

胸腺素 α_1 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞分泌功能及基因表达的影响

陈黎龙, 束刚, 朱晓彤, 高萍, 江青艳, 傅伟龙

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用 MTT 比色法、RIA 法和相对半定量 RT-PCR 法分别研究了不同浓度的人工合成胸腺素 α_1 ($T\alpha_1$) 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞增殖转化、白细胞介素 2 (IL-2) 和白细胞介素 6 (IL-6) 分泌及基因表达的影响。结果表明, 采用 1 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $T\alpha_1$ 处理细胞 36 h, 能显著增加由 ConA 诱导 24 h 的脾脏淋巴细胞的增殖转化率, 显著提高细胞培养上清液中 IL-2 的含量 ($P < 0.05$), 而对 IL-6 的分泌无显著影响 ($P > 0.05$); 同时发现, 在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $T\alpha_1$ 处理淋巴细胞 36 h 后用 ConA 诱导 12 h, 对淋巴细胞 IL-2 和 IL-6 基因的表达无显著影响 ($P > 0.05$)。提示 $T\alpha_1$ 可通过促进 IL-2 的分泌, 进而促进脾脏淋巴细胞增殖转化, 而且其可能主要在基因转录后翻译水平上对 IL-2 分泌发挥影响。

关键词: 胸腺素 α_1 ; 淋巴细胞; 白细胞介素; 鸡

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 04-0082-04

Effects of thymosin α_1 on the secretory functions and gene expression of chicken splenic lymphocytes *in vitro*

CHEN Li-long, SHU Gang, ZHU Xiao-tong, GAO Ping, JIANG Qing-yan, FU Wei-long

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Effects of thymosin α_1 on the proliferation and transformation, secretion and gene expression of interleukin 2 and 6 (IL-2 and IL-6) in chicken splenic lymphocytes *in vitro* were studied by the methods of MTT colorimetry, RIA and relative semi-quantitative RT-PCR respectively. The results showed that the proliferation and transformation rate and IL-2 concentration of chicken splenic lymphocytes in 1 or $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ thymosin α_1 group were significantly higher than those of control group when treated by thymosin α_1 for 36 h and then stimulated by ConA for 24 h ($P < 0.05$). There was no significant difference in the concentration of IL-6 when compared with control group ($P > 0.05$). The results also showed, however, that when chicken splenic lymphocytes were treated by $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ thymosin α_1 for 36 h and then $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ConA for 12 h *in vitro*, the transcriptional expression level of IL-2 or IL-6 gene was not significantly different from that of control group ($P > 0.05$). Taken together, it indicates that thymosin α_1 can promote IL-2 secretion, which acts mainly on the translational level, and further to stimulate the proliferation and transformation of chicken splenic lymphocytes *in vitro*.

Key words: thymosin α_1 ; splenic lymphocyte; interleukin; chicken

胸腺素 α_1 (thymosin α_1 , $T\alpha_1$) 最早由 Goldstein 等^[1]于 1977 年从牛胸腺素组分 5 (thymosin fraction 5, TF5) 中分离纯化得到, 是由 28 个氨基酸组成的热稳定酸性多肽, 等电点为 4.2, 相对分子质量为 3108。 $T\alpha_1$ 是免疫系统的重要生物反应调节因子, 能促使 T 细胞的分化及成熟, 提高 T 细胞前体的比率, 使 IL-2

的生成及高亲和力受体表达增加, 提高 Th 细胞的功能, 使机体有效地发挥免疫防护功能。在人医中 $T\alpha_1$ 已广泛作为免疫增强剂用于临床治疗多种免疫缺陷病、自身免疫病、肿瘤及病毒等微生物感染^[2,3]。在畜牧业领域, 也有使用胸腺提取液提高动物免疫能力的报道^[4,5], 但胸腺提取液因成分复杂, 难以解释

其作用机理. 有关纯品 $T\alpha_1$ 在畜牧业中的研究不多. 本试验采用不同剂量的人工合成 $T\alpha_1$ 处理离体培养的鸡脾脏淋巴细胞, 研究 $T\alpha_1$ 对鸡脾脏淋巴细胞增殖转化、IL-2 和 IL-6 分泌及其基因表达的影响, 旨在为 $T\alpha_1$ 在动物生产中作为新型生物活性肽类免疫增强剂的应用提供试验基础和理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验动物

8 周龄健康黄羽肉鸡选自华南农业大学实验鸡场.

