

# 白术多糖通过 Toll 样受体 4/核因子- $\kappa$ B 信号通路调控雏鸡脾脏淋巴细胞免疫功能

李婉雁<sup>1,2</sup> 曹楠<sup>1,2</sup> 田允波<sup>1,2</sup> 相雪莲<sup>1,2</sup> 李冰心<sup>1,2</sup> 黄运茂<sup>1,2</sup> 许丹宁<sup>1,2\*</sup>

(1.仲恺农业工程学院动物科技学院,广州 510225;2.广东省水禽健康养殖重点实验室,广州 510225)

**摘要:** 本试验旨在研究白术多糖(PAMK)对雏鸡脾脏淋巴细胞免疫功能的影响及可能的调控机制。体外分离培养21日龄雏鸡脾脏淋巴细胞,以siRNA引物转染淋巴细胞干扰Toll样受体4(TLR4)基因的表达,在此基础上用浓度为12.5 mg/L的PAMK处理转染和非转染细胞,36 h后检测TLR4及其信号通路下游基因[髓样分化因子88(MyD88)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制物的激酶(IKK)、NF- $\kappa$ B抑制蛋白(I $\kappa$ B)]和细胞因子[白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (LITAF)]的mRNA表达量,并以凝胶迁移试验(EMSA)方法检测淋巴细胞核蛋白中NF- $\kappa$ B的含量。结果显示:PAMK可显著提高淋巴细胞中TLR4及其信号通路下游基因IKK、I $\kappa$ B与细胞因子IL-2、LITAF的mRNA表达量( $P < 0.05$ ),同时可显著提高转染淋巴细胞中TLR4的mRNA表达量( $P < 0.05$ );此外,PAMK还可不同程度地促进转染淋巴细胞中1型辅助性T细胞(Th1)分泌的细胞因子[IL-2( $P > 0.05$ )、IFN- $\gamma$ ( $P < 0.05$ )、LITAF( $P > 0.05$ )]的表达,对2型辅助性T细胞(Th2)分泌的细胞因子(IL-4)的表达无显著促进作用( $P > 0.05$ );EMSA结果显示PAMK能促进转染和非转染淋巴细胞内NF- $\kappa$ B入核,使核蛋白中NF- $\kappa$ B的含量显著升高( $P < 0.05$ )。综上所述,PAMK可活化TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路,促进相关基因表达,最终使NF- $\kappa$ B进入细胞核调控细胞因子的转录水平,进而调控雏鸡脾脏淋巴细胞免疫功能。

**关键词:** 白术多糖;脾脏淋巴细胞;RNA干扰;Toll样受体4;核因子- $\kappa$ B

中图分类号:S816.7;Q2

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)11-5192-10

白术多糖(polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz, PAMK)作为白术发挥其生物活性的主要成分,药理研究证实其具有促进动物生长、增强免疫力、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗应激等作用<sup>[1-4]</sup>。研究发现,PAMK可显著提高鸡<sup>[5]</sup>及大鼠<sup>[6]</sup>的胸腺、脾脏指数;可提高免疫抑制雏鹅的体重、降低料重比,缓解免疫抑制雏鹅胸腺组织的损伤,维持其体液免疫和细胞免疫功能的稳定<sup>[7]</sup>;增强外周血(人、小鼠、鸡)和脾脏(小鼠、鸡)的淋巴细胞增殖能力,促进T淋巴细胞进入S期和G2/M期,并提高CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比<sup>[8-9]</sup>;还

可促进小鼠脾脏淋巴细胞体外分泌更多的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),提高鸡血清中白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、 $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和IL-6 mRNA的表达<sup>[8-10]</sup>。上述研究结果证实,PAMK对动物的细胞免疫功能具有显著的促进作用,对调控T细胞分泌细胞因子的作用十分复杂,因此,进一步探索PAMK对细胞免疫的调控机制,有助于全面了解PAMK对免疫功能的影响。

许多植物多糖可作为Toll样受体4(Toll-like

收稿日期:2019-04-15

基金项目:广东省教育厅基础研究重大项目(2017KZDXM046)

作者简介:李婉雁(1988—),女,广东广州人,讲师,博士,研究方向为动物营养与免疫。E-mail: lwanyan88@126.com

\*通信作者:许丹宁,教授,硕士生导师,E-mail: xdanning212@126.com

receptor 4, TLR4) 配体进而激活 TLR4/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 信号通路,活化转录因子 NF- $\kappa$ B,调控细胞因子的转录,提升机体的免疫防御能力<sup>[11-15]</sup>,Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在先天免疫应答中起着重要的作用<sup>[16]</sup>,主要通过识别配体脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),结合髓样分化因子 88 (myclloid differentiation factor 88, MyD88),招募相关激酶并激活 NF- $\kappa$ B 抑制物的激酶 (inhibitor of NF- $\kappa$ B kinases, IKK),使结合 NF- $\kappa$ B 的 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 发生磷酸化并解离,活化 NF- $\kappa$ B 进入细胞核,启动或抑制靶基因的转录,进而调控先天性免疫应答反应<sup>[17-19]</sup>。有研究发现,PAMK 可通过 TLR4 激活巨噬细胞转录因子 NF- $\kappa$ B 并诱导巨噬细胞合成细胞因子<sup>[20-21]</sup>,PAMK 是否也可通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调控细胞免疫功能还需要进一步的研究证实。

