

PHA 复方制剂对鸡体内 NF- κ B 的调节作用研究

刘艳艳, 秦光, 李继昌

(东北农业大学 动物医学学院, 哈尔滨 150030)

中图分类号: S831

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)08-0125-04

关键词: 核因子- κ B (NF- κ B); 植物血凝素 (PHA); RT-PCR; 鸡; 新城疫

摘要: 为了探讨植物血凝素 (PHA) 复方制剂对鸡免疫调节的作用与核因子- κ B (NF- κ B) 的关系, 试验联合应用 La Sota 疫苗, 在不同免疫时期, 采用 RT-PCR 法对胸腺、脾脏、法氏囊中 NF- κ B mRNA 的表达进行测定, 采用 ELISA 法测定血清中 NF- κ B 的浓度变化。结果表明: 在不同免疫时期, 适当剂量的 PHA 复方制剂有上调胸腺中 NF- κ B mRNA 表达、降低脾脏和法氏囊中 NF- κ B mRNA 表达的作用; 在外周血中, PHA 复方制剂有降低 NF- κ B 浓度的作用。说明 PHA 复方制剂的作用机理与调节 NF- κ B 有关, 在不同免疫阶段及免疫脏器中作用趋势不同。

植物血凝素 (PHA) 是从植物种子中提取的植物糖蛋白, 能刺激多种淋巴细胞分裂、增殖^[1-3], 是多克隆激活剂; 能促进淋巴细胞释放细胞因子, 如 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2) 等; 同时 PHA 可促进抗体形成^[4-5]。说明 PHA 具有免疫增强作用, 在临床上可以与许多药物同时使用, 协同或相加, 能明显提高药物的疗效。PHA 无种属特异性, 可以与疫苗同时使用, 起到弥补免疫空白期、缓减疫苗应激反应和增强免疫效果的作用。

东北农业大学兽医药理学实验室自制的芸豆 PHA 纯度高, 在体外具有显著刺激脾脏淋巴细胞增殖的作用。刘艳艳等^[6]研究了以 PHA、黄芪多糖为主药的复方制剂与新城疫 La Sota 疫苗合用的作用效果。结果发现, 合用后在体内可增加鸡免疫脏器指数的作用, 调节白细胞介素-10 (IL-10) 等细胞因子, 具有免疫调节作用。

核因子- κ B (NF- κ B) 是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子。研究发现, 树突状细胞是通过识别 Toll 样受体 2 (TLR2) 激活 NF- κ B 途径的细胞因子, 随后激活许多前炎症因子如 IFN- γ 和白细胞介素-17 (IL-17), NF- κ B 可通过各种途径调节 T 淋巴细胞^[7-9]。本试验在前期研究的基础上^[6], 探

讨 PHA 复方制剂与新城疫 La Sota 疫苗联合作用, 对鸡免疫器官及血液中 NF- κ B 的影响, 为明确 PHA 复方制剂的作用机理奠定基础。

1 材料

Trizol 试剂 (批号为 15596-02)、M-MLV 反转录试剂盒 (批号为 C28025-032), 北京 Invitrogen 公司生产; SYBR Premix Ex TaqTM (批号为 DRR081A), 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DL-2 000 Marker、牛血清白蛋白 (BSA)、二氯二苯基三氯乙烷 (DTT)、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、甘氨酸、丙烯酰胺、过硫酸铵、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 和十二烷基硫酸钠 (SDS), 均为 Sigma 公司分装产品; 固相 RNA 酶清除剂, 购自北京天恩泽基因科技有限公司; 鸡新城疫 IV 系活疫苗 (La Sota), 1 000 羽/支, 批号为 S0912410, 购自乾元浩生物股份有限公司; ELISA NF- κ B (核转录因子) 试剂盒, 购自上海劲马生物科技有限公司。

2 方法

2.1 试验动物及药物处理

1 日龄伊莎公鸡 150 只, 购自东北农业大学种鸡场, 在洁净动物房内饲养至 24 日龄时, 检测母源抗体, 随机分为 5 组, 每组 30 只, 分别是空白组 (灌服纯化水, 不进行免疫)、疫苗组 (灌服纯化水, 在 25、35 日龄时滴鼻点眼免疫, 按说明操作)、PHA 复方制剂低、中、高剂量组 (3 个不同剂量组的免疫时间同疫苗对照组, 给药时间与免疫时间一致, 连续灌服 3 d, 分别按 0.05、0.2、0.3 g/kg 剂量给药)。各组灌服体积均为 2 mL。