1.2 主要试剂

$T\alpha_1$ 由上海生物化学研究所合成, RPMI-1640 培养液为 GIBCO 公司产品, 淋巴细胞分层液为上海恒信化学试剂有限公司产品, MTT 为上海伯奥生物科技有限公司产品, IL-2 和 IL-6 放射免疫测定试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, 总 RNA 抽提试剂 TRIZOL[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司, AMV RTase 购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海生工公司.

1.3 脾脏淋巴细胞分离和培养方法

鸡放血处死, 无菌条件下取脾脏, 超净台内去膜、清洗、剪碎, 置于 100 目细胞筛上用注射器推塞轻轻挤压, 将淋巴细胞挤压通过细胞筛, 用 Hank's 液稀释后采用淋巴细胞分层液分离淋巴细胞. 经 Hank's 液清洗 3 次, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬细胞, 台盼兰检活, 计数, 稀释成 5×10^6 /mL 淋巴细胞悬液, 于 37 °C、体积分数为 5% CO_2 及饱和湿度条件下培养.

1.4 $T\alpha_1$ 对脾脏淋巴细胞增殖转化的影响

将细胞悬液接种于 96 孔板上, 设 1 个对照组和 3 个处理组, 每组 12 个重复. 对照组细胞用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液培养, 处理组分别用含有 1、10 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $T\alpha_1$ 的完全培养液培养处理细胞, 培养 36 h 后, 再用含 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA 的完全培养液培养 24 h, 用 MTT 比色法^[6] 测定淋巴细胞的增殖转化能力.

1.5 $T\alpha_1$ 对脾脏淋巴细胞 IL-2 和 IL-6 分泌的影响

将细胞悬液接种于 24 孔板上, 设 1 个对照组和 3 个处理组, 每组 6 个重复. 具体处理方法同 1.4. 最后收集细胞培养上清液于 3 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, -20 °C 保存, 用 RIA 法测定上清液中 IL-2 和 IL-6 的含量.

1.6 $T\alpha_1$ 对脾脏淋巴细胞 IL-2 和 IL-6 基因表达的影响

1.6.1 淋巴细胞总 RNA 抽提 将细胞悬液接种于 6 孔板上, 设 1 个对照组和 1 个处理组, 每组 6 个重复. 对照组细胞用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-

1640 完全培养液培养, 处理组用含 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $T\alpha_1$ 的完全培养液处理细胞, 培养 36 h 后, 再用含 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA 的完全培养液培养 12 h, 离心沉淀收集淋巴细胞, 采用 TRIZOL 一步法抽提总 RNA. 总 RNA 样品用紫外分光光度计测 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 和浓度, 另取适量总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测其完整性.

1.6.2 IL-2 和 IL-6 基因表达的测定 将抽提的总 RNA 立即进行反转录, 从各份样本中各取适量混合后用于 PCR 条件优化. 在确定 PCR 扩增的最佳引物比例和循环圈数后, 以 β -actin 作为内标, 用相对半定量 RT-PCR 法测定淋巴细胞中 IL-2 和 IL-6 的基因表达量. PCR 扩增产物经凝胶成像系统 (Ultra-violet Products 公司) 分析条带灰度, 用目的基因与 β -actin 的灰度比值来表示基因表达的丰度. 引物序列见表 1.

表 1 IL-2、IL-6 和 β -actin 引物序列参数

Tab. 1 Parameters of oligo nucleotide primer pairs for IL-2, IL-6 and β -actin

基因 genes	引物位置 primer positions	引物序列 sequence of the primers	PCR 产物大小 size of PCR products/bp
IL-2 (AF000631)	189 ~ 208	F: 5'-CCAAGTACAGACCCAGGAGTG-3'	448
	617 ~ 636	R: 5'-GCCCGTAGGTTACAGAAAGG-3'	
IL-6 (AJ250838)	397 ~ 415	F: 5'-CGAGGAGAAATGCCTGAG-3'	366
	743 ~ 762	R: 5'-GGATGTGCGCCGAACTAAA-3'	
β -actin (X00182)	331 ~ 348	F: 5'-AACCCCAAAAGCCAAACAGA-3'	183
	494 ~ 513	R: 5'-GAGGCGGTAGCCCTCATAGA-3'	

1.7 数据统计处理

所得数据采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析并进行 Duncan 多重比较和独立样本 t 检验.