据此,本试验以 RNA 干扰雏鸡脾脏淋巴细胞中 *TLR4* 基因表达,同时添加 12.5 mg/L PAMK 培养转染和未转染淋巴细胞,通过检测 TLR4 及其信号通路下游基因 (*TLR4*, *MyD88*, *IKK*, *I $\kappa$ B*) 及细胞因子 [*IL-2*、白细胞介素-4 (interleukin-4, *IL-4*)、*IFN- $\gamma$* 、脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor- $\alpha$ , *LITAF*)] 的 mRNA 表达量,并以电泳迁移率试验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 方法检测细胞核蛋白中 NF- $\kappa$ B 的含量,从细胞免疫角度探讨 PAMK 提高机体免疫功能的分子机制,为今后开发绿色、无毒的免疫增强剂提供理论依据。

## 1 材料与方

### 1.1 雏鸡脾脏淋巴细胞的分离培养

宰杀 21 日龄雏鸡,取出脾脏置于 200 目筛网,用注射器内芯轻轻压碎脾脏,收集细胞并转移至含有淋巴细胞分离液的离心管中,2 000 r/min 离心 20 min,吸取中间白色云雾状淋巴细胞,磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 2 次,台盼蓝染色计数,要求细胞活率 >95%。

### 1.2 TLR4 siRNA 引物设计及筛选

根据岭南黄鸡 TLR4 基因序列 (登录号:KF476603.1),设计 3 对 siRNA 引物 (P1、P2、P3) 以及 1 对阴性对照引物 (NC),见表 1。引物由上

海生工生物工程有限公司合成。

表 1 siRNA 引物序列

Table 1 siRNA primer sequences

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'—3')
P1	F:CUUCAAUUCUGACAUCAGUTT R:ACUGAUGUCAGAAUUGAAGTT
P2	F:CCUUUGAGAACAAUACAUTT R:AAUGUAUUGUUCUCAAAAGTT
P3	F:GUACUUUCUCUGAACAAUATT R:UAUUGUUCAGAGAAAGUACTT
NC	F:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

使用 Opti-MEM 培养基,按  $5 \times 10^4$  个/mL 的密度接种淋巴细胞至 6 孔板培养 24 h 后,每孔添加 2  $\mu$ L Lipofectamine 2000 转染试剂 (购自 Thermo Fisher Scientific Inc, 美国),分别添加 4 对引物 (P1、P2、P3、NC) 使终浓度分别为 400、200、100 nmol/L,每个处理设 3 个重复。孵育 4 h 后换液为 RPMI 1640 完全培养基。转染 36 h 后,收集细胞。用 Trizol 法提取细胞总 RNA,检测 RNA 的纯度及完整性,反转录为 cDNA,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 为内参基因,用实时荧光定量 PCR 方法检测各样品中 *TLR4* 的 mRNA 表达量,筛选出 *TLR4* mRNA 表达量最低的 1 对 siRNA 引物用于后续试验。

### 1.3 PAMK 对雏鸡脾脏淋巴细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

#### 1.3.1 试验设计

试验共分为 4 组,分别为 cell (对照)、cell+ (PAMK 处理)、si (转染对照)、si+ (转染与 PAMK 共处理),具体的试验设计见表 2。PAMK 购于西安天园生物制剂厂,含量为 70%,剩余成分包括灰分 (约 3%)、单宁、类黄酮、萜类化合物、糖苷、植物蛋白等。根据预试验结果,确定 PAMK 的作用浓度为 12.5 mg/L。每个处理设 3 个重复。使用 Opti-MEM 培养基,按  $5 \times 10^4$  个/mL 的密度接种淋巴细胞至 6 孔板中,预培养 24 h 后按试验设计分组处理。转染时,每孔添加 2  $\mu$ L Lipofectamine 2000 转染试剂,孵育 4 h 后换液为 RPMI 1640 完全培养基。转染 36 h 后,收集细胞,提取细胞总 RNA。

表 2 试验设计

Table 2 Experimental design

组别 Groups	处理 Treatment	组别 Groups	处理 Treatment
cell	未转染淋巴细胞	si	转染淋巴细胞
cell+	未转染淋巴细胞+12.5 mg/L PAMK	si+	转染淋巴细胞+12.5 mg/L PAMK

### 1.3.2 目的基因 mRNA 表达量检测

按照反转录试剂盒(购自 Thermo Fisher Scientific Inc, 美国)操作程序进行反转录:合成 cDNA 不超过 5  $\mu$ g, Random primer 1  $\mu$ L, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补足至 12  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 反应 5 min。每管加入 5 $\times$ Reation Buffer 及 Transcriptase、dNTP 等混合物共 8  $\mu$ L, 25  $^{\circ}$ C 反应 5 min, 42  $^{\circ}$ C 反应 60 min。

