

## 复方连翘对 Th 细胞分化信号蛋白钙调神经磷酸酶转录表达的影响

高海<sup>1,2</sup>, 李秀岚<sup>3</sup>, 曾振灵<sup>1</sup>, 陈建新<sup>1</sup>, 陈杖榴<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华南农业大学兽医学院, 广州 510642; <sup>2</sup>山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801; <sup>3</sup>青岛农业大学化学与药学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 【目的】观察中药复方连翘对 T 淋巴细胞活化信号蛋白 CaN 转录表达变化, 探讨其免疫调控机制。【方法】用含药血清培养鸡脾 T 淋巴细胞并以 OVA 和 ConA 体外干预诱导; 利用半定量 RT-PCR 和 Western-blotting 技术检测 CaN mRNA 及其蛋白的表达。【结果】发现信号蛋白 CaN 转录、表达在 0.1% OVA 的情况下无血清组和正常血清组高于其它实验组, 与 10%OVA 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。0.1%OVA 浓度下, 抗病毒口服液与复方连翘血清组的 CaN 表达均有明显降低, 但两者之间降低程度无显著差别; 复方连翘血清组在 10%OVA 条件下的 CaN 转录表达, 与无血清组比较, 有显著升高 ( $P < 0.05$ )。【结论】复方连翘可能通过调节信号转导通路第一个接头蛋白 CaN 的转录表达来影响 Th 的分化进而实现对机体的免疫调控, 同时也表明复方连翘通过双向调节、多环节、多途径实现的对机体免疫调节作用。

**关键词:** 复方连翘; Th 细胞分化; 信号转导; 钙神经磷酸酶

## Effects of the Compound Traditional Medicine Weeping Forsythia on Expression of Th Differentiation Signaling Transduction Protein Calcineurin

GAO Hai<sup>1,2</sup>, LI Xiu-lan<sup>3</sup>, ZENG Zheng-ling<sup>1</sup>, CHEN Jian-xin<sup>1</sup>, CHEN Zhang-liu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; <sup>2</sup>College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi; <sup>3</sup>College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this experiment is to explore the mechanism of the compound traditional medicine weeping forsythia regulating immunity by testing the expression of the differentiation signaling transduction protein, calcineurin. 【Method】 To prepare the compound weeping forsythia prescription serum, the Ova and ConA were used as antigen in induction and T cell as presenting cell, the T cells were intervening cultured for 24 hours, and then the expression of calcineurin was examined by RT-PCR and Western blot. 【Result】 The expression of CaN mRNA was elevated in the 0.1% Ova groups comparing with normal serum and serum-free group. The 0.1% Ova groups were significantly different with the 10% Ova groups ( $P < 0.01$ ). The protein expression of CaN was significantly down regulated in compound weeping forsythia serum groups with Western blot detecting, but there was no significant difference between the two groups at concentration of 0.1% Ova. The CaN expression of the compound weeping forsythia serum group was elevated obviously compared with the group without serum ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】 The compound weeping forsythia has provided an immunomodulation by transduction of regulatory signal, and by realizing many aspects and double direction regulation. The results showed that the compound weeping forsythia has more referential values of the selection medication on deficiency syndrome and excess syndrome.

**Key words:** the compound weeping forsythia; Th differentiation; signal transduction; calcineurin

收稿日期: 2008-04-25; 接受日期: 2009-02-25

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2004A20901003)

作者简介: 高海 (1973-), 男, 山西神池人, 博士, 研究方向为中药防治畜禽疾病机理。Tel: 15935664749; E-mail: scaugh@163.com。通信作者曾振灵 (1963-), 男, 广东广州人, 教授, 博士, 研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】动物机体免疫调控通过 Th (辅助性 T 淋巴细胞) 细胞多种因子的转录, 涉及多种细胞内信号转导因子的参与, 而钙调神经磷酸酶是 Th 细胞活化的第一条信号通路中的主要接头蛋白之一。【前人研究进展】Th 细胞在抗原刺激后引发钙离子内流, CaN (钙调神经磷酸酶) 与 CaMKIV (钙调蛋白激酶 IV) 协同激活 T 细胞的基因表达, 促使 NFAT 活化, 激活 Th0 细胞, CaN 活化, 继之使 NFAT 去磷酸化, 后者进入核内结合到 IL-2 转录调控区, 启动 IL-2 的转录, 使 Th 细胞开始活化, 并进一步分化为以表达 IFN- $\gamma$  为特征因子的 Th1 细胞介导细胞免疫和以表达 IL-4 为代表因子的 Th2 细胞介导体液免疫, 对免疫平衡发挥关键性的调节作用<sup>[1-6]</sup>。目前认为 CaN 是一种广泛分布的、参与多种细胞功能调节的多功能信号酶, 在细胞因子介导的 T 细胞活化中发挥重要作用<sup>[7-11]</sup>。

