文章编号:1000-5404(2008)01-0005-03

论著

脂多糖上调 CRH 及其结构相关肽 Ucn 在大鼠腹腔巨噬细胞的表达

杨 列,周继红,张岫竹,刘大维,孙巧玲,蒋建新 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,全军交通伤重点实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 观察促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)及其结构相关肽 urocortin(Ucn)在大鼠腹腔巨噬细胞的表达及 LPS 对它们表达的影响。**方法** 体外培养 Wistar 大鼠腹腔巨噬细胞,共收集脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)处理 0、1、2、4、8 h 组细胞,每组含 8 份分别来自不同大鼠的细胞样本。收集细胞总 mRNA($n=8$)及总蛋白($n=6$),利用 RT-PCR 及 ELISA 技术分别检测各组细胞 CRH 及 Ucn mRNA 转录水平及胞溶多肽含量。**结果** RT-PCR 结果显示,正常大鼠腹腔巨噬细胞中即有一定水平的 CRH 及 Ucn mRNA,LPS 刺激后二者水平均显著增高,刺激 4 h 二者均达峰值,约为对照组的 2 倍。ELISA 结果显示,正常大鼠腹腔巨噬细胞即可表达 CRH[(0.07 ± 0.01) ng/10^7细胞]及 Ucn[(1.00 ± 0.48) ng/10^7细胞];LPS 刺激促进了二者的表达,CRH 水平在 2 h 达高峰[(0.30 ± 0.07) ng/10^7细胞],Ucn 水平在 8 h 达高峰[(8.68 ± 1.25) ng/10^7细胞]。**结论** 大鼠腹腔巨噬细胞同时表达 CRH 及 Ucn,注适量 LPS 刺激后,两者表达水平均会显著上调,但 Ucn 多肽水平显著高于 CRH。因此,炎症条件下的巨噬细胞可能是局部 CRH 家族特别是 Ucn 的潜在来源细胞。

关键词:腹腔巨噬细胞;促肾上腺皮质激素释放激素;urocortin;脂多糖
中图法分类号:R392-33;R392.1;R392.6 **文献标识码:**A

LPS up-regulates corticotropin releasing hormone and urocortin in cultured rat peritoneal macrophages

YANG Lie, ZHOU Ji-hong, ZHANG Xiu-zhu, LIU Da-wei, SUN Qiao-ling, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the synthesis of corticotropin releasing hormone (CRH) and urocortin (Ucn), in rat peritoneal macrophages and the effect of LPS on their expressions. Methods Peritoneal macrophages were harvested from Wistar rats, and cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum. The total RNA and total protein were extracted from normal control cells and the cells treated by LPS for 1, 2, 4 and 8 h. Each cell group was composed of 8 samples from different rats RT-PCR was used to observe transcriptions of CRH mRNA and Ucn mRNA. ELISA was used to observe the expression of intracelluar CRH and Ucn. Results CRH and Ucn mRNA existed in normal rat peritoneal macrophages and LPS up-regulated them to the peak at 4 h. CRH and Ucn peptides also existed in normal rat peritoneal macrophage and they respectively reached the peaks (0.30 ± 0.07) ng/10^7cells at 2 h and (8.68 ± 1.25) ng/10^7cells at 8 h after LPS treatment. Conclusion LPS enhancet the expressions of CRH and Ucn in cultured rat peritoneal macrophages, but Ucn peptide level is higher than CRH peptide. These results indicate the macrophages are the potential resource of CRH and Ucn in inflammatory reaction.

Key words: peritoneal macrophage; corticotropin releasing hormone; urocortin; lipopolysaccharide

应激可以激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA),介导一系列病理生理过程,其中包括免疫炎症反应。由 41 个氨基酸残基构成的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH),是 HPA 上关键的神经内分泌因子,它促进促黑素(proopiomelanocortin)及促肾上腺皮质

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522602)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522602)
作者简介:杨 列,男,四川省安岳县人,硕士研究生,主要从事创伤方面的研究。电话:(023)68757434
通信作者:周继红,电话:(023)68757441
收稿日期:2007-03-07;修回日期:2007-04-09

激素(adrenocorticortopic hormone, ACTH)的分泌,而后二者介导了糖皮质激素的合成和释放,从而抑制了免疫炎症反应[1-3]。urocortin(Ucn)是CRH家族成员之一,二者有相同的受体家族。研究发现,CRH及Ucn可以直接调控免疫细胞如巨噬细胞功能,但是它们的外周来源目前还有待明确。我们研究证实在大鼠腹腔巨噬细胞中可以同时转录和合成CRH和Ucn,并且它们的合成水平在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激后很快显著上调。

