

连翘酯苷 A 对内毒素致鸡脾淋巴细胞白介素-17 的影响

程广东^{1,2,3}, 张强⁴, 岳丽红¹, 王长平¹, 陶冶⁴, 任重娟⁴, 汤方强⁴, 李艳华^{2*}

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 3. 佳木斯大学畜牧兽医科学研究所, 黑龙江佳木斯 154007; 4. 佳木斯大学公共卫生学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的] 研究内毒素和连翘酯苷 A 对鸡脾淋巴细胞中白介素-17(IL-17) 水平的影响。[方法] 将 1 日龄雏鸡正常饲养至 50 日龄时, 心脏采血处死, 表面消毒后, 剖检用脾淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞, 将脾淋巴细胞分为 20 个组, 具体为 4 个剂量组 × 5 个时间点。4 个剂量组分别为: 对照组、LPS 组(5 μg/mL)、连翘酯苷 A 预防低剂量组(200 μg/mL 连翘酯苷 A + 5 μg/mL LPS)、连翘酯苷 A 预防高剂量组(400 μg/mL 连翘酯苷 A + 5 μg/mL LPS)。5 个时间点分别为 0、6、12、24、48 h。通过采用 ELISA 和 Real time-PCR 方法检测脾淋巴细胞中 IL-17 水平。[结果] ELISA 结果显示, 与正常组相比, LPS 组脾淋巴细胞中炎症因子 IL-17 含量升高; 与 LPS 组比较, 连翘酯苷 A 组脾淋巴细胞中上述炎症因子含量下降, 表明脾脏中炎症因子的变化呈正相关性, 通过抑制 LPS 诱导的鸡脾脏中上述炎症因子的升高, 减轻炎症反应。Real time-PCR 结果显示, 与正常组相比, LPS 组脾淋巴细胞中炎症因子 IL-17 mRNA 表达量升高; 与 LPS 组比较, 连翘酯苷 A 组预防组脾淋巴细胞中上述炎症因子表达量下降, 变化呈相关性, 试验表明连翘酯苷 A 可以通过转录水平抑制 LPS 诱导的鸡脾脏淋巴细胞中上述炎症因子表达量的升高, 减轻炎症反应。[结论] 连翘酯苷 A 抑制鸡脾脏淋巴细胞中 IL-17 水平, 可起到抗炎功能。

关键词 连翘酯苷 A; 内毒素; 淋巴细胞; 白介素-17**中图分类号** S853.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)34-0106-03**Effect of Forsythiaside A on IL-17 Level in Spleen Lymphocyte of Chickens Induced By Lipopolysaccharide**CHENG Guang-dong^{1,2,3}, ZHANG Qiang⁴, YUE Li-hong¹, LI Yan-hua^{2*} et al (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 3. Institute of Animal and Veterinary Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 4. College of Public Health, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] Effect of Forsythiaside A on IL-17 level in spleen lymphocyte of chickens induced by lipopolysaccharide was studied. [Method] Day-old chickens were fed normally for 50 days, chickens were killed, collecting the spleen sterily, by lymphocyte separation medium, spleen lymphocytes were divided into 20 groups(4 doses × five time points). Four groups included control group, LPS injection group (5 μg/mL), Forsythiaside A low dose treatment group (Forsythiaside A 200 μg/kg + LPS 5 μg/mL), Forsythiaside A high dose treatment group (Forsythiaside A 400 μg/kg + LPS 5 μg/mL). Five time points were: 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h. Lymphocyte IL-17 level was determined by ELISA and Real time-PCR. [Result] ELISA results showed that protein content of IL-17 of spleen lymphocytes increased in LPS groups compared with control group. Forsythiaside A decreased content of above inflammation factor compared with LPS group. Decrease inflammation response showed positive correlation with inflammation factor change of spleen lymphocytes through inhibiting IL-17 of spleen lymphocytes in the chicken by LPS to reduce inflammation reactions. Real time-PCR results showed that IL-17 mRNA expression level of inflammation factor of spleen lymphocytes increased in LPS groups compared with control group. While Forsythiaside A decreased mRNA expression of IL-17. Decreasing inflammation response showed positive correlation with inflammation factor change of spleen lymphocytes through inhibiting inflammation factor of spleen in the chicken by LPS to reduce inflammation reactions. [Conclusion] Forsythiaside A perhaps decreased IL-17 level, it had antioxidant and anti-inflammatory function.