【本研究切入点】研究显示, 中药复方可明显改善异常的免疫功能, 恢复免疫功能的平衡, 但其具体作用机制目前尚缺乏深入研究。免疫平衡的失调主要发生在 Th 细胞活化、分化阶段, 即 Th0 细胞活化的信号转导过程中, 此过程也即是最可能干预免疫调节的阶段。【拟解决的关键问题】本试验选用清热解毒及补益药组成的方药复方连翘, 制备成含药血清, 干预体外定向诱导分化的 Th 细胞, 检测 CaN 的转录和表达, 探究中药复方连翘对信号传导通路过程中免疫调控的分子机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

预染蛋白 Marker (Fermentas 公司产品); 蛋白质分子量标准 (Mark12TM Unstained Standard: Invitrogen 公司); 小鼠抗鸡 CaN 抗体 (Southernbiotech 公司产品); 兔抗鼠 IgG HRP (South San Francisco.CA 公司产品); SDS、过硫酸铵、N, N-甲叉双丙烯酰胺、N, N, N, N-tetramethyl ethylenediamine (四甲基乙二胺)、考马斯亮蓝 R-250、EDTA、DTT、尿素、 $\beta$ -巯基乙醇、甘氨酸 (北京鼎国生物技术有限公司); DAB 显色剂 (3, 3'-二氨基联苯胺) (广州威佳公司); 脱脂奶粉 (黑龙江完达山乳业股份有限公司); 醋酸纤维膜 (广州威佳公司); 传染性法氏囊 BC6/85F4 病毒 (中国兽医药品监察所); 抗病毒口服液 (广州市雪香制药股份有限公司生产, 批号 20020722)。

### 1.2 主要仪器

Universal 32R 型冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); Eppendorf 5415D 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); INNOVA-4000 摇床 (美国 New Brunswick Scientific 公司); MS2 Minishaker 型旋涡仪 (德国 IKA 公司); 核酸-蛋白测定仪 (Biophotometer, 德国 Eppendorf 公司); 925REL#10 型超低温冰箱 (美国 Fhermo Forma 公司); DF-D II 型电泳仪 (北京东方特力科贸中心); TS-1 型脱色摇床 (江苏海门麒麟医用仪器厂); WD-9406 型胶片观察灯 (北京六一仪器厂); JY92-2D 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所); Mini-PROTEAN@3Cell (BIO-RAD 公司)。

### 1.3 中药复方与制备

复方连翘由连翘、金银花、黄芩、黄芪等组成, 单味中药购于广州同仁堂大药店。试验前将组方药粉碎, 水煎 2 次, 合并滤液, 使用旋转蒸发仪减压浓缩成相当于含原生药量  $1.0 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (按中药复方粉剂计算其重量), pH 调至 7.2~7.4。高压灭菌,  $4^\circ\text{C}$  保存。

### 1.4 试验动物分组与含药血清制备

50 只 20 日龄健康的岭南黄鸡, 购自广东省农业科学院畜牧研究所, 随机均分为下列 5 组: 正常血清组; 抗病毒口服液血清组 (按  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌服抗病毒口服液); 感染病毒血清组 (以点眼滴鼻方式感染传染性法氏囊病毒 (IBDV),  $0.2 \text{ ml}/\text{羽}$ ); 感染病毒复方连翘治疗血清组 (先以点眼滴鼻方式感染 IBDV, 然后按  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌服复方连翘汤); 复方连翘血清组 (按  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌服复方连翘汤)。试验鸡灌胃前 12 h 禁食, 自由饮水, 每天给药 2 次, 连续 7 d, 末次灌药后 1 h, 翅静脉采血,  $2\ 000 \text{ r}/\text{min}$  离心 5~8 min 分离血清,  $56^\circ\text{C}$  灭活 30 min, 无菌过滤血清,  $-70^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.5 鸡脾 T 淋巴细胞的制备