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-05-29

基金项目: 黑龙江省教育厅振兴东北老工业基地建设重大项目 (1152gzd07)

作者简介: 刘艳艳 (1977-), 女, 讲师, 博士, lsnylythj@126.com。

通信作者: 李继昌 (1966-), 女, 教授, 博士, lijichang828@sina.com。

2.2 采样与处理

在免疫后1周、加强免疫后1周和2周,各组随机抽取5只试验鸡,采集血清,备用;加强免疫后1周,每组随机抽取5只试验鸡称重,剖杀后用预冷的刀片、镊子迅速取脾脏、胸腺及法氏囊各0.5 g,将各组织于-70℃冻存,用于实时定量PCR分析。

2.3 脾脏、胸腺、法氏囊 NF-κB、GAPDH 基因 mRNA 表达的检测

2.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中发表的基因序列,应用 Oligo 6.0 软件与 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列及扩增长度见表1。

表1 引物序列及长度

基因	序列号	引物序列(5'-3')	PCR 产物 长度/bp
GAPDH	K01458	Forward AGAATCATCCAGCGT	182
		Reverse AGCCTTCACTACCTCTTG	
NF-κB*	M86930	Forward TCAACGCAGGACCTAAAGACAT	162
		Reverse GCAGATAGCCAAGTTCAGCATG	

注: * 表示为 NF-κBp50。

2.3.2 总 RNA 的提取 采用 Trizol 法提取。取 50 mg 脏器放入 EP 管中,加入 1.0 mL Trizol,匀浆,混匀,裂解至透明;加氯仿 400 μL,混匀 30 s,于 4℃、12 000 r/min 离心 10~15 min;取上清液,加等量异丙醇,混匀 30 s,于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,加 75% 乙醇 1 mL,洗 1~2 次,于 4℃、7 500 r/min 离心 5 min;在 37℃ 条件下干燥,加入少量 0.1% DEPC 水溶解;通过测定 OD₂₆₀ 值来计算 RNA 浓度,以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值来判定 RNA 纯度。

2.3.3 反转录 总 RNA 2 μg, Oligo dT 2 μL, dNTP 2 μL, 加 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC) 水至总体积为 22 μL, 70℃ 作用 5 min, 取出后立即放在冰上进行反转录。反转录体系: RNase 抑制剂 1 μL, 0.1 mol/L DTT 4 μL, 5× Buffer 8 μL, 37℃ 水浴 2 min, M-MLV 1 μL, 37℃ 水浴 1 h, 70℃ 加热 15 min 以使反转录酶失活, -20℃ 保存, 备用。

2.3.4 实时定量 PCR 扩增 用设计好的实时定量 PCR 引物分别扩增目的基因。定量 PCR 反应采用 SYBR Green I 荧光染料法。反应体系(20 μL): SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, Rox Reference Dye II 0.4 μL, 10 pmol/μL 上、下游引物各 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌双蒸水 6.8 μL。反应在 ABI 7300 Real Time PCR System 上进行。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 31 s, 共 40 个循环。

2.3.5 融解曲线分析 通过分析 Real-Time PCR 产物的融解曲线,对 SYBR Green I 荧光染料法实时定量 PCR 反应的特异性进行评价。PCR 仪通过实时捕捉到 PCR 产物在融解过程中荧光信号的变化,可

自动绘制融解曲线。在进行融解反应时,随着温度逐渐升高 DNA 双链解开,荧光信号随之下降。当温度在融解温度(T_m)值左右时双链数量急剧减少,荧光量也急剧下降,由此可确定 T_m 值,进而确定扩增产物的特异性。

2.3.6 pfaffi 法分析基因表达的相对差异 pfaffi 是实时定量 PCR 试验中分析基因表达相对差异的方法。PCR 扩增信号进入相对稳定的对数增长期时的荧光值定义为阈值,而 PCR 循环在到达阈值所在的循环数为 Ct 值。本试验的 Ct 值由 PCR 仪自动给出。

