

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.09.07

刺五加多糖对雏鸡脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞定位分布的影响

张英楠^{1,2}, 徐晶¹, 张桂山¹, 杨树宝^{1,3*}

(1. 吉林医药学院, 吉林吉林 132013; 2. 长春科技学院, 长春 130600;

3. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

[收稿日期] 2021-01-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 09-0044-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了研究刺五加多糖(ASPS)对雏鸡脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞定位分布的影响,从组织学角度评价 ASPS 对脾脏的免疫调节作用,试验将 1 日龄海兰褐公雏饲养至 7 日龄时选取 150 只,随机分为 3 组:空白对照组、ASPS 低剂量组(ASPS_L)和高剂量组(ASPS_H),每组 50 只,所有组每天注射 1 次,连续注射 3 d。免疫后的第 7、14、21 和 28 天分别取其脾脏制作冰冻切片,采用免疫组织化学方法检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的定位分布。结果显示,与空白对照组比较,免疫注射后 21 d 和 28 d 时 ASPS_L 组和 ASPS_H 组 CD4⁺ T 淋巴细胞的数量均显著增加($P < 0.05$),而且 ASPS 能够促进红髓中 CD4⁺ T 淋巴细胞向动脉周围淋巴鞘迁移,从而使单个动脉周围淋巴鞘面积较对照组明显增加,而 ASPS 对脾脏中 CD8⁺ T 淋巴细胞的数量和分布无明显影响。由此可知,ASPS 能够通过影响脾脏中 CD4⁺ T 淋巴细胞的定位分布发挥免疫调节作用,这对于进一步揭示 ASPS 的免疫调节机制具有重要意义。

[关键词] 刺五加多糖;脾脏;CD4⁺ T 淋巴细胞;CD8⁺ T 淋巴细胞;鸡;定位分布

Effects of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide on Distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes in Chicken Spleen

ZHANG Ying-nan^{1,2}, XU Jing¹, ZHANG Gui-shan¹, YANG Shu-bao^{1,3*}

(1. Jilin Medical University, Jilin 132013, China; 2. College of Life Science, Changchun Sci-Tech University, Changchun, 130600, China;

3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding author: YANG Shu-bao, E-mail: yangshubao1981@163.com

Abstract: In order to investigate the effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASPS) on the localization and distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the spleen of chicks, and evaluate the immunomodulatory

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20200355KJ;JJKH20201293 JY);国家自然科学基金资助项目(31372391)

作者简介: 张英楠,博士,副教授,从事植物提取物营养免疫调节作用的研究。

通讯作者: 杨树宝。E-mail: yangshubao1981@163.com

effect of ASPS on spleen from the perspective of histology, 150 Hy-Line brown male chicks at 1-day-old were randomly divided into 3 groups with 50 chicks in each group: blank control group, ASPS low-dose group (ASPS_L) and ASPS high-dose group (ASPS_H). All groups were injected once a day for 3 consecutive days. The distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was detected by immunohistochemistry at 7, 14, 21 and 28 days after immunization. The results showed that compared with blank control group, the number of CD4⁺ T lymphocytes in ASPS_L and ASPS_H groups was significantly increased at 21 and 28 days after immunization ($P < 0.05$), and ASPS could promote the migration of CD4⁺ T lymphocytes from the red pulp to the periarterial lymphatic sheath, so that the area of single periarterial lymphatic sheath was significantly increased compared with the control group. However, ASPS had no significant effect on the number and distribution of CD8⁺ T lymphocytes in spleen. The results revealed that ASPS could play an immunomodulatory role by affecting the localization and distribution of CD4⁺ T lymphocytes in the spleen, which is of great significance for further revealing the immunomodulatory mechanism of ASPS.