将 8 周龄健康岭南黄鸡采取颈静脉放血, 处死。无菌条件下取鸡脾脏, 用灭菌的 Hank's 液洗涤 2~3 次, 剔除脂肪和结缔组织, 置于 80 目的铜网上剪碎, 然后用针头轻捻碎组织, 使细胞大量溢出, 收集细胞悬液移至离心管中,  $1\ 000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10 min 后, 弃上清。加 10 倍体积的 Tris-NH $_4$ Cl (pH 7.2) 至细胞沉淀, 混合, 置室温下 10 min,  $1\ 000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10 min, 用冷 Hank's 液洗涤 1~4 次。取 10 ml 离心管, 每管加入 6 ml 淋巴细胞分离液, 现加入 3 ml 淋巴细胞悬液, 于水平离心机,  $2\ 000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10~30 min。用巴氏吸管吸弃上层清液, 吸取中间两液界面的淋巴细胞层, 置新的离心管中。用 Hank's 液重新悬浮,  $2\ 000 \text{ r}/\text{min}$

离心 10 min, 离心洗涤 2~3 次。将上清液除去后, 用含 10%胎牛血清的 RPML-1640 培养液重新悬浮, 经台盼蓝染色计数活细胞 >95%, 将淋巴细胞以完全培养液调为  $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  备用。

### 1.6 分组细胞培养

分 6 组培养, 无血清组、正常血清组、抗病毒口服液血清组、感染病毒血清组、感染病毒复方连翘治疗血清组、复方连翘血清组, 每组设 4 个重复。将细胞悬液加入 24 孔培养板, 每孔 0.5 ml, 同时加 20% 含药血清培养液, 使其终浓度为 10%。每组分别加入  $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ConA; 放置在  $39^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 48 h, 收集淋巴细胞培养物, 2 000 r/min、 $4^\circ\text{C}$  离心 5 min, 弃上清, 用生理盐水离心洗涤 2 次, 用于总 RNA 的提取。

### 1.7 各组 CaN 基因 mRNA 的表达检测

采用 TRIZOL 一步法提取总 RNA, 使用 ReverTra Dash<sup>TM</sup>、ReverTra Ace  $-\alpha$ -TM (TOYOBO) 试剂, 取 RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  6  $\mu\text{l}$ 、 $5 \times \text{RT}$  Buffer 4  $\mu\text{l}$ 、dNTP Mixture (各  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{l}$ 、RNase Inhibitor ( $10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Oligo (dT) 20 ( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Total RNA 5  $\mu\text{l}$ 、ReverTra Ace 1  $\mu\text{l}$  总体积为 20  $\mu\text{l}$  加入 DEPC 处理的 PCR 管中。在  $30^\circ\text{C}$  静置 10 min,  $42^\circ\text{C}$  下 20 min,  $99^\circ\text{C}$  煮沸 5 min,  $4^\circ\text{C}$  静置 5 min, 瞬间离心, 用于以下细

胞因子反转录 PCR 扩增。

$\beta$ -actin 基因 PCR: 25  $\mu\text{l}$  反应体系中含反转录产物 0.5  $\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP Mix 2.0  $\mu\text{l}$ 、 $10 \times \text{ExTaq}$  Buffer ( $\text{mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ 、Oligo (dT) 20 ( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ 、 $\beta$ -actin 上下游引物各 1.0  $\mu\text{l}$ 、TaqRaExTaq ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$  ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )、dd $\text{H}_2\text{O}$  16.75  $\mu\text{l}$  充分混匀, 于离心机上慢速离心 5 s, 其 PCR 反应循环条件为  $95^\circ\text{C}$  4 min 预变性、 $94^\circ\text{C}$  45 s、 $50^\circ\text{C}$  30 s, 共 28 个循环、 $72^\circ\text{C}$  1 min、 $72^\circ\text{C}$  10 min, 退火延伸。

CaN 基因 (Blend Taq) PCR: 25  $\mu\text{l}$  反应体系中含反转录产物 1.0  $\mu\text{l}$ 、 $10 \times \text{PCR}$  Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP Mix 2.0  $\mu\text{l}$ 、Oligo (dT) 20 ( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ 、CaN 上下游引物各 1.5  $\mu\text{l}$ 、TaqRaExTaq ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$  ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )、dd $\text{H}_2\text{O}$  15.25  $\mu\text{l}$  充分混匀, 于离心机上慢速离心 5 s。PCR 反应循环条件为  $94^\circ\text{C}$  4 min 预变性、 $94^\circ\text{C}$  45 s、 $55^\circ\text{C}$  30 s, 共 35 个循环、 $72^\circ\text{C}$  1 min、 $72^\circ\text{C}$  10 min, 退火延伸。反应结束后于  $4^\circ\text{C}$  保存。