1 材料与方法

1.1 大鼠腹腔巨噬细胞培养

DMEM培养基分离大鼠(Wistar大鼠,雄性,体质量240~260 g,购于本院实验动物中心)腹腔中腹腔巨噬细胞,细胞1 000 r/min离心5 min,分离后以1×10^7/板接种于36 mm培养皿中,用含10% FCS、10 mmol/L谷氨酰胺、100 U/ml青霉素/链霉素的DMEM培养基在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。细胞在上述条件下培养20~24 h用于下一步实验。

1.2 LPS活化大鼠腹腔巨噬细胞

按1.1中方法获得的大鼠腹腔巨噬细胞用无菌PBS冲洗后,用含10、100 ng/ml LPS、10% FCS、10 mmol/L谷氨酰胺、100 U/ml青霉素/链霉素的DMEM培养基在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。所得细胞分为10 ng/ml LPS组、100 ng/ml LPS组,各组分别在培养0、1、2、4、8 h后收集细胞总RNA样本8份和培养上清、细胞总蛋白样本6份。

1.3 CRH及Ucn mRNA水平测定

使用TRI试剂收集细胞总RNA,每个培养皿中细胞PBS冲洗后,用1 ml TRI试剂裂解。我们使用Primer premier 1.0设计了两对CRH及Ucn特异性的寡核苷酸片段[CRH正义链:5′-CTGAGGGAAGTCTTGGAAA-3′,反义链:5′- CACATAGAAACTA-AGCGTGA-3′;Ucn正义链:5′-GCCGTTGTCCATCGACCTCA-3′,反义链:5′-TTGCCCACCGAATCGAATATGA-3′],CRH片段产物长度为332 bp,Ucn产物长度为117 bp。总RNA样本逆转录后,取1 μl cDNA产物用来作PCR扩增,PCR反应条件均为:94 ℃变性,4 min→(94 ℃变性,30 s→55 ℃退火,30 s→72 ℃延伸,1 min)35个循环→延长10 min。在35个循环时mRNA扩增处于对数增长期(根据每对扩增产物的标准曲线)。取5 μl扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad分子成像分析系统成像,Scan软件定量分析。胎盘cDNA作为阳性对照,该组织已经证实表达CRH和Ucn;用水代替cDNA作为阴性对照;使用β-actin作为内参。

1.4 CRH及Ucn多肽测定

培养细胞PBS冲洗后,细胞刮匙刮取细胞,收集细胞并加入250 μl RIPA裂解液,4 ℃超声波震荡(3次,15 s/次),离心后收集上清液用于CRH和Ucn ELISA法测量。BCA法定量检测细胞总蛋白,ELISA法定量检测总蛋白中CRH和Ucn含量,结果用CRH或Ucn含量/总蛋白含量表示。

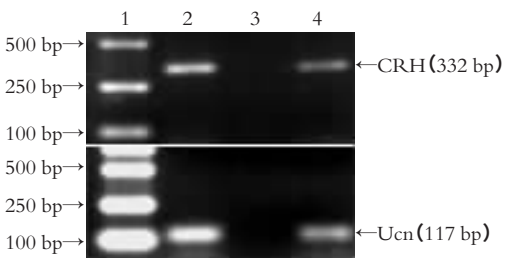
1.5 统计学分析

实验结果用$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 11.0作组间比较,行t检验。

2 结果

2.1 RT-PCR检测CRH及Ucn mRNA转录水平

阳性对照中可见扩增出CRH 332 bp及Ucn 117 bp PCR产物(图1),阴性对照中未见扩增产物。培养的大鼠腹腔巨噬细胞中也均扩增出了CRH及Ucn产物,但含量显著低于阳性对照组。我们使用β-actin看家基因作为内参,PCR扩增显示其水平在这些cDNA样本中没有明显改变。



1:DNA标准;2:胎盘组织(阳性对照);3:水(阴性对照);4:腹腔巨噬细胞

图1 CRH mRNA和Ucn mRNA在大鼠腹腔巨噬细胞的转录

在10 ng/ml及100 ng/ml LPS作用后1 h,CRH及Ucn mRNA即显著上调($P<0.01$),在4 h均达峰值,约为对照组的2倍,二者变化趋势相似;不同浓度LPS组间也无显著差异($P>0.05$,表1)。