Key words Forsythiaside A; Lipopolysaccharide; Lymphocyte; IL-17

连翘酯苷 A 具有镇痛、解热、抗氧化、抗病毒及抗菌等药理学活性, 是连翘的主要有效成分之一, 其可介导各种炎症因子, 调控机体免疫应答。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁的成分之一, 可引起机体炎症反应, 常被用于复制炎症模型^[1]。IL-17 等炎症因子往往作为免疫反应的重要指示物, IL-17 是一种强力炎症细胞因子, IL-17 包括 IL-17A ~ F 等 6 个家族成员, 其主要是由 Th17 细胞(新近发现的 CD4 + T 细胞亚群)产生的^[2-3]。IL-17F 具有独特的生物学功能, 可诱导多种趋化因子和细胞因子的表达, 参与免疫细胞应答及炎症反应, 在发挥抑制肿瘤细胞进展的同时, 亦有促进肿瘤进展和转移的风险^[4]。当炎症发生时, 除了脾脏作为机体

外周免疫器官, 产生免疫应答外, IL-17 与 IL-17 受体(IL-17 receptor, IL-17R)后引起生物学效应。IL-17 募集、活化中性粒细胞, 进而放大炎性效应, 引起机体 IL-6 等细胞因子生成, 加速炎症反应, 在机体的肿瘤和免疫性疾病中等也起到重要作用^[5]。故采用 LPS 诱导鸡脾淋巴细胞炎症模型, 在连翘酯苷 A 作用下, 从体外模型研究鸡脾淋巴细胞炎症因子的变化和相关性, 探讨体外鸡脾淋巴细胞因子与炎症的关系, 从调控炎症因子的角度, 阐明连翘酯苷 A 抗 LPS 诱导的鸡脾脏炎症中的机制, 为连翘酯苷 A 在鸡免疫调控中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 1 日龄 AA 肉鸡均购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物中心。主要试剂盒: 连翘酯苷 A(纯度 >98%) 购于成都瑞芬思生物科技有限公司。内毒素 LPS(血清型 O55:B5, Sigma 产品, 批号 L-2880) 购自美国 SIGMA 公司。

主要仪器: LightCycler480(FACS CantoII, 美国 Roche 公

基金项目 黑龙江省自然科学基金面上项目(C201450); 佳木斯大学校级青年科学基金项目(Sq2013-028); 佳木斯大学研究生科技创新项目(LZR2014_030/LM2015_081/YZ2016_001)。**作者简介** 程广东(1978—), 男, 黑龙江大兴安岭人, 副教授, 博士, 从事中药药理学与毒理机制研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事中药抗炎及机制研究。**收稿日期** 2017-09-13

司), 酶标仪型号 (DENLEY DRAGON Wellscan MK3, Thermo, 荷兰)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验分组与处理。脾淋巴细胞的分离: 将 1 日龄雏鸡正常饲养至 50 日龄时, 心脏采血处死, 表面消毒后, 移至超净工作台中剖检, 无菌取出脾脏, 按程广东^[6]的方法, 用配好的淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 用加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释, 将获得淋巴细胞进行计数, 然后稀释到 4×10^6 个/mL, 移到一次性培养瓶中, 每瓶加入 10 mL 培养液。然后将连翘酯苷 A 和 LPS 按如下 4 种剂量组分别加入到含淋巴细胞的 DMEM 培养液中, 该试验将脾淋巴细胞共分为 20 个组, 具体为 4 个剂量组 \times 5 个时间点。4 个剂量组分别为: 对照组、LPS 组 (5 $\mu\text{g/mL}$)、连翘酯苷 A 预防低剂量组 (200 $\mu\text{g/mL}$ 连翘酯苷 A + 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、连翘酯苷 A 预防高剂量组 (400 $\mu\text{g/mL}$ 连翘酯苷 A + 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS)。5 个时间点分别为 0、6、12、24、48 h。