1.5% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物在紫外投射仪上检测, 凝胶成像仪扫描定量, 与同组  $\beta$ -actin 电泳带光密度值的比值作为该组标本的基因表达的相对数值。引物序列见表 1。

### 1.8 Western blot 检测

表 1 检测 CaN 和  $\beta$ -actin 的 PCR 引物参数

Table 1 Parameters of PCR primers for detecting CaN and  $\beta$ -actin

基因及基因库	引物位置	引物序列	PCR 产物大小
Gene and GenBank	Primer position	Primer sequence	Size of PCR product (bp)
$\beta$ -actin (X00182)	Rnt4034-4053	CATTGCCCCACCTGAGCGCA	176
	Fnt4210-4191	CATCACAGGGGTGTGGGTGT	
Calcineurin (AY324834)	Rnt575-596	CTGCTCTGATGAACCAACAGTT	300
	Fnt1078-1058	ACGGCAAGGACCAGGTAACT	

在进行 Western blot 之前, 将收集培养板中的细胞装入 1.5 ml 离心管, 在微型离心机上 2 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清; 加入  $1 \times \text{PBS}$  1 ml 吹打沉淀细胞使之充分混匀, 洗去培养基中的蛋白质, 离心、弃上清; 每管加 100  $\mu\text{l}$  细胞裂解液 ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris (pH 7.5),  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 1% Triton, sodium pyrophosphate,  $\beta$ -glycerophosphate, EDTA,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , leupeptin 等), 在液氮中反复冻溶, 充分破碎细胞, 在高速低温离心机上 15 000 r/min、 $4^\circ\text{C}$  离心 15 min, 制成蛋白质样品, Bradford 法测定蛋白浓度,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱贮存备用。使用时将蛋白样品用  $2 \times \text{SDS}$  凝胶上

样缓冲液 1 : 1 稀释,  $100^\circ\text{C}$  加热 5 min 备用。参照《分子克隆实验指南 (第三版)》所述方法略作修改进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[12]</sup>。180 mA 电流恒流湿转 4 h, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 1% 脱脂奶粉 TBS 液稀释一抗, 将 NC 膜放入, 在  $37^\circ\text{C}$  恒温摇床上过夜。按 1 000 : 1 用含 1% 脱脂奶粉 TBS 液稀释二抗, 在  $37^\circ\text{C}$  恒温摇床上振摇 4 h 左右, 加入 20 ml 辣根过氧化物酶显色液, 同时加入 20  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 将 NC 膜放入其中, 显色 3~5 min, 待出现特异性反应带后, 用双蒸水洗膜 3 次终止显色反应。

## 1.9 软件及程序及统计分析

引物设计等采用 DNASTar 软件, PCR 半定量表达的定量分析软件: Glyko BandScan Version 5.0。蛋白表达量的扫描软件: 天能 GIS 凝胶成像系统的 GIS 软件。所得数据采用 SPSS11.0 软件进行方差分析, 结果以平均数 $\pm$ 标准误 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示,  $P < 0.05$  表示为具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同含药血清对 T 细胞 CaN mRNA 表达的影响

RT-PCR 半定量结果 (图 1) 显示: 经活化后, 各组 T 细胞 CaN mRNA 正常血清组均有不同程度的变化。0.1%OVA 无血清和正常血清对照组比 10%OVA 无血清和正常血清对照组表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 0.1%OVA 复方连翘血清和抗病毒口服液血清组与无

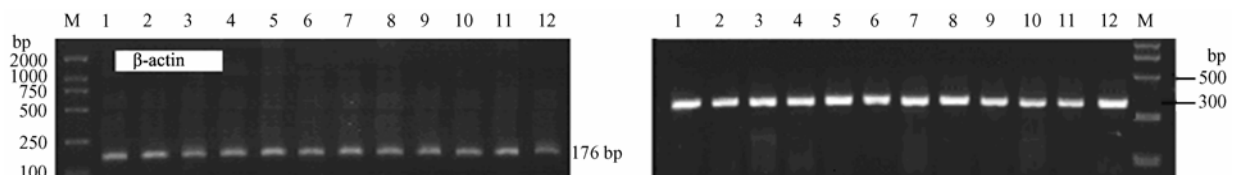
血清组比较, 表达降低, 但无显著差异; 10%OVA 复方连翘血清和抗病毒口服液血清组与无血清组比较, 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 0.1%OVA 抗病毒口服液组、复方连翘血清组应该与正常血清组比较, 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 10%OVA 抗病毒口服液组、复方连翘血清组应该与正常血清组比较, 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 0.1%OVA 和 10%OVA 感染病毒复方连翘治疗血清组应该与感染病毒血清组比较, 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); 0.1%OVA 和 10%OVA 感染病毒组和感染病毒复方连翘治疗血清组与无血清或正常血清对照组比较都明显降低 ( $P < 0.05$ ), 10%OVA 感染病毒组和感染病毒复方连翘血清组比 0.1%OVA 感染病毒组和感染病毒复方连翘血清组表达明显降低 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 不同含药血清对 T 细胞 CaN mRNA 表达的影响