Key words: *Acanthopanax senticosus* polysaccharide; spleen; CD4⁺ T lymphocytes; CD8⁺ T lymphocytes; chicken; distribution

刺五加多糖(ASPS)是从刺五加根茎中分离出的免疫活性多糖,具有调节动物免疫功能、抗氧化、抗肿瘤和抗感染等功效^[1-2]。结合刺五加的功效及其安全、绿色和环保的特点,将其应用于养殖过程中具有重要意义。

T淋巴细胞主要介导细胞免疫,机体在抗原刺激下,通过致敏和反应阶段,T淋巴细胞分化为效应性T淋巴细胞并产生各种细胞因子,从而抵抗抗体内外各种病原菌的感染^[3]。T淋巴细胞两个重要的表面标志是CD4和CD8,其中CD4⁺T淋巴细胞的主要功能是分泌细胞因子,具有诱导和增强免疫应答的作用,CD8⁺T淋巴细胞主要介导细胞毒杀伤作用。CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞是机体免疫调节的枢纽,在正常值范围内当CD4⁺/CD8⁺值高时,表明机体处于高的免疫状态,当CD4⁺/CD8⁺的比例失调或缺陷时,可导致各种免疫疾病发生^[4]。

研究证明,植物多糖能够促进T淋巴细胞的增殖,尤其是对于维持CD4⁺/CD8⁺值的正常范围具有重要作用^[5-7]。另外,这些研究主要是通过流式细胞术对血液中的淋巴细胞亚群数量变化进行检测,而目前关于ASPS对鸡T淋巴细胞亚群定位分布的影响还未见报道。因此本研究利用免疫组织

化学方法检测ASPS对鸡脾脏中CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞定位分布的影响,从组织学角度观察ASPS对脾脏的免疫调节作用,为进一步探讨ASPS的免疫功能调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 200只1日龄海兰褐公雏,购自长春市农业科学研究院种鸡场。

1.2 主要试剂及仪器 刺五加多糖由本实验提取和纯化,多糖纯度为81%^[8];冰冻切片用OCT组织包埋液:美国Sakura公司产品;小鼠抗鸡CD4、CD8单克隆抗体:美国Southern Biotechnology公司产品;Ultra Sensitive SP超敏试剂盒kit 9901:福州迈新公司产品。

Leica CM1850冰冻切片机:德国Leica公司生产;Olympus CX41显微镜:日本Olympus公司生产;Pixera pro150ES图像采集器:美国Pixera公司生产。

1.3 动物分组与处理 1日龄海兰褐公雏饲养至7日龄时选取150只,随机分为3组,每组50只。第1组和第2组为ASPS低剂量组和高剂量组,分别用ASPS_L和ASPS_H表示,两组分别皮下注射100 mg/mL和200 mg/mL的ASPS;第3组为空白对照组,注射等量灭菌生理盐水。所有组每

天注射 1 次, ASPS 和生理盐水均为 0.2 mL, 连续注射 3 d。

每一组分别在最后一次注射 ASPS 后的第 7、14、21 和 28 天取材, 每组分别随机选取 10 只雏鸡, 快速取其脾脏。将脾脏制成冰冻切片, 片厚 5 μm , $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 以进行免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学染色程序 每组每只鸡随机选取 5 张切片, 每张切片依次滴加 30 mL/L 过氧化氢(室温下孵育 10 min)、小鼠抗鸡 CD4(1:200)或 CD8(1:200)单克隆抗体工作液($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h)、聚合物增强剂(室温下孵育 20 min)和酶标抗鼠/兔聚合物(室温下孵育 30 min); 每一种试剂孵育后, 均用 PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 最后 DAB 显色; 苏木精复染; 自来水冲洗返蓝; 梯度酒精脱水; 二甲苯透明; 中性树脂封片; 照相。

1.5 图像分析及统计学处理 应用 Image-pro plus6.0 图像分析软件测定脾脏中单位视野内阳性细胞面积。每张切片测 3 个视野, 取平均值。应用 SPSS18.0 软件对各组阳性细胞进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 CD4^+ T 淋巴细胞定位分布的变化情况

图 1 - A, B, C, D 显示, 空白对照组随着日龄增长, 脾脏中 CD4^+ T 淋巴细胞的数量逐渐增加, 除免疫后 7 d 明显低于其他日龄外, 其他各日龄之间差异不明显, 各日龄 CD4^+ T 淋巴细胞主要分布在动脉周围淋巴鞘中, 其他部位以散在形式存在。