1.2.2 ELISA 检测鸡脾淋巴细胞中 IL - 17 蛋白含量。收集不同处理组脾淋巴细胞后, 按程广东^[6]的方法检测各组血清样品 IL - 17 含量。

1.2.3 qRT - PCR 检测鸡脾淋巴细胞中 IL - 17 mRNA 表达量。收集各不同处理组脾淋巴细胞后, 直接加入 TRIZOL 试剂 0.9 mL, 提取 RNA, 按程广东^[6]的方法, 将 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用于检测脾脏 IL - 17 的 CP 值, 经内参 β - actin 校正, 以归一法比较各组鸡血液中 IL - 17 的 mRNA 表达量。其中提取 RNA 所用物品均应严格按消除 RNase 的常规方法处理。

1.3 数据处理与统计 试验数据通过 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示数据, 采用 P 检验进行试验统计, * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 表示与对照组比较, # $P < 0.05$ 和 ## $P < 0.01$ 表示与 LPS 组比较。

2 结果与分析

2.1 脾淋巴细胞中 IL - 17 蛋白含量 由图 1 可以看出, 同一时间不同处理组进行比较, 与正常对照组比较, LPS 组中鸡脾淋巴细胞不同时间点中 IL - 17 蛋白含量明显升高, 差异极显著 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 不同剂量组的 (200 $\mu\text{g/mL}$ 和 400 $\mu\text{g/mL}$) 连翘酯苷 A 抑制 LPS 诱导的 IL - 17 的蛋白含量升高, 差异均极显著 ($P < 0.01$), 并成剂量依赖性。随着连翘酯苷 A 与 LPS 作用鸡脾淋巴细胞作用时间延长, LPS 作用时间组整体 IL - 17 蛋白含量升高, 且在作用 6 h 时 IL - 17 蛋白含量达到最高值; 连翘酯苷 A 预防低剂量组与连翘酯苷 A 预防高剂量组 IL - 17 蛋白在 0、6、12 h 含量升高, 且随着作用时间延长, IL - 17 蛋白含量呈线性上升, 且在 12 h 组 IL - 17 蛋白含量达到最高值, 在 24、48 h, 随着作用时间延长, IL - 17 蛋白含量下降。

2.2 脾淋巴细胞中 IL - 17 mRNA 表达量 由图 2 可以看出, 同一时间点不同处理组进行比较, 与正常组相比, LPS 可显著提高鸡脾淋巴细胞不同时间点中 IL - 17 mRNA 含量, 差异均极显著 ($P < 0.01$); 连翘酯苷 A 预防组抑制 LPS 引发

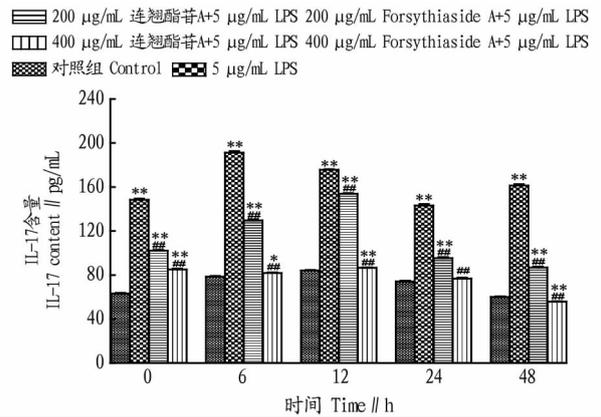


图 1 连翘酯苷 A 对 LPS 致炎鸡脾淋巴细胞中 IL - 17 含量表达量的影响

Fig. 1 Effect of Forsythiaside A on IL-17 content in LPS-induced spleen lymphocytes of chickens

的鸡脾淋巴细胞不同时间点中 IL - 17 mRNA 含量上升, 差异均极显著 ($P < 0.01$), 并成剂量依赖性。随着连翘酯苷 A 与 LPS 作用鸡脾淋巴细胞作用时间延长, LPS 作用时间 12 h 组 IL - 17 mRNA 含量达到最高值; 连翘酯苷 A 预防低剂量组与连翘酯苷 A 预防高剂量组 IL - 17 mRNA 在 12 h 组达到最高值。表明连翘酯苷 A 与 LPS 可以通过影响 IL - 17 mRNA 含量影响炎症反应。