2 结果

2.1 不同浓度 $T\alpha_1$ 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞增殖转化和分泌功能的影响

从表 2 可看出, 用 1 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $T\alpha_1$ 处理细胞, 可以显著地提高由 ConA 诱导的脾脏淋巴细胞增殖转化率 ($P < 0.05$), 显著促进淋巴细胞对 IL-2 的分泌 ($P < 0.05$); 各处理组对 IL-6 的分泌无显著促进作用 ($P > 0.05$). 但用 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $T\alpha_1$ 处理细胞, 则显著降低脾脏淋巴细胞的增殖转化率 ($P < 0.05$), 但对分泌功能无显著影响 ($P > 0.05$).

2.2 $T\alpha_1$ 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞 IL-2 和 IL-6 基因表达的影响

用 RT-PCR 方法分别扩增得到 IL-2、IL-6 和 β -actin 基因片段, PCR 产物经 0.02 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后用凝胶成像系统分析. 从图 1 a 和 1 b 可看出, 目标条带大小与 IL-2、IL-6 和 β -actin 基因

预先设计的结果相符,而双阴性对照未见有任何条带。表3结果表明,用 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 $\text{T}\alpha_1$ 处理淋巴细

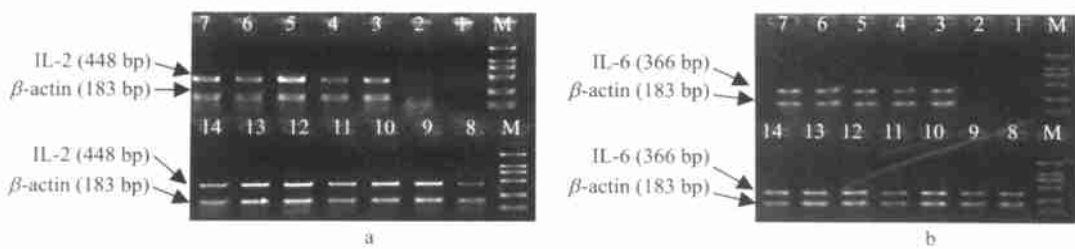
胞,对淋巴细胞的IL-2和IL-6基因转录水平有升高趋势,但与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。

表2 不同浓度 $\text{T}\alpha_1$ 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞增殖转化和分泌功能的影响¹⁾

Tab. 2 Effect of $\text{T}\alpha_1$ on the proliferation and transformation and secretory functions of chicken splenic lymphocytes stimulated by ConA *in vitro* ($\bar{x}\pm\text{SE}$)

组别 groups	脾脏淋巴细胞增殖转化 the proliferation and transformation of splenic lymphocytes ($D_{570\text{nm}}$ $n=12$)	$\rho(\text{IL-2})/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ ($n=6$)	$\rho(\text{IL-6})/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$ ($n=6$)
对照组 control group	0.746 \pm 0.006 b	2.12 \pm 0.26 a	57.62 \pm 7.43 a
$1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$	0.770 \pm 0.007 c	2.97 \pm 0.14 bc	58.70 \pm 12.31 a
$10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$	0.786 \pm 0.010 c	3.43 \pm 0.42 c	64.85 \pm 16.66 a
$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$	0.703 \pm 0.008 a	2.33 \pm 0.20 ab	52.37 \pm 10.97 a

1) 同列数据后有相同字母者为差异不显著($P>0.05$),不同字母者为差异显著($P<0.05$, DMRT法)



M: DL2000 marker; 1: 以 ddH_2O 为模板的阴性对照; 2: 以无反转录酶的RT产物为模板的阴性对照; 3~8: 分别为对照组的基因和 β -actin单管扩增; 9~14: 分别为处理组目的基因和 β -actin单管扩增

1: Negative control using ddH_2O as template; 2: Negative control using RT product without RTase as template; 3~8: PCR products of control group; 9~14: PCR products of $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$ treated group

图1 相对半定量RT-PCR法对IL-2基因(a)和IL-6基因(b)表达检测电泳图

Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR products of IL-2 gene (a) and IL-6 gene (b) with β -actin gene

表3 $\text{T}\alpha_1$ 对离体培养的鸡脾脏淋巴细胞的IL-2和IL-6基因表达的影响¹⁾

Tab. 3 Effects of $\text{T}\alpha_1$ on the transcriptional expression of IL-2 and IL-6 gene of chicken splenic lymphocytes stimulated by ConA *in vitro* ($\bar{x}\pm\text{SE}$)

组别 groups	IL-2与 β -actin的 灰度比值 IL-2/ β - actin ($n=6$)	IL-6与 β -actin的 灰度比值 IL-6/ β - actin ($n=6$)
对照组 control group	0.870 \pm 0.066 a	0.911 \pm 0.030 a
$10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$	1.003 \pm 0.053 a	1.010 \pm 0.049 a

