮对黄曲霉毒素 B1 致肝细胞氧化应激的保护作用及机制[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 308-311, 577.
- [7] 范志宇, 魏后军, 胡波, 等. 兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 272-275.
- [8] Wulster M C, Ajuwon K M, Wang J, et al. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316: 924-929.
- [9] 邱海波. 多器官功能衰竭综合征与全身炎症反应综合征[J]. 辽宁医学杂志, 2002(16): 113-115.