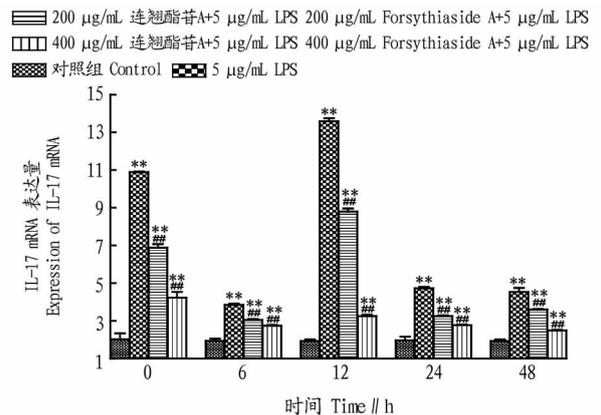


图 2 连翘酯苷 A 对 LPS 致炎鸡脾淋巴细胞中 IL - 17 mRNA 表达量的影响

Fig. 2 Effect of Forsythiaside A on IL-17 mRNA expression level in LPS-induced spleen lymphocytes of chickens

3 结论与讨论

3.1 LPS 致脾淋巴细胞炎症机制 吴景华等^[7]研究表明, 青蒿素作用后肝癌组织中 Caspase 3 的表达较阴性对照组增加, 较阳性对照组表达有所减少, 但 IL - 17R 的表达较阴性对照组及阳性对照组降低; 青蒿素组荷瘤鼠血清 IL - 17 的浓度明显下降。阮洪生等^[8]研究表明, LPS 能明显诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 分泌炎症因子 NO、TNF - α 、IL - 1 β 和 IL - 6, 而表儿茶素可以明显降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放炎症因子 NO、TNF - α 、IL - 1 β 和 IL - 6。葛建彬等^[9]研究表明, 小鼠缺血再灌后缺血侧大脑皮层 p65 蛋白水平明显增高, 枸杞多糖能显著降低 p65 蛋白水平, 能显

著降低缺血再灌注后 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的蛋白生成。王玉明等^[10]研究表明,与 LPS 组相比,芹菜素治疗组可以显著升高肺泡盥洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平,而芹菜素可以显著降低肺泡盥洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平,并抑制 NF- κ B 信号通路的激活,芹菜素可以通过抑制 NF- κ B 的激活并降低炎症细胞因子的水平,从而对小鼠急性肺损伤产生抗炎保护作用。脾脏是鸡体外周免疫器官,其对细胞免疫和体液免疫起着重要作用,在机体的免疫系统中起重要作用。而脾淋巴细胞是脾脏发挥免疫反应的直接效应细胞。体外试验观察和分析 LPS 和连翘酯苷 A 对体外分离培养的鸡脾淋巴细胞的炎症因子水平,可更直观地分析和比较效应细胞的直接抗炎作用。该试验研究 LPS 和连翘酯苷 A 作用于鸡脾淋巴细胞后,鸡脾淋巴细胞中炎症因子 mRNA 表达量与蛋白含量上升,但也存在时间和剂量效应,鸡脾脏和 0、6、12、24 和 48 h 组脾淋巴细胞 IL-17 的 mRNA 表达量升高,表明 LPS 能引发机体炎症,导致机体 IL-17 等炎症因子上升,加剧炎症反应。

3.2 IL-17 在连翘酯苷 A 抗 LPS 致脾淋巴细胞炎症的机制 刘利民^[11]研究表明,复方黄连素对萎缩性胃炎患者疗效显著,可降低患者血清 IL-6、IL-17 浓度,显著降低患者胃黏膜损害程度,具有较好疗效;可诱导单核细胞和巨噬细胞释放 IL-6 和 TNF;引起机体发热,导致白细胞过多渗出,干扰抗凝过程或形成血栓,使血凝-抗血凝系统紊乱。当大量细菌在血中迅速繁殖时,机体感染加剧,大量内毒素将出现在循环血中,使机体释放大量细胞因子,从而可引发全身性炎症反应^[12]。张海佳等^[12]研究表明,IL-17 在肠黏膜的免疫调控中可能起抑制肠道炎症的作用。IL-17 对试验性结肠炎动物的保护作用与大多数研究 IL-17 在肠黏膜的免疫调控中可能发挥的作用不同,可能与作用受体不同有关。魏良鑫等^[13]研究表明,芦荟苷能抑制黄曲霉毒素中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 的表达量,从而抑制大鼠炎症反应的发生。对大鼠免疫损伤具有明显的改善作用。试验结果表明,LPS 可引起鸡脾淋巴细胞中 IL-17 含量及 mRNA 表达量的增加,而连翘酯苷 A 预防组能有效地抑制由 LPS 诱导的 IL-17 的分泌及表达,且 LPS 可迅速影响 IL-17