免疫后 7 d 和 14 d 时 ASPS_L 组和 ASPS_H 组 CD4^+ T 淋巴细胞的数量均有所增加, 但与空白对照组比较差异并不显著($P > 0.05$), 而免疫后 21 d 和 28 d 时显著增加($P < 0.05$)(图 2)。从免疫后 14 d 开始, 主要由 CD4^+ T 淋巴细胞构成的动脉周围淋巴鞘面积较空白对照组明显增加, 尤其是免疫后 21 d 和 28 d 时, 单个动脉周围淋巴鞘面积大概是同日龄对照组的 3 倍左右(图 1 - G, H), 但是此阶段红髓中 CD4^+ T 淋巴细胞较同日龄对照组和同

组之前日龄明显减少(图 1 - G, H)。

2.2 CD8^+ T 淋巴细胞定位分布的变化情况

图 1 - I, J, K, L 显示, 各组各日龄 CD8^+ T 淋巴细胞都主要分布在红髓和白髓中, 动脉周围淋巴鞘中较少, 没有较大面积的由 CD8^+ T 淋巴细胞构成的动脉周围淋巴鞘出现, 空白对照组阳性细胞的数量免疫后 7 d 和 14 d 变化较小, 但是免疫后 21 d 时明显增加。

与对照组比较, 除了免疫后 28 d ASPS_H 组 CD8^+ T 淋巴细胞数量显著增加外($P < 0.05$), 其他各日龄 ASPS_L 组和 ASPS_H 组 CD8^+ T 淋巴细胞虽有所增加, 但是差异均不显著($P > 0.05$)(图 2), 而且 CD8^+ T 淋巴细胞的定位分布与同日龄对照组比较也无大的变化, 阳性细胞都主要分布在红髓和白髓中, 而动脉周围淋巴鞘中阳性细胞较少(图 1 - M, N, O, P)。

2.3 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞比值的变化情况

表 1 显示, 免疫后 7 d 和 14 d 时, ASPS_L 组和 ASPS_H 组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞比值与空白对照组比较差异不显著($P > 0.05$)。免疫后 21 d 和 28 d 时, ASPS_L 组和 ASPS_H 组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞比值为 1.1 左右, 均显著高于空白对照组($P < 0.05$), 但两个 ASPS 组之间比较差异并不显著($P > 0.05$)。

表 1 各组鸡 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞亚群比值的动态变化

组别	免疫后天数/d			
	7	14	21	28
空白对照	0.83 \pm 0.09a	0.98 \pm 0.11a	0.82 \pm 0.07b	0.84 \pm 0.08b
ASPS_L	0.87 \pm 0.09a	1.01 \pm 0.13a	1.08 \pm 0.15a	1.11 \pm 0.16a
ASPS_H	0.85 \pm 0.11a	1.02 \pm 0.08a	1.09 \pm 0.14a	1.09 \pm 0.15a

注: 同一列内比较, 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)

Note: The data with different little letters in the same column show significant difference ($P < 0.05$), The data with same little letters show not significant difference ($P > 0.05$).