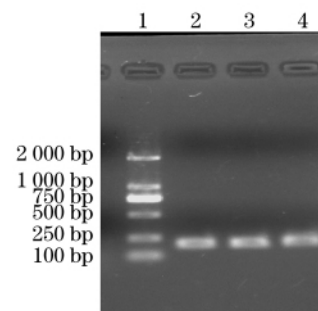
以 GAPDH 作为内参照,计算 NF-κB 基因在处理组中相对于空白组的扩增效率(E),计算公式: $E = 10^{-1/\text{斜率}} - 1$ 。

同时计算处理组中 NF-κB 基因相对于空白组表达水平的变化,计算公式:目的基因表达水平的差异倍数 = $C(A-E)/D(B-F)$ 。式中: C 为待测基因的扩增效率, D 为参照基因的扩增效率, A、E 为待测基因的干预前和干预后的 Ct 值, B、F 为参照基因的干预前和干预后的 Ct 值。

3 结果与分析

3.1 目的基因的鉴定

通过 RT-PCR 获得目的基因的扩增产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测与目的片段大小相符,见图 1、图 2。



1. DL-2 000 Marker; 2~4. 胸腺、脾脏、法氏囊中 GAPDH 实时 PCR 产物。

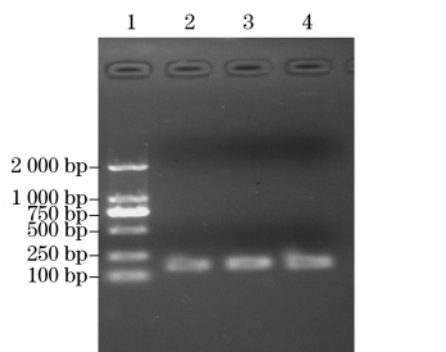
图1 胸腺、脾脏、法氏囊中 GAPDH 实时 PCR 产物

3.2 PHA 复方制剂对鸡血清中 NF-κB 浓度影响的检测结果(见表 2)

表2 PHA 复方制剂对鸡血清中 NF-κB 浓度的影响

项目	空白组	PHA 低剂量组	PHA 中剂量组	PHA 高剂量组	疫苗组
免疫1周	841.88 ^b ± 75.00	852.81 ^b ± 67.19	854.38 ^b ± 62.50	1 024.69 ^a ± 42.19	826.25 ^b ± 34.38
加强免疫1周	882.50 ^b ± 3.13	787.19 ^d ± 4.69	823.13 ^c ± 12.50	815.31 ^c ± 17.19	918.44 ^a ± 17.19
加强免疫2周	841.88 ^{ab} ± 3.13	915.31 ^a ± 35.94	818.44 ^b ± 1.56	834.06 ^{ab} ± 39.06	873.13 ^{ab} ± 81.25

注: 数据肩标字母完全不同表示差异显著(P<0.05), 含相同字母表示差异不显著(P>0.05)。



1. DL-2 000 Marker; 2~4. 胸腺、脾脏、法氏囊中 NF- κ B 实时 PCR 产物。

图 2 胸腺、脾脏、法氏囊中 NF- κ B 实时 PCR 产物

由表 2 可知,空白组、疫苗组在加强免疫 1 周后有一定差异 ($P < 0.05$),其他时期两组差异不显著 ($P > 0.05$),说明新城疫 La Sota 疫苗对 NF- κ B 无明显影响;对于各给药组,免疫初期 PHA 复方制剂高剂量组暂时性使 NF- κ B 升高 ($P < 0.05$),其他给药组差异不显著 ($P > 0.05$),但在加强免疫后 1 周,各给药组均明显降低 NF- κ B 浓度 ($P < 0.05$),说明 PHA 复方制剂对 NF- κ B 的下调作用在一定时间起作用,作用明确,而后无明显影响。

3.3 免疫器官 GAPDH、NF- κ B 基因的解离曲线 (见图 5、图 6)