蛋白和 mRNA 含量,而连翘酯苷 A 发生抑炎作用需要时间较长,但整体有明显的剂量和时间效应。说明连翘酯苷 A 抑制 LPS 所致机体炎症损伤介导影响前炎因子 IL-17 的转录与翻译水平,进一步抑制炎症反应。

4 结论

该试验结果表明,LPS 可引起脾淋巴细胞中 IL-17 蛋白和 mRNA 表达量增加,而连翘酯苷 A 可导致 LPS 组鸡脾淋巴细胞 IL-17 蛋白和 mRNA 表达量下降,IL-17 蛋白与各自 mRNA 的表达量成正相关,连翘酯苷 A 可通过抑制鸡脾淋巴细胞中 IL-17 蛋白和 mRNA 表达量,体外免疫试验结果表明,连翘酯苷 A 可抑制 LPS 诱导产生的炎症效应,缓解炎症反应。

参考文献

- [1] 张学人. 中药提取物连翘酯苷 A 对内毒素血症小鼠的免疫调节作用及相关机制研究[J]. 中医药导报, 2016, 22(21): 57-60.
- [2] 王子萌, 王维, 马毓蓉, 等. IL-17A 促进中耳上皮细胞凋亡加重组织损伤[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(3): 208-213.
- [3] ZRIOUAL S, TOH M L, TOURNADRE A, et al. IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR + CXC chemokine expression in synovialocytes and are overexpressed in rheumatoid blood[J]. J Immunol, 2008, 180(1): 655-663.
- [4] 郭佳琦, 钱鑫. IL-17F 与肿瘤关系的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(1): 78-83.
- [5] 罗家明. IL-23/IL-17 轴在 EAE 发病机制中的作用及其实验性干预研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [6] 程广东. 连翘酯苷 A 对鸡脾和血中炎症细胞因子及抗氧化性能影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [7] 吴景华, 郭佳培, 曹青, 等. 青蒿素通过抑制 IL-17/IL-17R 表达诱导肝癌细胞凋亡的机制研究[J]. 现代预防医学, 2017, 44(4): 697-700.
- [8] 阮洪生, 牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 159-163.
- [9] 葛建彬, 卢红军, 宋新建, 等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF- κ B, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 表达的机制[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 326-331.
- [10] 王玉明, 杨正涛, 张乃生. 芹菜素对 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(35): 187-189.
- [11] 刘利民. 复方黄连素对萎缩性胃炎的治疗效果及对 IL-6、IL-17 的影响[J]. 中国处方药, 2016, 14(12): 7-8.
- [12] 张海佳, 沙素梅, 徐斌, 等. IL-17 在黏附侵袭性大肠杆菌感染小鼠结肠过程中的作用机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(17): 3211-3215, 3205.
- [13] 魏良鑫, 崔燕, 钱和. 芦荟苷对亚慢性 AFB₁ 致大鼠免疫损伤的干预作用[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(12): 10-14, 21.

(上接第 71 页)

- [10] 任红英, 胡红云, 杨小红, 等. 高效液相色谱-质谱法测定香姜中有机氯农药残留[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(2): 116-118.
- [11] 吴永宁, 赵云峰, 陈慧京, 等. 食品中有机氯农药多组分残留量的测定:

GB/T 5009.19—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

- [12] 刘潇威, 买光熙, 李凌云, 等. 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药残留多残留的测定: NY/T 761—2008[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短,一般不超过 20 字,标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写,文内标题层次不宜过多,一般不超过 4 级,分别以 1;1.1;1.1.1;1.1.1.1 方式表示。