Table 2 Effect of different drug sera on the CaN mRNA expression of T lymphocyte

组别 Groups	0.1%OVA ( $\bar{x} \pm SE$ )	10%OVA ( $\bar{x} \pm SE$ )
空白(不加血清) Serum-free group	1.790 $\pm$ 0.13*	1.627 $\pm$ 0.14
正常血清(不加药物) Normal serum control group	1.838 $\pm$ 0.22	1.637 $\pm$ 0.18
抗病毒口服液血清组 Kangbingdu oral-liquid serum group	1.767 $\pm$ 0.18*	1.681 $\pm$ 0.02*
感染病毒血清组 Serum group infected with IBDV	1.470 $\pm$ 0.13*	1.449 $\pm$ 0.10*
感染病毒复方连翘治疗血清组 Compound weeping forsythia serum group infected with IBDV	1.609 $\pm$ 0.26*	1.562 $\pm$ 0.25*
复方连翘血清组 Compound weeping forsythia serum group	1.723 $\pm$ 0.15*	1.710 $\pm$ 0.11*

\*表示与正常血清组比较  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.05$  comparing with the normal serum control groups



M: DL-2000 marker; 1: 0.1%OVA 生理盐水组; 2: 10%OVA 生理盐水组; 3: 0.1%OVA 正常血清组; 4: 10%OVA 正常血清组; 5: 0.1%OVA 抗病毒口服液血清组; 6: 10%OVA 抗病毒口服液血清组; 7: 0.1%OVA 感染病毒血清组; 8: 10%OVA 感染病毒血清组; 9: 0.1%OVA 感染病毒复方连翘治疗血清组; 10: 10%OVA 感染病毒复方连翘治疗血清组; 11: 0.1%OVA 复方连翘血清组; 12: 10%OVA 复方连翘血清组  
M: DL-2000DNA marker; 1: 0.1%OVA physiological saline control group; 2: 10% OVA physiological saline control group; 3: 0.1%OVA normal serum control group; 4: 10%OVA normal serum control group; 5: 0.1%OVA kangbingdu oral-liquid serum group; 6: 10%OVA kangbingdu oral-liquid serum group; 7: 0.1%OVA serum group infected with IBDV; 8: 10%OVA serum group infected with IBDV; 9: 0.1%OVA compound weeping forsythia serum group infected with IBDV; 10: 10%OVA compound weeping forsythia serum group infected with IBDV; 11: 0.1%OVA compound weeping forsythia serum group; 12: 10%OVA compound weeping forsythia serum group

图 1 RT-PCR 显示 CaN mRNA 在各组细胞中的表达

Fig. 1 Expression of CaN mRNA in cells with different drug serum groups by RT-PCR

### 2.2 Western blot 检测不同含药血清 CaN 蛋白的表达

用 Westen blot 光密度扫描检测 CaN 蛋白的表达

(图 2), 结果显示与 CaNmRNA 转录增加相似。0.1%OVA 浓度时空白组表达最高, 与正常血清比较, 其它实验组均降低, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); 10%OVA

浓度时, 复方连翘血清组、抗病毒口服液血清组比正常血清组或无血清组极显著下降 ( $P < 0.01$ ), 正常血

清组和无血清各组差异不明显, 复方连翘组与抗病毒口服液组也差异不显著 (表 3)。

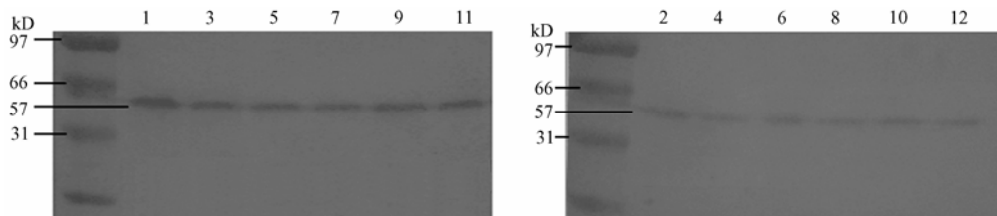
表 3 各组 T 细胞 Western blot 检测 CaN 的光密度值

Table 3 Result of different drug sera on T lymphocyte of spleenocyte CaN optical density value by Western blot