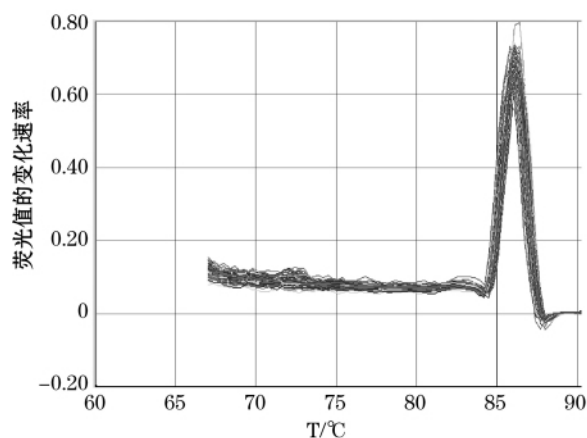


图 5 鸡免疫脏器 GAPDH 基因解离曲线

在疫苗及不同剂量 PHA 复方制剂的作用下,从图 5、图 6 上未看到主峰异常增宽,说明试验中未出现污染,产物特异性好。

3.4 各免疫器官中 NF- κ B 基因 mRNA 的表达结果

3.4.1 胸腺中 NF- κ B 基因 mRNA 的表达 结果见图 7。

由图 7 可知,在胸腺中,疫苗组与空白组相比, NF- κ B 基因 mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.05$),

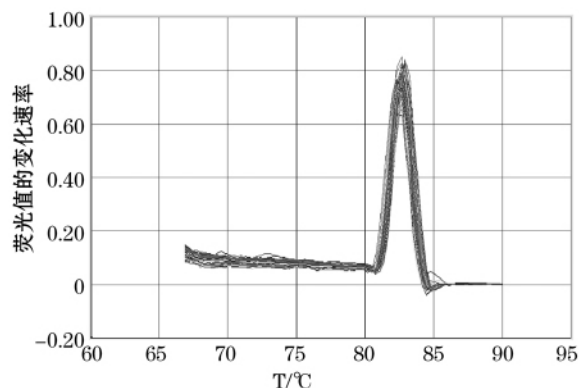
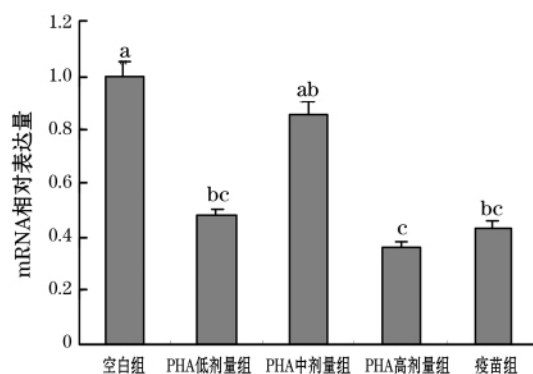


图 6 鸡免疫脏器 NF- κ B 基因解离曲线

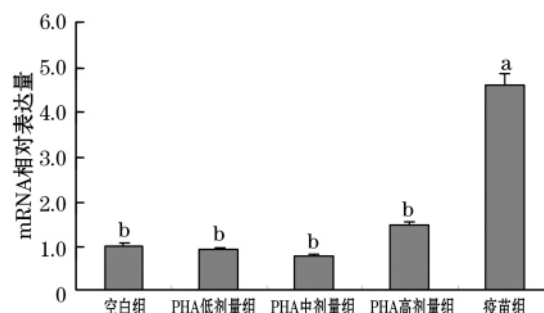


注:字母完全不同表示差异显著 ($P < 0.05$),含相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 7 不同给药组对胸腺中 NF- κ B 基因 mRNA 表达水平的影响

说明疫苗有降低其表达的作用,而 PHA 复方制剂中剂量组与疫苗组相比有向上调节的趋势,其他剂量组与疫苗组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

3.4.2 脾脏中 NF- κ B 基因 mRNA 的表达 结果见图 8。



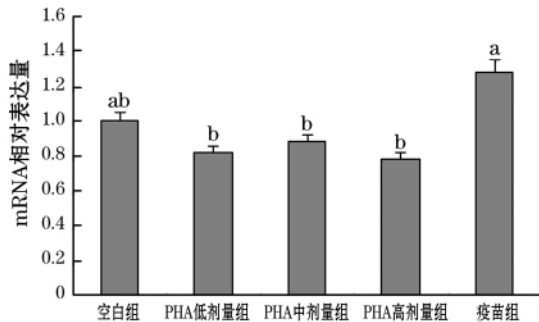
注:字母完全不同表示差异显著 ($P < 0.05$),含相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 8 不同给药组对脾脏中 NF- κ B 基因 mRNA 表达水平的影响