以反转录的 cDNA 为模板,以 *GAPDH* 为内参基因,对目的基因(*TLR4*、*MyD88*、*IKK*、*I $\kappa$ B*、*IL-2*、*IL-4*、*IFN- $\gamma$* 、*LITAF*)的 mRNA 表达量进行检测分析。各基因的引物序列见表 3,由上海生工生物工

程有限公司合成。使用实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Invitrogen, 美国),反应体系为: cDNA (1:20) 5  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$  SYBR Green qPCR SuperMix 10  $\mu$ L, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。ABI 7500 系统进行实时荧光定量 PCR 检测。PCR 扩增程序: 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 32 s, 40 个循环。目的基因相对定量的结果按照相对比较 Ct 法 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法) 进行计算:

$\Delta Ct$  = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值;

$\Delta\Delta Ct$  = 试验组  $\Delta Ct$  值 - 对照组  $\Delta Ct$  值。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 3 Primer sequences for real-time qPCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	产物长度 Length of products/bp	登录号 Accession number
Toll 样受体 4 <i>TLR4</i>	F: CCGATATCTGAGGAGGACA R: CTCCAAGCACAAACATCA	120	KP410249.1
髓样分化因子 88 <i>MyD88</i>	F: CTCCTAAACCTTCAGACTTCCA R: CTGTAGGAAGGCACTAATGG	140	NM_001030962.1
核因子- $\kappa$ B 抑制物的激酶 <i>IKK</i>	F: CCTGCCCAAACAATCTAAAC R: GTTCCCGTAACCATGTTCAA	184	NM_001031397.1
核因子- $\kappa$ B 的抑制蛋白 <i>I<math>\kappa</math>B</i>	F: CACAAACGTCCCATCTGCTT R: GCCCACAGTTAACATCATTGC	160	NM_001001472.2
白细胞介素-2 <i>IL-2</i>	F: TCATCTCGAGCTCTACACACCAA R: TGCATTCACTTCCGGTGTGAT	200	NM_204153.1
白细胞介素-4 <i>IL-4</i>	F: ATTGTTTGGGAGAGCCAGCACTG R: TCAGGAGCTGACGCATGTTGAG	70	NM_001007079.1
$\gamma$ -干扰素 <i>IFN-<math>\gamma</math></i>	F: GCTCCCGATGAACGACTTGA R: TAGTTGAGCACAGGAGTTCATAAGAT	160	NM_205149.1
脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- $\alpha$ <i>LITAF</i>	F: GACCAGATGGGAAGGGAATGA R: ACGGGTTGCTGCACATACAC	100	NM_204267.1
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	F: TGAAAGTCGGAGTCAACGGAT R: ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT	230	NM_204305.1

### 1.3.3 总核蛋白的提取及浓度检测

根据核蛋白提取试剂盒(购自 Thermo Fisher Scientific Inc, 美国)操作说明提取细胞核蛋白: 向

细胞中加入适量的 CER II Buffer, 涡旋振荡 5 s, 冰上孵育 1 min; 涡旋振荡 5 s, 16 000 $\times$ g 离心 5 min; 加入 Buffer C, 涡旋振荡 15 s, 冰上孵育

40 min, 16 000 $\times$ g 离心 10 min 收集上清获得核蛋白。参考蛋白质浓度检测试剂盒(购自 Thermo Fisher Scientific Inc, 美国)操作说明, 使用双辛丁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总核蛋白浓度。

#### 1.3.4 核蛋白中 NF- $\kappa$ B 含量的检测

生物素标记 NF- $\kappa$ B 探针(购自上海碧云天生物技术有限公司)序列如下: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'。配制 6.5% 聚丙烯酰胺凝胶, 低温 100 V 预电泳 60 min。每个上样体系包括: 6  $\mu$ L Mix, 生物素标记 NF- $\kappa$ B 探针 1  $\mu$ L, 20  $\mu$ g 核蛋白并添加 ddH<sub>2</sub>O 使终体积为 20  $\mu$ L, 室温孵育 10 min。加入 5  $\mu$ L Loading buffer 上样, 100 V 恒压电泳 45 min, 装配电转移槽, 100 V 恒压转膜 45 min。将膜正面朝上放置在紫外灯下交联 20 min, 使用辣根过氧化物酶(horseradish per-

oxidase, HRP) 化学发光法曝光。各组 NF- $\kappa$ B 的含量以结合探针条带的灰度值表示, 设定 cell 组的灰度值为 1, 其余各组的灰度值为该组的相对值。

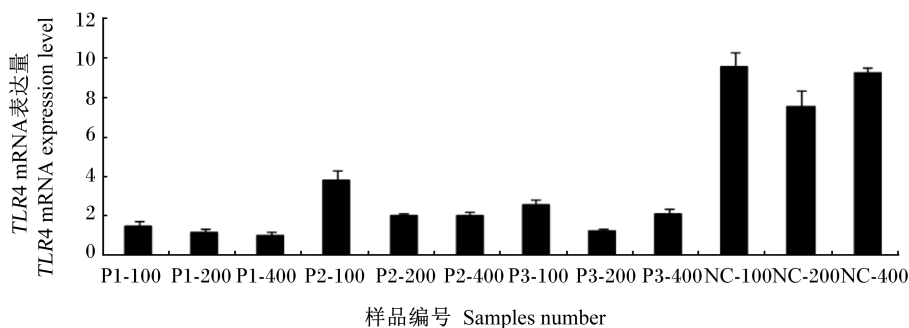
#### 1.4 数据处理及统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件对试验数据进行分析, 选用单因素方差分析对试验数据进行处理, 组间多重比较采用 Bonferroni 法进行,  $P < 0.05$  为差异显著。试验数据均采用平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)的方式表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 siRNA 引物筛选结果