1) 同列数据后有相同字母者为差异不显著($P>0.05$, t 检验)

3 讨论

1966年Goldstein等^[7]首次报道从新生小牛胸腺中提取出具有生物活性的激素物质,并命名为胸腺素(thymosin),1975年又通过改进提取方法,将胸腺素进一步分离出8个组分(TF1~8),其中TF5活性最强,是由一组相对分子质量为1000~15000的10~15个组分组成的肽类物质,并于1977年从TF5中提取出 $\text{T}\alpha_1$ ^[11]。1985年Rinaldi等^[8]利用抗 $\text{T}\alpha_1$ 特异性抗体和间接免疫荧光法检测表明,未成熟淋巴细胞

表面存在 $\text{T}\alpha_1$ 特异性受体, $\text{T}\alpha_1$ 与细胞膜受体结合后能刺激T细胞前体分化和表达表面标志。Corden等^[9]于1994年利用 ^{125}I 标记的胸腺素 α 原研究发现人外周血单核细胞(PBMC)细胞膜表面存在有胸腺素 α 原的高亲和力和低亲和力2种受体。2004年Romani等^[10]最新研究表明, $\text{T}\alpha_1$ 和Toll样受体结合并通过P38丝裂原活化蛋白激酶/核因子 $\text{K}\alpha\text{B}$ 依赖性通路促进树突状细胞(dendritic cells)功能的完善和IL-12的分泌。随着人工化学合成以及近年来利用基因工程手段生产 $\text{T}\alpha_1$ 取得成功,国内外学者对 $\text{T}\alpha_1$ 的生物学功能及应用开展了广泛深入研究。研究表明,利用固相多肽合成方法合成的 $\text{T}\alpha_1$ 能提高淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应,而且以 $\text{T}\alpha_1$ 与淋巴细胞先保温一定时间,再加入ConA刺激产生的促增殖效应最佳^[11]。石继红等^[12]利用基因工程手段获得重组胸腺素 α_1 ,利用 ^3H -TdR进行生物活性测定表明,在致有丝分裂原ConA存在的条件下,融合蛋白和 $\text{T}\alpha_1$ 单体(1.56~12.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)均具有刺激小鼠脾淋巴细胞分裂增殖的能力,与化学合成的 $\text{T}\alpha_1$ (1.95~15.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)具有相似的生物活性。Paul等^[13]采用1~100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1} \text{T}\alpha_1$ 处理体外培养的小鼠骨髓细胞,增

强其增殖反应,促进骨髓细胞集落形成能力;每只小鼠腹腔注射 $10 \mu\text{g}$ $\text{T}\alpha_1$,不论对正常或者患淋巴瘤小鼠都能显著增强其骨髓细胞增殖和集落形成能力.本试验的结果表明,用 1 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{T}\alpha_1$ 处理细胞,可以显著地提高由 ConA 诱导的鸡脾脏淋巴细胞增殖转化率 ($P < 0.05$),表明 $\text{T}\alpha_1$ 在鸟类表现出与哺乳类相似的生物学功能.脾脏淋巴细胞增殖转化能力是直接反映机体细胞免疫功能的指标,其主要表现为 T 淋巴细胞被活化后增生分化为免疫活性细胞,从而增强机体的免疫应答能力.