组别 Groups	0.1%OVA	10%OVA
空白(不加血清) Serum-free group	19624.20±941.94	15362.80±586.67
正常血清(不加药物) Normal serum control group	19513.80±600.13	15038.80±763.09
抗病毒口服液血清组 Kangbingdu oral-liquid drug serum group	15622.80±988.68**	16263.20±1470.19**
感染病毒血清组 Serum group infected with IBDV	12398.20±736.82**	13633.00±823.81
感染病毒复方连翘治疗血清组 Compound weeping forsythia serum group infected with IBDV	15473.40±764.01*	15580.00±1000.26
复方连翘血清组 Compound weeping forsythia serum group	15956.40±772.45**	16467.20±1218.74**

\*表示与正常血清组比较  $P < 0.05$ , \*\*表示与正常血清组比较  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  Comparing with the normal serum control groups. \*  $P < 0.01$  Comparing with the normal serum control groups



M: 预染 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质; 1: 0.1%OVA 生理盐水组; 2: 10%OVA 生理盐水组; 3: 0.1%OVA 正常血清组; 4: 10%OVA 正常血清组; 5: 0.1%OVA 抗病毒口服液血清组; 6: 10%OVA 抗病毒口服液血清组; 7: 0.1%OVA 感染病毒血清组; 8: 10%OVA 感染病毒血清组; 9: 0.1%OVA 感染病毒复方连翘治疗血清组; 10: 10%OVA 感染病毒复方连翘治疗血清组; 11: 0.1%OVA 复方连翘血清组; 12: 10%OVA 复方连翘血清组  
M: SDS-PAGE protein marker; 1: 0.1%OVA physiological saline control group; 2: 10% OVA physiological saline control group; 3: 0.1%OVA normal serum control group; 4: 10%OVA normal serum control group; 5: 0.1%OVA kangbingdu oral-liquid serum group; 6: 10%OVA kangbingdu oral-liquid serum group; 7: 0.1%OVA serum group infected with IBDV; 8: 10%OVA serum group infected with IBDV; 9: 0.1%OVA compound weeping forsythia serum group infected with IBDV; 10: 10%OVA compound weeping forsythia serum group infected with IBDV; 11: 0.1%OVA compound weeping forsythia serum group; 12: 10%OVA compound weeping forsythia serum group

图 2 Western blot 检测 CaN 在各组细胞中的表达

Fig. 2 Expression of CaN Western-blotting with different drug serum groups

### 3 讨论

CaN 是目前所知的唯一依赖于  $Ca^{2+}$ /钙调素的 Ser/Thr 磷酸蛋白磷酸酶, 在分类上属于磷酸蛋白磷酸酶-2B (PP-2B), 参与多种功能调节<sup>[5]</sup>。20 世纪 70 年代末 80 年代初由加拿大籍华人王学荆教授、美籍华人张槐耀教授及美国的 Klee 教授的实验室分别在猪脑中发现并纯化成功, 由于它结合 CaM 并且在动物神经元中大量存在, Klee 将其命名为 Calcineurin-钙调神经磷酸酶。CaN 是 Th 细胞将活化信号传入核内的重要信号转导蛋白之一, 由催化亚单位 CnA 和调节亚单位 CnB 组成异源二聚体, CaN 完全激活依赖于  $Ca^{2+}$  和 CaM 的存在, 其特异性抑制剂为环孢霉素 (CsA)

或 FK506<sup>[13-16]</sup>。

T 淋巴细胞活化机制是现代免疫学重要研究领域, 从 TCR 接受 APC 提供的抗原信息到 T 细胞基因活化并开始增殖或产生细胞因子是一个复杂而精细的过程, 其间涉及诸多信号转导分子的相互作用, 而 CaN 在 T 淋巴细胞活化中发挥重要作用<sup>[17-19]</sup>。鸡与人和牛、马、猪、羊等哺乳动物类似, 其 T 淋巴细胞也存在表面分化抗原 (cluster of differentiation, CD), 鸡的 CD 研究起步较晚, 自 1983 年 Pink 和 Rijnbeek 用单克隆抗体研究鸡 T 淋巴细胞表面抗原, 1986 年 Chen 等用单克隆抗体证明鸡 T 淋巴细胞表面存在 CD3/TCR 复合物, TCR 识别 MHC 肽复合物, 通过 CD3<sup>+</sup>信号传入细胞内。T 细胞受到抗原刺激后可激活