由图 8 可知:在脾脏中,疫苗组 NF- κ B 基因 mRNA 的表达量显著高于空白组 ($P < 0.05$),说明疫

苗有增强其表达的作用; PHA 复方制剂不同剂量组与疫苗组相比, $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 与空白组持平, 说明 PHA 复方制剂有颌颌疫苗的作用。

3.4.3 法氏囊中 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 的表达 结果见图 9。



注: 字母完全不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 含相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图9 不同给药组对法氏囊中 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 表达水平的影响

由图 9 可知, 在法氏囊中, PHA 复方制剂对 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 的调节与在脾脏中相似。PHA 复方制剂不同剂量组与疫苗组相比, $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 说明 PHA 复方制剂有颌颌疫苗的作用。

4 讨论

胸腺为机体的重要淋巴器官, 是 T 淋巴细胞分化、发育的场所。研究显示, T 淋巴细胞在分化为效应亚群的极化过程中受调节性转录因子的严格控制^[10-12]。G. Stewe 等人认为, 在胸腺髓质上皮细胞产生时, $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 浓度最高。Y. Hikosaka 等^[13]研究发现 2 种细胞表面受体——核因子 κB 受体活化因子 (RANK) 和 CD_{10} 的特殊信号协调发挥作用, 使胸腺髓质上皮细胞分化和增殖。本研究表明, 在免疫加强时期, PHA 复方制剂有上调胸腺 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 表达的作用, 其胸腺指数也显著高于其他组^[6], 在一定程度上验证了 Y. Hikosaka 等^[13]的研究结果。

法氏囊是鸟类 B 淋巴细胞发育和分化的器官, 脾脏是机体最大的免疫器官, 含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞, 是机体细胞免疫和体液免疫的中心。研究发现, $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 可通过内含子序列调整 IgG 的 FcRn 的表达与功能。 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 在免疫系统中的作用是受争议的^[14]: 有学者认为可能与 T 淋巴细胞抗原受体

的表达强弱有关。本研究联合使用药物与鸡新城疫 IV 系活疫苗, 可能还与疫苗作用有关, 可下调法氏囊、脾脏、外周血中 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 基因 mRNA 的表达, 具体原因有待进一步研究。

综上所述, PHA 复方制剂联合鸡新城疫 IV 系活疫苗使用, 其作用机理与免疫器官及外周血中的 $\text{NF} - \kappa\text{B}$ 有关, 在不同的免疫阶段及免疫脏器作用趋势不同, 但具体作用靶点及机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李建军. 青藤碱对 CD_4^+ T 细胞内 NFAT 和 IFN- γ 蛋白表达影响的体外研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2007.
- [2] 王艳苹. 甘寒归肝肾经中药药性研究: 对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [3] 么乃全. 猪瘟超前免疫的细胞免疫检测 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2007.
- [4] 邱长兴, 吴法广. 植物凝集素和白细胞介素对家禽免疫效果的影响 [J]. 当代畜牧, 2007(12): 9-10.
- [5] 郭爽, 索江华, 苏丽娟. 植物血凝素对小白鼠免疫功能的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 11117-11118.
- [6] 刘艳艳, 秦光, 李继昌. PHA 复方制剂对鸡免疫功能及相关细胞因子的调节作用 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(6): 95-100.
- [7] MUELLER C, MACPHERSON A J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation [J]. Gut, 2006, 55(2): 276-284.
- [8] LEE J, MO J H, KATAKURA K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells [J]. Nature Cell Biology, 2006, 8(12): 1327-1336.
- [9] SCHOENBORN J R, WILSON C B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses [J]. Adv Immunol, 2007, 96: 41-101.
- [10] AGNELLO D, LANKFORD C S, BREAN J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation new players and new insights [J]. J Clin Immunol, 2003, 23: 147-161.
- [11] ASNAGLI H, MUPRHY K M. Stability and commitment in T helper cells development [J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13: 242-247.
- [12] SULLIVAN B M, JUEDES, ASZABO S J, et al. Antigen-driven effector CD_8 T cell function regulated by Tbet [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(26): 15818-15823.
- [13] HIKOSAKA Y, NITTA T, OHIGASHI I, et al. The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator [J]. Immunity, 2008, 29: 438-450.
- [14] XIN D L, LI L Y, GREGORY J. Christianson, NF- κB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences [J]. NIH Public Access Author Manuscript, 2007, 179(5): 2999-3011.

(011)