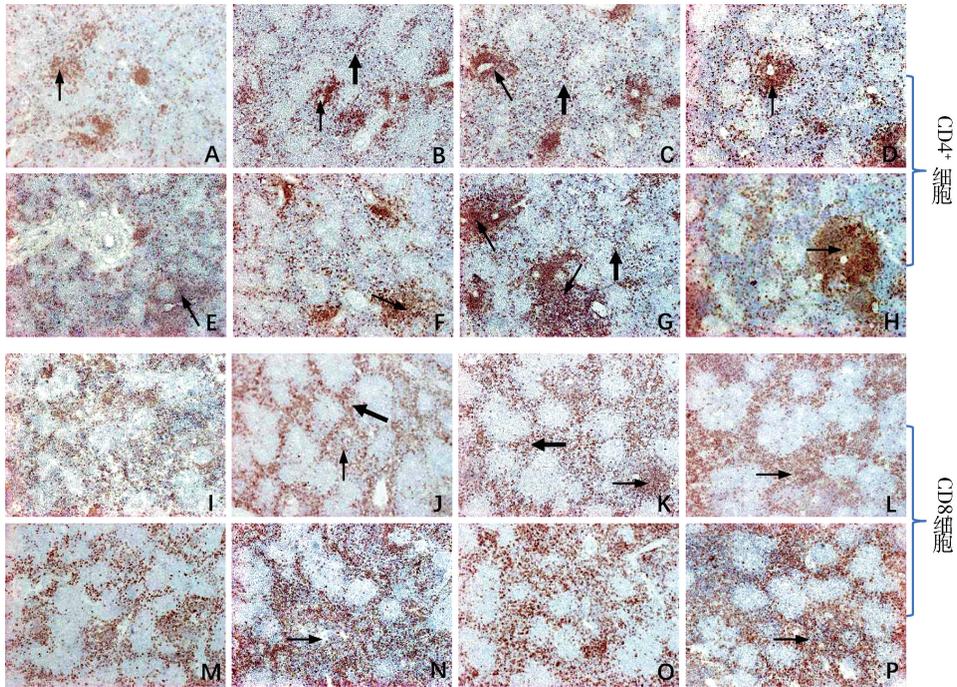


图 A - D 分别显示免疫后 7、14、21 和 28 d 空白对照组 CD4⁺ T 淋巴细胞分布;图 E - H 分别显示免疫后 7、14、21 和 28 d ASPSH 组 CD4⁺ T 淋巴细胞分布;图 I - L 分别显示免疫后 7、14、21 和 28 d 空白对照组 CD8⁺ T 淋巴细胞分布;

图 M - P 分别显示免疫后 7、14、21 和 28 天 ASPSH 组 CD8⁺ T 淋巴细胞分布

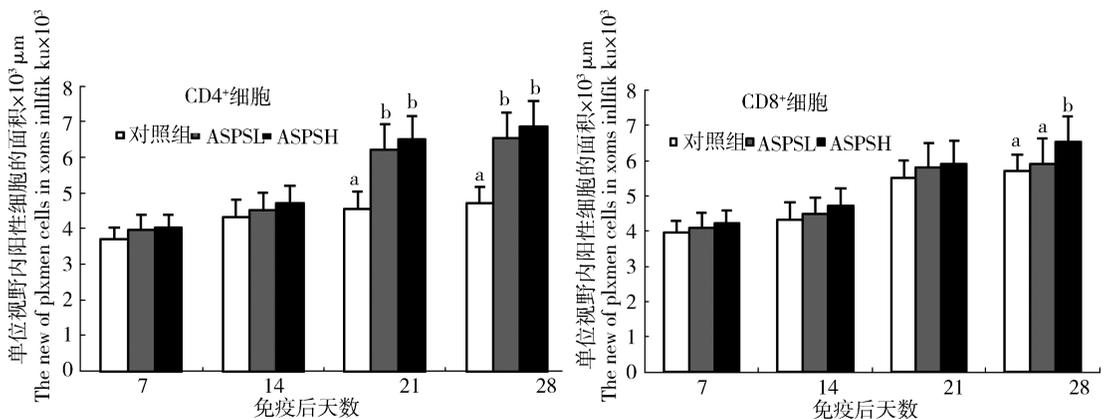
注:图中细箭头所示为动脉周围淋巴鞘,粗箭头所示为红髓中阳性细胞

A - D are respectively the distribution of CD4⁺ cells in control group of 7, 14, 21 and 28 days after immunization; E - H are respectively the distribution of CD4⁺ cells in ASPSH group of 7, 14, 21 and 28 days after immunization; I - L are respectively the distribution of CD8⁺ cells in control group of 7, 14, 21 and 28 days after immunization; M - P are respectively the distribution of CD8⁺ cells in ASPSH group of 7, 14, 21 and

28 days after immunization Note: The thin arrows indicate PALS, while the thick arrows indicate positive cells in the red pulp

图 1 ASPS 对脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞定位分布的影响 (250 ×)

Fig 1 The effect of ASPS on distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in spleen (250 ×)



注:同一日龄肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 肩标相同字母或无字母标注表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Different letters of shoulder label indicated significant difference ($P < 0.05$), while the same letter of shoulder label indicated no significant difference ($P > 0.05$).