IL-2 是由 T 淋巴细胞分泌的一种淋巴因子,主要作用是诱导 T 淋巴细胞增殖和分化,对 NK 细胞、单核巨噬细胞增殖分化也有促进作用,其分泌水平高低可以反映机体的免疫机能,特别是细胞免疫水平. IL-6 又称 B 细胞刺激因子,能促进 B 细胞增殖分化,是诱导 B 细胞分泌抗体的必需因子之一,也与 T 细胞的活化、增殖和分化有关,其分泌水平主要反映机体的体液免疫水平^[14]. Serrate 等^[15] 研究表明 TF5 和 $\text{T}\alpha_1$ 能增加离体培养的人体大颗粒淋巴细胞 (IGL) 丝裂原诱导的 IL-2 分泌、IL-2 受体表达以及 γ -干扰素的分泌,从而调节 NK 细胞活性. Szein 等^[16] 将 $\text{T}\alpha_1$ 和人单核细胞先预孵育 30 min,清洗后用 PHA 诱导,能极大地增加 IL-2 分泌和 IL-2 受体表达,若将 $\text{T}\alpha_1$ 和 PHA 同时添加处理并未见有协同增强效应. Leichtling 等^[17] 也研究发现 $\text{T}\alpha_1$ 能促进正常人体淋巴细胞 IL-2 高亲和力受体的表达.启动淋巴细胞增殖反应的重要环节是其表面 IL-2 受体的表达增加,TF5 和 $\text{T}\alpha_1$ 都能增加淋巴细胞在丝裂原诱导下的 IL-2 和 IL-2 受体表达,提示 $\text{T}\alpha_1$ 的促增殖效应可能部分是通过 IL-2 来介导的.本试验结果显示,用 1 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{T}\alpha_1$ 处理细胞,可显著促进淋巴细胞对 IL-2 的分泌 ($P < 0.05$),而用 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{T}\alpha_1$ 处理虽然显著抑制了脾脏淋巴细胞增殖转化 ($P < 0.05$),但对 IL-2 的分泌仍有增加趋势,说明 $\text{T}\alpha_1$ 增加 IL-2 分泌水平的效应并非是因为促进了细胞增殖导致,相反可能是 $\text{T}\alpha_1$ 通过促进脾脏淋巴细胞 IL-2 分泌进而促进其增殖转化,这与以上的提示是相符的,且与 IL-2 作为 T 细胞生长因子所具有的功能也是一致的.相对半定量 RT-PCR 法研究的结果表明,用含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 $\text{T}\alpha_1$ 处理淋巴细胞,对淋巴细胞的 IL-2 和 IL-6 基因转录水平有升高趋势,但与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$),提示 $\text{T}\alpha_1$ 可能主要在基因转录后翻译水平上对 IL-2 分泌发挥影响.

参考文献:

[1] GOLDSTEIN A L, LOW T L, MCADOO M, et al. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide [J]. Proc Natl Acad Sci USA,

1977, 74(2): 725-729.

- [2] 刘玉英. 胸腺素 α_1 的研究进展[J]. 上海医药, 2003, 24(5): 211-213.
- [3] ANCELL C D, PHIPPS J, YONG L. Thymosin alpha 1 [J]. Am J Health Syst Pharm, 2001, 58(10): 879-885.
- [4] PRIDYBAILO N D. Thymus extract enhances vaccination effectiveness [J]. Poultry Int, 1991, 7: 30-34.
- [5] 傅伟龙, 余斌. 胸腺因子 D 对鸡生长、免疫功能及血液中某些激素水平的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2): 68-71.
- [6] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1 221-1 222.
- [7] GOLDSTEIN A L, SLATER F D, WHITE A. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(3): 1 010-1 017.
- [8] RINALDI G C, TORRISI M R, JEZZI T, et al. Receptors for thymosin alpha 1 on mouse thymocytes [J]. Cell Immunol, 1985, 91(1): 289-293.
- [9] CORDERO O J, SARANDESES C, NOGUEIRA M. Prothymosin alpha receptors on peripheral blood mononuclear cells [J]. FEBS Lett, 1994, 341(1): 23-27.
- [10] ROMANI L, BISTONI F, GAZIANO R, et al. Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signaling [J]. Blood, 2004, 103(11): 4 232-4 239.
- [11] 俞超, 邱秀娣, 周国明, 等. 合成胸腺素 α_1 的生物活性研究 [J]. 药物生物技术, 1998, 5(2): 103-108.
- [12] 石继红, 张英起, 赵宁, 等. 重组胸腺素 α_1 的分离纯化和活性测定 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(5): 395-398.
- [13] PAUL S, SODHI A. Modulatory role of thymosin-alpha 1 in normal bone-marrow haematopoiesis and its effect on myelosuppression in T-cell lymphoma bearing mice [J]. Immunol Lett, 2002, 82(3): 171-182.
- [14] 孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 387-403, 443-453.
- [15] SERRATE S A, SCHULOF R S, LEONDA RIDIS L, et al. Modulation of human natural killer cell cytotoxic activity, lymphokine production and interleukin 2 receptor expression by thymic hormones [J]. J Immunol, 1987, 139(7): 2 338-2 343.
- [16] SZTEIN M B, SERRATE S A. Characterization of the immunoregulatory properties of thymosin α_1 on interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in normal human lymphocytes [J]. Int J Immunopharmacol, 1989, 11(7): 789-800.
- [17] LEICHTLING K D, SERRATE S A, SIZEIN M B. Thymosin alpha 1 modulates the expression of high affinity interleukin-2 receptors on normal human lymphocytes [J]. Int J Immunopharmacol, 1990, 12(1): 19-29.