膜磷脂系统而产生 IP3 和 DAG, 分别使胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高和 PKC 活化,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  使 CaN 活化<sup>[20-21]</sup>, 活化的 CaN 可使胞浆内的 NF-ATc 去磷酸化, 暴露出其上的核定位信号, 使 NF-ATc 转位入核, 调节 IL-2、IL-4 等 Th 细胞分化因子及其受体的转录调控区结合, 启动转录, 还可与 GATA 等其它转录因子相互作用, 共同促进 T 细胞活化信号的转导<sup>[22-26]</sup>。CaN 是 T 细胞中一个主要的钙调素结合蛋白, T 细胞活化的重要转录因子 NFAT 的主要调节蛋白。CaN 在中枢淋巴器官中 T 细胞的选择和其后免疫应答过程中的活化极化两方面都发挥的重要作用, 是 Th 细胞活化过程中极化信号转导的重要环节之一<sup>[27-30]</sup>。

本试验采用中药血清药理学的方法, 选用复方连翘汤制备成中药含药血清, 干预体外定向诱导分化的 Th 细胞, 经 RT-PCR 和 Western-blot 检测, 结果表明 CaN 转录、表达在 0.1%OVA 无血清对照组和正常血清对照组比其它组增强, 与 10%OVA 对照组相比差异有显著性, 说明 CaN 主要在 Th 的分化中发挥信号转导作用。同时两对照组之间无明显差别, 提示正常血清经灭活后对 Th 细胞的分化无明显影响。而在 0.1%OVA 组, 加入抗病毒口服液和复方连翘血清后, CaN 表达与未加含药血清对照组比较均有明显降低, 但二者之间降低程度无显著差别; 说明抗病毒口服液和复方连翘对偏于 Th 过极化的分化都有抑制作用。在 10%OVA 组, 加入抗病毒口服液和复方连翘血清后 CaN 表达, 与未加血清对照组比较, 差别显著。说明在 Th 受抑制的环境中, 具有促进其增殖的作用。

## 4 结论

复方连翘汤对 CaN 过高的表达有降低作用, 而对其表达偏低有促进的作用。本试验结果提示, 复方连翘汤可能通过影响不同的 Th 细胞分化活化信号通路及其信号蛋白, 从而发挥调节 Th 分化的作用, 可能是通过调节 CaN 转录表达影响 Th 的分化。同时, 结果也为 Th 紊乱的免疫性疾病在中药用药选择方面提供了重要的实验参考依据, 对于 Th 功能亢进所致的法氏囊等免疫性疾病, 有重要的临床应用价值。

## References

- [1] Tuan N, Simone D G. NFAT signaling in neural development and axon growth. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2008, 26: 141-145.
- [2] Daniel J F, Robert D B, Lee P H. Neuronal calcium sensor proteins are unable to modulate NFAT activation in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780: 240-248.
- [3] Heit J J, Apelqvist A A, Gu X, Winslow M M, Neilson J R, Crabtree G R, Kim S K. Calcineurin/NFAT signaling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature*, 2006, 443: 345-349.
- [4] Chen Y C, Tsai W J, Wu M H, Lin L C, Kuo Y C. Suberosin inhibits proliferation of human peripheral blood mononuclear cells through the modulation of the transcription factors NF-AT and NF- $\kappa$ B. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150: 298-312.
- [5] Zhang F P, Boothby M. T helper type 1-specific Brg1 recruitment and remodeling of nucleosomes positioned at the IFN- $\gamma$  promoter are Stat4 dependent. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (6): 1493-1505.
- [6] Sanna B, Brand E B, Kaiser R A, Pfluger P, Witt S A, Kimball T R, van Rooij E, De Windt L J, Rothenberg M E, Tschop M H, Benoit S C, Molkenin J D. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators *in vivo*. *PNAS*, 2006, 103 (19): 7327-7332.
- [7] Sugiura R, Sio S O, Shuntoch H, Kuno T. Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58: 278-288.
- [8] Hall S R, Rhodes J. Schiff base-mediated co-stimulation primes the T-cell-receptor-dependent calcium signalling pathway in CD4 T cells. *Immunology*, 2001, 104: 50-57.
- [9] Dienz O, Eaton S M, Krahl T J, Diehl S, Charland C, Dodge J, Swain S L, Budd R C, Haynes L, Rincon M. Accumulation of NFAT mediates IL-2 expression in memory, but not naive, CD4<sup>+</sup> T cells. *PNAS*, 2007, 104(17): 7175-7180.
- [10] Rooney J W, Hodge M R, McCaffrey P G, Rao A, Glimcher L H. A common factor regulates both Th 1- and Th2-specific cytokine gene expression. *The Embo Journal*, 1994, 13(3): 625-633.
- [11] Ding W, Kim S J, Nair A M, Michael B, Boris-Lawrie K, Tripp A, Feuer G, Lairmore M D. Human T-Cell lymphotropic virus type 1 p12I enhances interleukin-2 production during T-Cell activation. *Journal of Virology*, 2003, 77(20): 11027-11039.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1726.  
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd)*. Beijing: Science Press, 2002: 1713-1726. (in Chinese)
- [13] Crozatier C, Farley S, Mansuy I. M, Dumas S, Giros B, Tzavarae T. Calcineurin (protein phosphatase 2B) is involved in the mechanisms of action of antidepressants. *Neuroscience*, 2007, 144: 1470-1476.