图 1 显示, 样品 P1-400 的 *TLR4* mRNA 表达量最低, 转染效率(发绿色荧光细胞的百分比)达 86.19%。由此可知, 使用浓度为 400 nmol/L 的 P1 siRNA 引物转染雏鸡脾脏淋巴细胞的效果最好, 该引物可用于后续试验。



样品编号: siRNA 引物名称-引物浓度(nmol/L)。

Samples number: siRNA primer name-primer concentration (nmol/L).

图 1 不同 siRNA 引物对 *TLR4* mRNA 表达量的影响

Fig.1 Effects of different siRNA primers on *TLR4* mRNA expression

### 2.2 PAMK 对 *TLR4* 及其信号通路中下游基因和细胞因子 mRNA 表达量的影响

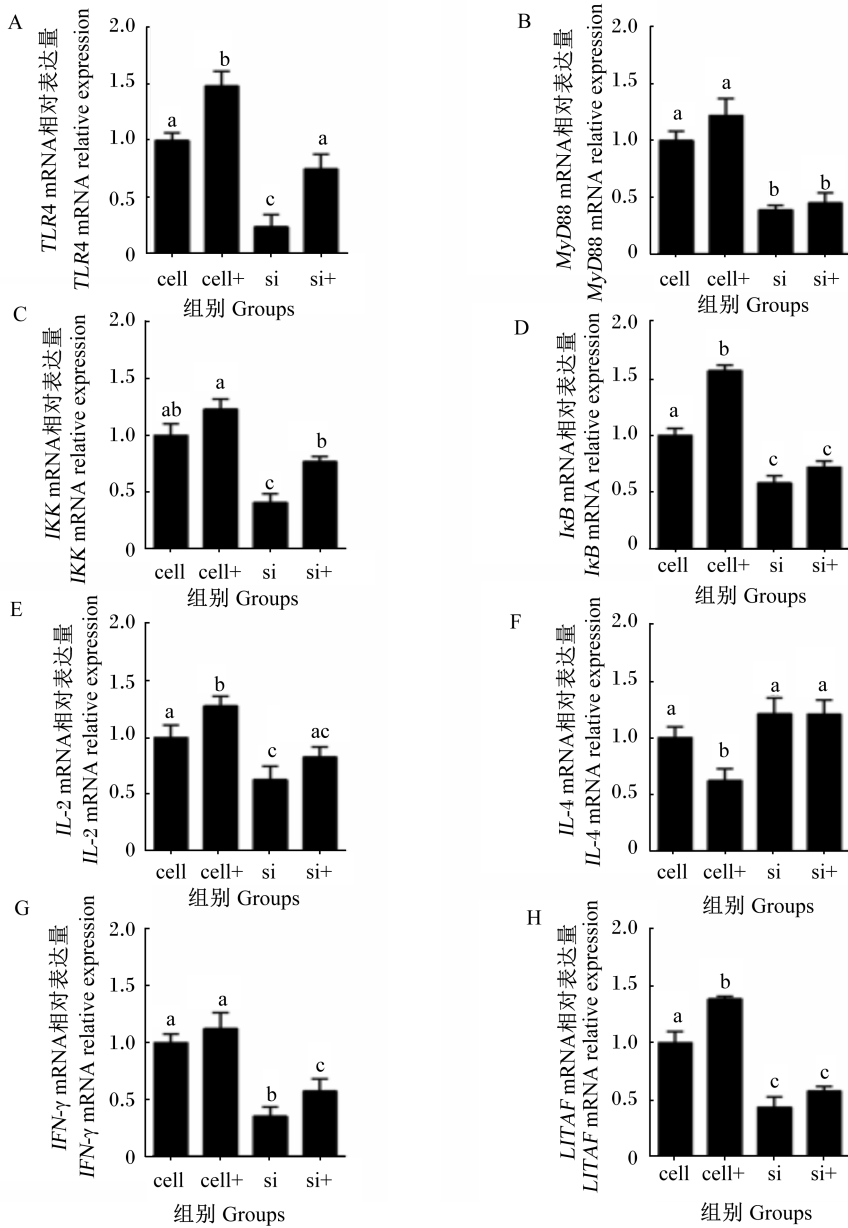
如图 2 所示, 添加 12.5 mg/L PAMK 处理淋巴细胞后, cell+组中除 *IL-4* 的 mRNA 表达量较 cell 组显著下降( $P < 0.05$ )外, 其余各基因的 mRNA 表达量均有不同程度的升高, 其中 *TLR4*、*I $\kappa$ B*、*IL-2*、*LITAF* 的 mRNA 表达量分别为 cell 组的 1.48、1.57、1.28、1.39 倍, 均与 cell 组差异显著( $P < 0.05$ )。干扰 *TLR4* 基因的表达后, si 组中 *TLR4* 的 mRNA 表达量为 cell 组的 23.9%, 与 cell 组相比差异显著( $P < 0.05$ ); si 组中 *MyD88*、*IKK*、*I $\kappa$ B*、*IL-2*、*IFN- $\gamma$* 、*LITAF* 的 mRNA 表达量与 cell 组相比均显