图 2 ASPS 对脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞数量的影响

Fig 2 The effect of ASPS on quantity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in spleen

3 讨论与结论

T、B 淋巴细胞是构成机体免疫系统的主要细胞群体,分别调节机体的细胞和体液免疫应答,是适应性免疫系统的主要效应细胞。多糖能调节 T、B 细胞周期,刺激其分裂增殖,并促进相关细胞因子和抗体的分泌^[8]。ASPS 可激活 NK(自然杀伤)细胞和巨噬细胞,并对 T、B 细胞产生重要作用,从而增强机体的免疫功能^[9]。Lee 等^[10]还发现,刺五加多糖能够与 TLR4 受体以及 CD14 结合,进一步激活 NF- κ B 信号通路,促进 IL-1 β , IL-6, IL-10 和 TNF- α 的产生。Han 等人^[11]发现,ASPS 能够与 TLR2 或 TLR4 相互作用,能够激活小鼠的免疫细胞如巨噬细胞和 B 细胞,并且进一步活化核转录因子 NF- κ B、MAPK,然后调节免疫细胞产生各种细胞因子如 TNF- α , IL-6, iNOS 等,从而进一步调节免疫反应。目前多糖对 T 淋巴细胞免疫功能的调节主要通过检测淋巴细胞增殖能力以及相关细胞因子等方法进行的,另外对 T 淋巴细胞亚群的观察主要是利用流式细胞术对数量进行检测,但是关于多糖对 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞在免疫器官及组织中的精确定位变化还未见报道,这对于进一步揭示多糖的免疫调节机制具有重要意义。

脾脏作为鸡体内的最大的外周免疫器官对 T 依赖性抗原产生体液免疫应答是通过动脉周围淋巴鞘和髓窦周围淋巴鞘之间的相互作用诱导产生的^[12]。本文前期研究证明 ASPS 能够明显促进由 CD3⁺T 淋巴细胞构成的动脉周围淋巴鞘和由 Bu-1⁺B 淋巴细胞过程的髓窦周围淋巴鞘的发育^[8]。本研究发现 CD4⁺T 淋巴细胞是构成动脉周围淋巴鞘的主要 T 淋巴细胞亚群,与对照组比较,ASPS_L 组和 ASPS_H 组位于红髓和白髓中散在的 CD4⁺T 淋巴细胞减少,而动脉周围淋巴鞘中 CD4⁺T 淋巴细胞的数量显著增多,从而使动脉周围淋巴鞘的面积明显增加。这说明在 ASPS 作用下,CD4⁺T 淋巴细胞在脾脏中发生迁移,主要募集到动脉周围淋巴鞘周围,并进一步增殖,具体原因和机理还需要以后进一步研究。由于 CD4⁺细胞可以产生各种细胞因子,参与或协助细胞和体液免疫反应,

ASPS 能够促进脾脏中 CD4⁺细胞的数量增加,另外影响其在脾脏的定位分布,都是增强免疫的表现。

研究同时发现,ASPS 对脾脏中 CD8⁺T 淋巴细胞的数量以及定位分布影响较小,与对照组比较无明显变化。另外,免疫后 21 和 28 天时,与空白对照组比较,ASPS 能够显著提高 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值($P < 0.05$)。因此在 ASPS 作用下,脾脏中 CD4⁺T 淋巴细胞增多以及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值升高,证明脾脏免疫功能得到进一步提高。这也与其他学者利用流式细胞术对 T 淋巴细胞亚群检测的结果基本一致:邱妍等^[13]的试验发现,合适剂量的黄芪、板蓝根、牛膝和山药等 4 种多糖均可以促进鸡 CD4⁺T 淋巴细胞增殖,从而增强细胞免疫。此外,鸡 CD4⁺T 淋巴细胞还具有辅助 B 淋巴细胞产生抗体的作用,从而提高体液免疫。王宏军等^[14]试验发现贵州南五味子多糖明显促进正常鸡体内 T 淋巴细胞增殖,CD4⁺细胞百分比升高,CD8⁺细胞百分比下降,CD4⁺/CD8⁺细胞比值升高。Zhao 等^[15]研究发现川明参多糖能够提高环磷酰胺致免疫抑制小鼠的 CD4⁺/CD8⁺细胞比值,使其比值恢复至正常水平。因此,中药多糖对于改善和维持 T 淋巴细胞亚群的正常范围具有重要作用。