- [14] O'Keefe S J, Tamura J, Kincaid R L, Tocci M J, O'Neill E A. FK-506-and CsA-sensitive activation of the interleukin promoter by calcineurin. *Nature*, 1992, 357: 692-694.
- [15] Wang H L, Yao S Y, Lin W L, Du Y W, Xiang B Q, He S, Huang C, Wei Q. Different roles of Loop 7 in inhibition of calcineurin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 362: 263-268.
- [16] Clipstone N A, Crabtree G R. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 1992, 357: 695-697.
- [17] Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 235: 271-275.
- [18] Hui H, McHugh D, Hannan M, Zeng F, Xu S Z, Khan S U, Levenson R, Beech D J, Weiss J L. Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *The Journal of Physiology*, 2006, 572: 165-172.
- [19] Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro M S. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type  $Ca^{2+}$  channels. *Neurosci*, 2004, 24: 10980-10992.
- [20] Han X J, Lu Y F, Li S A, Kazuhito T, Kohji T, Masayuki M, Hideki M. Involvement of calcineurin in glutamate-induced mitochondrial dynamics in neurons. *Neuroscience Research*, 2008, 60: 114-119.
- [21] Yakel J L. Calcineurin regulation of synaptic function from ion channels to transmitter release and gene transcription. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1997, 18(4): 124-133.
- [22] Bhattacharyya M K, Zheng H, Kongkasuriyachai D, Kumar N. *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32(6): 739-747.
- [23] Hayden-Martinez K, Kane L P, Hedrick S M, Kristine H M, Lawrence P K, Stephen M H. Effects of a constitutively active form of calcineurin on T cell activation and thymic selection. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 3713-3721.
- [24] Kobayashi D, Ohkubo S, Nakahata N. Cooperation of calcineurin and ERK for UTP-induced IL-6 production in HaCaT keratinocytes. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 573: 249-252.
- [25] Heath V L, Shaw S L, Roy S, Cyert M S. Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-Mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(3): 695-704.
- [26] Wang J, Pierre P, Anne A, Hiba K, Chantal L, Wang H, Mona N. Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(22): 9829-9844.
- [27] Amasaki Y, Miyatake S, Arai N, Arai K. Regulation of nuclear factor of activated T-cell family transcription factors during T-cell development in the thymus. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106: 1-9.
- [28] Taleuchi K, Roehrl M H A, Sun Z Y J, Wagner G. Structure of the calcineurin-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates. *Structure*, 2007, 15(5): 587-597.
- [29] Wang J X, Tang W, Shi L P, Wan J, Zhou R, Ni J, Fu Y F, Yang Y F, Li Y, Zuo J P. Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150: 652-661.
- [30] Horiba M, Muto T, Ueda N, Ophthof T, Miwa K, Hojo M, Lee J K, Kamiya K, Kodama I, Yasui K. T-type  $Ca^{2+}$  channel blockers prevent cardiac cell hypertrophy through an inhibition of calcineurin-NFAT3 activation as well as L-type  $Ca^{2+}$  channel blockers. *Life Sciences*, 2008, 82: 554-560.