著降低( $P < 0.05$ ); 此外, si 组中 *IL-4* 的 mRNA 表达量与 cell 组相比有所上升但差异不显著( $P > 0.05$ )。干扰 *TLR4* 基因表达并同时添加 12.5 mg/L PAMK 处理淋巴细胞后, si+组中 *TLR4*、*IKK*、*IFN- $\gamma$*  的 mRNA 表达量显著高于 si 组( $P < 0.05$ ); 此外, si+组中 *TLR4*、*IKK*、*IL-2* 及 *IL-4* 的 mRNA 表达量与 cell 组接近, 组间差异不显著( $P > 0.05$ )。由上述结果可知, 干扰 *TLR4* 基因表达后, *TLR4* 信号通路下游基因(*MyD88*、*IKK*、*I $\kappa$ B*)及细胞因子(*IL-2*、*IFN- $\gamma$* 、*LITAF*)的 mRNA 表达量被显著抑制, 说明本试验成功干扰了 *TLR4*/NF- $\kappa$ B 信号通路的表达; 然而, 在培养液中添加



12.5 mg/L PAMK 虽可显著促进 *TLR4* 基因的表达,但对 *TLR4* 信号通路下游基因及细胞因子的作

用却呈现不同的作用效果。



数据柱标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下图同。

Data columns with different small letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图2 PAMK对TLR4及其信号通路中下游基因和细胞因子mRNA表达量的影响

Fig.2 Effects of PAMK on mRNA expression levels of *TLR4* and downstream genes and cytokines in *TLR4* signal pathway

### 2.3 PAMK对核蛋白中NF-κB含量的影响

如图3所示,si组核蛋白中NF-κB的含量较cell组显著减少 ( $P < 0.05$ ),可知干扰*TLR4*基因的表达后细胞核内NF-κB含量显著减少;然而,

cell+、si+组核蛋白中NF-κB的含量分别显著高于cell、si组 ( $P < 0.05$ ),可知PAMK能显著促进细胞质内游离NF-κB的表达及NF-κB入核。

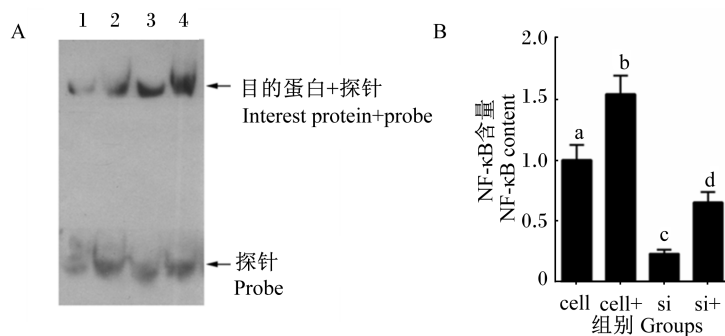


图 A 从左往右 1~4 号泳道分别为 si、si+、cell、cell+ 组样品。

Lanes 1 to 4 were the samples in si, si+, cell and cell+ groups in figure A.

图 3 PAMK 对核蛋白中 NF- $\kappa$ B 含量的影响

Fig.3 Effects of PAMK on NF- $\kappa$ B content in nucleoprotein

### 3 讨论

PAMK 经提纯可得到 PAMK-1 和 PAMK-2 2 种多糖, PAMK-1 包括半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖, PAMK-2 由木糖、阿拉伯糖、半乳糖组成<sup>[22-23]</sup>, 具有显著的促生长、增强免疫功能等多种作用<sup>[5, 21, 24-25]</sup>, 大量的研究证明了天然的植物多糖主要是通过 TLR4 受体激活细胞通路, 活化转录因子, 进而调控细胞因子的释放。TLR4 是细胞上的跨膜蛋白, 广泛存在于 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面, 其参与的信号转导对免疫系统的调节发挥着至关重要的作用<sup>[26]</sup>。TLR4 参与的信号转导通路复杂, 其中根据是否需要 MyD88, 可分为 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径 2 种作用途径<sup>[27]</sup>。LPS 是 TLR4 的激活剂, 可结合膜上的 TLR4 并激活下游信号通路, 调节炎症因子的转录和表达<sup>[28]</sup>。Karnati 等<sup>[29]</sup>研究发现, 用 LPS 处理鸡外周血淋巴细胞, 可促进 TLR4 诱导 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径信号通路上调, 且这 2 种途径更有利于单核细胞介导先天性免疫。在本研究结果中, TLR4 mRNA 表达量下降与 MyD88 mRNA 表达量的下调程度并不一致。