ASPS 虽然对脾脏中 CD8⁺T 淋巴细胞的数量和分布无明显影响,但对 CD4⁺T 淋巴细胞的定位分布影响较大,能够促进红髓中 CD4⁺T 淋巴细胞向动脉周围淋巴鞘迁移,使动脉周围淋巴鞘面积增加,这从组织学角度证明 ASPS 能够通过影响 CD4⁺T 淋巴细胞的定位分布发挥免疫调节作用。

参考文献:

- [1] 张英楠,刘洪章,刘树英,等. 中药多糖对鸡的免疫增强作用研究进展[J]. 中国家禽, 2014, 36(3):40-42.
Zhang Y N, Liu H Z, Liu S Y, et al. Research progress of immune enhancement effect of Polysaccharide from Traditional Chinese medicine on chicken [J]. China Poultry, 2014, 36(3): 40-42.
- [2] Meng Q, Pan J, Liu Y, et al. Anti-tumour effects of polysaccharide extracted from Acanthopanax senticosus and cell-media-

- ted immunity [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 15(2): 1694 - 1701.
- [3] 邱妍. 四种中药多糖增强免疫和抗病毒作用及机理研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2007.
- Qiu Y. Studies on immune-enhancing and antiviral action and mechanism of four Chinese herbal polysaccharides [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [4] Husnain M, Mackrides N, Vega F, *et al.* CD4⁺/CD8⁺ immunophenotype switching as a marker for intraocular and CNS involvement in mycosis fungoides [J]. *Leukemia and Lymphoma*, 2018, 60(5): 1 - 4.
- [5] Fan Y, Ma X, Zhang J, *et al.* Ophiopogon polysaccharide liposome can enhance the non-specific and specific immune response in chickens [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 119: 219 - 227.
- [6] Li B, Wei K, Yang S, *et al.* Immunomodulatory effects of Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharide and propolis on immunosuppressed chickens [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 78: 7 - 13.
- [7] Fan W, Zheng P, Wang Y, *et al.* Analysis of immunostimulatory activity of polysaccharide extracted from Yu-Ping-Feng in vitro and in vivo [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 93: 146 - 155.
- [8] 张英楠, 杨树宝, 单春兰, 等. 刺五加多糖对雏鸡脾脏中 T、B 淋巴细胞定位分布的影响 [J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(4): 35 - 40.
- Zhang Y N, Yang S B, Shan C L, *et al.* Effects of Acanthopanax senticosus polysaccharide on distribution of T and B lymphocytes in chicken spleen [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(4): 35 - 40.
- [9] 刘树民, 张娜. 刺五加多糖的现代研究进展 [J]. *中医药信息*, 2014(2): 116 - 119.
- Liu S M, Zhang N. Modern research progress of Acanthopanax Senticosus polysaccharide [J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2014(2): 116 - 119.
- [10] 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*, 2003, 3(9): 1301 - 1312.
- [11] Lee J B, Tanikawa T, Hayashi K, *et al.* Characterization and biological effects of two polysaccharides isolated from *Acanthopanax sciadophylloides* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 116: 159 - 166.
- [12] Jeurissen S H. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response [J]. *Immunology*, 1993, 80(1): 29 - 33.
- [13] 邱妍, 崔保安, 胡元亮, 等. 4 种多糖对免疫雏鸡抗体效价和 T 淋巴细胞的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(1): 77 - 81.
- Qiu Y, Cui B A, Hu Y L, *et al.* Effects of polysaccharides on antibody titer and T lymphocyte in vaccinated chicken [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2008, 31(1): 77 - 81.
- [14] 王宏军, 蒋红, 邓旭明. 贵州南五味子多糖对鸡细胞免疫和体液免疫的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(6): 884 - 886.
- Wang H J, Jiang H, Deng X M. Effects of Guizhou Kadsura polysaccharide (GKP) on cellular and humoral immunity of chicken [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(6): 884 - 886.
- [15] Zhao X, Zhang Y, Song X, *et al.* Effect of Chuanminshen violaceum polysaccharides and its sulfated derivatives on immunosuppression induced by cyclophosphamide in mice [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 2015, 8(1): 558 - 68.

(编辑:陈希)