研究表明, 黄芪多糖、五味子多糖、当归多糖、大黄多糖等植物多糖同样可以作为 TLR4 的配体。这些植物多糖作为配体结合 TLR4 并激活下游信号通路, 活化 NF- $\kappa$ B, 调控细胞因子的表达, 进而发挥免疫调控作用<sup>[13-15, 30]</sup>。桔梗根多糖等被证实可通过 TLR4 作用激活巨噬细胞和 B 淋巴细胞, 进而增强机体免疫<sup>[5, 24-25]</sup>; 红花多糖则被证实可通过 TLR4 等受体激活转录因子 NF- $\kappa$ B, 从而诱导巨

噬细胞合成相关的细胞因子<sup>[31]</sup>; Lin 等<sup>[32]</sup>研究发现, 从灵芝中分离的多糖可以促进树突状细胞 (dendritic cells, DC) 的成熟, 增强 DC 活化 T 淋巴细胞的能力, 并且证实灵芝多糖的功能与 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B 通路活化有密切关系。研究报道指出, PAMK 可通过 TLR4 激活转录因子 NF- $\kappa$ B, 进而激活巨噬细胞并诱导巨噬细胞合成细胞因子<sup>[20-21]</sup>。从本试验结果可知, PAMK 可以促进淋巴细胞中 TLR4 基因的表达, 同时可上调因 RNA 干扰导致的 TLR4 基因表达下降, 进一步证明 PAMK 可作为 TLR4 配体之一, 参与机体的免疫调控。

TLR4 通路活化后, 可促进 NF- $\kappa$ B 进入细胞核并与 DNA 启动子上特定识别序列结合, 介导细胞因子白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 等的表达, 进而发挥免疫调节功能<sup>[19, 33]</sup>。因此, 在本试验中, 由于 TLR4 mRNA 表达量的降低导致细胞核内 NF- $\kappa$ B 含量的显著减少; 而 PAMK 能显著促进正常状态及 TLR4 表达被干扰状态下细胞质内游离 NF- $\kappa$ B 的表达及入核, 参与细胞因子的调控。辅助性 T 细胞 (helper T lymphocyte, Th) 可分泌多种细胞因子, 调节免疫应答。Th 按产生的细胞因子不同分为 Th1 和 Th2 两大功能亚群。Th1 分泌 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等促炎症细胞因子。IL-4 是 Th2 的标志因子, 其含量显著升高提示机体免疫处于体液免疫主导, Th1 与 Th2 维持动态平衡有利于保护机体的免疫功能<sup>[34]</sup>。本试验结果发现, TLR4 的 mRNA 表达量下降后, 细胞因子 (IL-2、IFN- $\gamma$ ) 的 mRNA 表达量也发生不同程度下降, 这与 Tren-

tin-Sonoda 等<sup>[35]</sup>的结论一致。此外, Hou 等<sup>[36]</sup>报道, 黄芪多糖可以有效维持 Th1 与 Th2 的动态平衡, NF- $\kappa$ B 活化入核后, 可刺激白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子的表达, 同时这些细胞因子又是 NF- $\kappa$ B 的刺激剂, 可进一步活化 NF- $\kappa$ B 造成持续的炎症反应。

本研究发现, PAMK 不仅可提高淋巴细胞中 TLR4 基因的表达, 而且还可引起 TLR4 信号下游基因表达量的变化, 可活化 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 使 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路表达增强, 最终产生游离的 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 进入细胞核能与多种基因启动子或增强子序列的特定位点发生特异性结合, 进而促进细胞因子的转录和表达, 这与上述研究中多糖的作用通路几乎一致。然而, Liu 等<sup>[37]</sup>研究发现沙棘多糖可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路保护 LPS/D-氨基半乳糖胺 (D-galactosamine, d-GalN) 诱导的肝损伤。Han 等<sup>[38]</sup>报道刺五加多糖可引起 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B 表达的下调, 从而保护肠道的完整性。这是由于在 LPS 刺激或免疫损伤情况下, 导致 TLR4 发生不利于机体的表达量上升, 而沙棘多糖和刺五加多糖通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化, 从而发挥免疫保护作用。可见, 不同植物多糖对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的作用是不一致的, 但都能对机体产生不同的保护作用。因此, 不同植物多糖对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的调控还有待更深入的研究。

## 4 结 论

PAMK 可促进雏鸡脾脏淋巴细胞中 TLR4 基因的表达, 并进一步活化 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 使 NF- $\kappa$ B 入核并调控细胞因子的表达, 从而发挥免疫调控作用。

## 参考文献:

- [ 1 ] XU D N, LI B X, CAO N, et al. The protective effects of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) on the chicken spleen under heat stress via antagonizing apoptosis and restoring the immune function [ J ]. *Oncotarget*, 2017, 8(41) : 70394-70405.
- [ 2 ] LI X J, LIU F, LI Z, et al. *Atractylodes macrocephala* polysaccharides induces mitochondrial-mediated apoptosis in glioma C6 cells [ J ]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 66 : 108-112.
- [ 3 ] SHU Y T, KAO K T, WENG C S. *In vitro* antibacteri-  
al and cytotoxic activities of plasma-modified polyethylene terephthalate nonwoven dressing with aqueous extract of rhizome *Atractylodes macrocephala* [ J ]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 77 : 606-612.
- [ 4 ] WANG J C, CHEN J, PAN K W. Effect of exogenous abscisic acid on the level of antioxidants in *Atractylodes macrocephala* Koidz under lead stress [ J ]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(3) : 1441-1449.
- [ 5 ] XU D N, TIAN Y B. Selenium and polysaccharides of *Atractylodes macrocephala* Koidz play different roles in improving the immune response induced by heat stress in chickens [ J ]. *Biological Trace Element Research*, 2015, 168(1) : 235-241.
- [ 6 ] GUO L, SUN Y L, WANG A H, et al. Effect of polysaccharides extract of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* on thymus, spleen and cardiac indexes, caspase-3 activity ratio, Smac/DIABLO and HtrA2/Omi protein and mRNA expression levels in aged rats [ J ]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(10) : 9285-9290.
- [ 7 ] LI W Y, GUO S X, XU D N, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) relieves immunosuppression in cyclophosphamide-treated geese by maintaining a humoral and cellular immune balance [ J ]. *Molecules*, 2018, 23(4) : 932-947.
- [ 8 ] LIU J, CHEN X, YUE C J, et al. Effect of selenylation modification on immune-enhancing activity of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide [ J ]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72 : 1435-1440.
- [ 9 ] SUN W J, MENG K, QI C H, et al. Immune-enhancing activity of polysaccharides isolated from *Atractylodes macrocephalae* Koidz [ J ]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 126 : 91-96.
- [ 10 ] SON Y O, KOOK S H, LEE J C. Glycoproteins and polysaccharides are the main class of active constituents required for lymphocyte stimulation and antigen-specific immune response induction by traditional medicinal herbal plants [ J ]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(10) : 1011-1021.
- [ 11 ] ZHOU L J, LIU Z J, WANG Z X, et al. *Astragalus* polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [ J ]. *Science Report*, 2017, 7 : 44822.

- [12] 刘瑞.黄芪多糖影响雏鸡免疫器官 TLR4 信号转导通路的研究[D].硕士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [13] ZHAO T, FENG Y, LI J, et al. *Schisandra* polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR 4-mediated activation of macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 65: 33-40.
- [14] LIU L, YUAN S S, LONG Y, et al. Immunomodulation of *Rheum tanguticum* polysaccharide (RTP) on the immunosuppressive effects of dexamethasone (DEX) on the treatment of colitis in rats induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid[J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9(13/14): 1568-1577.
- [15] GONG A G, ZHANG L M, LAM C T, et al. Polysaccharide of *Danggui Buxue Tang*, an ancient Chinese herbal decoction, induces expression of pro-inflammatory cytokines possibly via activation of NF $\kappa$ B signaling in cultured RAW 264.7 cells[J]. *Phytotherapy Research*, 2017, 31(2): 274-283.
- [16] JIN B, SUN T, YU X H, et al. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation[J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012: 836485.
- [17] PŁÓCIENNIKOWSKA A, HRMADA-JUDYCKA A, BORZECKA K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2015, 72(3): 557-581.
- [18] FAN G W, JIANG X R, WU X Y, et al. Anti-inflammatory activity of tanshinone II A in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via miRNAs and TLR4-NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 375-384.
- [19] HUANG X Q, XIE Z J, LIU F F, et al. Dihydroartemisinin inhibits activation of the Toll-like receptor 4 signaling pathway and production of type I interferon in spleen cells from lupus-prone MRL/lpr mice[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 22(1): 266-272.
- [20] JI G Q, CHEN R Q, ZHENG J X. Macrophage activation by polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz through the nuclear factor- $\kappa$ B pathway[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(4): 512-517.
- [21] PI J, WANG Y Y, ZHU H Y, et al. Immunomodulatory effects of polysaccharide compounds in macrophages revealed by high resolution AFM[J]. *Scanning*, 2016, 38(6): 792-801.
- [22] TANAKA K, INA A. Structure elucidation of acylsucrose derivatives from *Atractylodes lanceae* rhizome and *Atractylodes rhizome*[J]. *Natural Product Communication*, 2009, 4(8): 1095-1098.
- [23] WANG X T, LI L H, RAN X K, et al. What caused the changes in the usage of *Atractylodes Macrocephala* Rhizoma from ancient to current times? [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2016, 70(1): 36-44.
- [24] XU D N, LI W Y, HUANG Y M, et al. The effect of selenium and polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz. (PAMK) on immune response in chicken spleen under heat stress[J]. *Biological Trace Element Research*, 2014, 160(2): 232-237.
- [25] LI W Y, GUO S X, XU D N, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) relieves immunosuppression in cyclophosphamide-treated geese by maintaining a humoral and cellular immune balance[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 932.
- [26] CEN X H, LIU S W, CHENG K. The role of Toll-like receptor in inflammation and tumor immunity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 878.
- [27] AHMED-HASSAN H, ABDUL-CADER M, SABRY M, et al. Toll-like receptor (TLR) 4 signalling induces myeloid differentiation primary response gene (MYD) 88 independent pathway in avian species leading to type I interferon production and antiviral response[J]. *Virus Research*, 2018, 256: 107-116.
- [28] HACKAM D J, SODHI C P. Toll-like receptor-mediated intestinal inflammatory imbalance in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 6(2): 229-238.
- [29] KARNATI H K, PASUPULETI S R, KANDI R, et al. TLR-4 signalling pathway: MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment[J]. *Veterinary Research Communications*, 2015, 39(1): 73-78.
- [30] ZHOU L J, LIU Z J, WANG Z X, et al. *Astragalus* polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Science Report*, 2017, 7: 44822.
- [31] HAN S B, YOON Y D, AHN H J, et al. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 38(6): 792-801.



- cology, 2003, 3(9): 1301–1312.
- [32] MENG J J, HU X F, SHAN F P, et al. Analysis of maturation of murine dendritic cells (DCs) induced by purified *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(4): 693–699.
- [33] WEINLICH R, BORTOLUCI K R, CHEHAB C F, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE<sub>2</sub> by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells [J]. Cell Death and Differentiation, 2008, 15(12): 1901–1909.
- [34] MA L, ZHANG L W, ZHUANG Y, et al. Serum levels of IL-33 and correlation with IL-4, IL-17A, and hypergammaglobulinemia in patients with autoimmune hepatitis [J]. Mediators of Inflammation, 2018, 2018: 7964654.
- [35] TRENTIN-SONODA M, DA SILVA R, KMIT F, et al. Knockout of Toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e139350.
- [36] HOU Y C, WU J M, WANG M Y, et al. Modulatory effects of *Astragalus* polysaccharides on T-cell polarization in mice with polymicrobial sepsis [J]. Mediators of Inflammation, 2015, 2015: 826319.
- [37] LIU H, ZHANG W, DONG S C, et al. Protective effects of sea buckthorn polysaccharide extracts against LPS/d-GalN-induced acute liver failure in mice via suppressing TLR4-NF-κB signaling [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 176: 69–78.
- [38] HAN J, LIU L X, YU N, et al. Polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* enhances intestinal integrity through inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathways in lipopolysaccharide-challenged mice [J]. Animal Science Journal, 2016, 87(8): 1011–1018.

## Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz Regulates Lymphocyte Immune Function in Chick Spleen by Toll-Like Receptor 4/ Nuclear Factor-Kappa B Signal Pathway

LI Wanyan<sup>1,2</sup> CAO Nan<sup>1,2</sup> TIAN Yunbo<sup>1,2</sup> XIANG Xuelian<sup>1,2</sup>  
LI Bingxin<sup>1,2</sup> HUANG Yunmao<sup>1,2</sup> XU Danning<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Guangdong Province Key Laboratory of Waterfowl Healthy Breeding, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) on lymphocyte immune function in chick spleen and possible regulatory mechanisms. The spleen lymphocytes of 21-day-old chicks were isolated and cultured *in vitro*, the lymphocytes were transfected by siRNA primers and the expression of Toll-like receptor 4 (*TLR4*) was interfered. On that basis, PAMK with the concentration of 12.5 mg/L was used to treat transfected and non-transfected lymphocytes. After 36 h, the mRNA expression levels of *TLR4* and its signaling pathway downstream genes [such as myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*), nuclear factor-kappa B (*NF- $\kappa$ B*) inhibitor kinase (*IKK*), *NF- $\kappa$ B* inhibitory protein (*I $\kappa$ B*)] and cytokines [such as interleukin-2 (*IL-2*), interleukin-4 (*IL-4*), interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ), lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor- $\alpha$  (*LITAF*)] were detected. In addition, the content of *NF- $\kappa$ B* in lymphocyte nuclear protein was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method. The results showed that PAMK could significantly increase the mRNA expression levels of *TLR4* and its signaling pathway downstream genes *IKK*, *I $\kappa$ B*, cytokines *IL-2* and *LITAF* in non-transfected lymphocytes ( $P < 0.05$ ), and significantly increase the mRNA expression levels of *TLR4* in transfected lymphocytes ( $P < 0.05$ ). In addition, PAMK could also promote the expression of cytokines [*IL-2* ( $P > 0.05$ ), *IFN- $\gamma$*  ( $P < 0.05$ ), *LITAF* ( $P > 0.05$ )] secreted by type 1 helper T cells (Th1) in transfected lymphocytes to different degrees, there was no significant promoting effect on the expression of cytokine (*IL-4*) secreted by type 2 helper T cells (Th2) ( $P > 0.05$ ). EMSA results showed that PAMK could promote *NF- $\kappa$ B* into the nuclear in transfected and non-transfected lymphocytes, and significantly increase the content of *NF- $\kappa$ B* in nuclear protein ( $P < 0.05$ ). In summary, PAMK activates *TLR4/NF- $\kappa$ B* signaling pathway to promote the expression of related genes, and finally promotes *NF- $\kappa$ B* into the nuclear to regulate the transcription level of cytokines, and then regulates lymphocyte immune function in chick spleen. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(11):5192-5201]

**Key words:** polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz; spleen lymphocyte; RNA interference; *TLR4*; *NF- $\kappa$ B*