表1 LPS处理不同时间后对大鼠腹腔巨噬细胞CRH及Ucn mRNA转录的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CRH	Ucn
10 ng/ml LPS组		
0 h	0.37±0.06	0.29±0.03
1 h	0.48±0.06[a]	0.34±0.04[a]
2 h	0.56±0.08[a]	0.45±0.04[a]
4 h	0.73±0.01[a]	0.54±0.04[a]
8 h	0.72±0.09[a]	0.53±0.03[a]
100 ng/ml LPS组		
0 h	0.37±0.06	0.29±0.03
1 h	0.47±0.09[a]	0.32±0.03[a]
2 h	0.54±0.09[a]	0.47±0.06[a]
4 h	0.76±0.06[a]	0.58±0.05[a]
8 h	0.63±0.10[a]	0.52±0.03[a]

a:$P<0.01$,与0 h组比较

2.2 ELISA检测CRH和Ucn多肽含量

ELISA证实在细胞总蛋白中含有CRH和Ucn多肽。细胞裂解液被用来行ELISA定量分析,如表2所示在正常培养细胞中分别含CRH(0.07±0.01) ng/10^7细胞,含Ucn(1.00±0.48) ng/10^7细胞。100 ng/ml LPS显著提高了两者的表达,分别在2 h和8 h上调至(0.30±0.07) ng/10^7细胞和(8.68±1.25) ng/10^7细胞($P<0.01$)。

表2 100 ng/ml LPS处理不同时间后对大鼠腹腔巨噬细胞CRH及Ucn多肽合成的影响($n=6$, ng/10^7细胞)

组别	CRH	Ucn
0 h	0.05±0.01	1.00±0.50
1 h	0.08±0.02[a]	4.03±1.53[a]
2 h	0.19±0.06[a]	5.52±2.53[a]
4 h	0.13±0.03[a]	6.13±0.85[a]
8 h	0.15±0.07[a]	8.68±1.25[a]

a:$P<0.01$,与0 h组比较

3　讨论

研究表明 CRH 及 Ucn 参与了急性炎症反应,影响了巨噬细胞分泌、吞噬、抗原提呈以及凋亡等[1-5]。但是,外周血 CRH 浓度即使在机体处于应激状态时也极低,而逐步有研究表明 CRH 及其相关肽也表达于外周组织[6]。在许多免疫性疾病中,局部 CRH 表达含量均会显著增高。而 CRH 缺陷小鼠脾脏细胞对 LPS 的反应性显著降低[7]。提示 CRH 家族可以在免疫组织细胞中表达,并通过自分泌或旁分泌方式调控免疫炎症反应。巨噬细胞是参与炎症反应启动的主要免疫细胞之一,而且是多种促炎细胞因子的主要来源。抗原如 LPS 可以结合细胞表面 TLR-4 从而激活巨噬细胞,介导了细胞因子的转录和分泌[8]。而腹腔巨噬细胞为重要的终末巨噬细胞之一,不具备增殖功能。我们研究了在腹腔巨噬细胞是否有内源性 CRH 和 Ucn 合成以及急性炎症早期它们合成水平的变化,以便了解炎症部位分化成熟巨噬细胞在神经-内分泌-免疫网络中的地位。

我们在证实胞溶 CRH 与分泌 CRH 抗原无显著性差异后(资料未显示),通过定量检测胞溶部分 CRH 证实 CRH 在大鼠腹腔巨噬细胞合成,基础表达量为 (0.07 ± 0.01) ng/10^7 细胞。我们用 10 ng/ml 或 100 ng/ml (体外模拟内毒素血症时的 LPS 浓度) LPS 刺激细胞,其 mRNA 水平在 LPS 作用后 4 h 达到峰值,且约为基础水平的 2 倍,但不具有显著浓度依赖性。因此我们选择 100 ng/ml LPS 处理细胞,检测其 CRH 多肽合成水平变化,在作用 2 h 后其合成水平达到峰值 (0.30 ± 0.07) ng/10^7 细胞,约为基础水平的 4 倍。有研究报道 CRH 多肽与其结构相关肽之间可能存在交叉反应,我们检测了 CRH 抗血清和 Ucn 以及 Ucn 抗血清与 CRH 之间的反应性,结果未显示它们间有显著的结合效应。CRH mRNA 和多肽在 LPS 作用后 8 h 仍均维持在较高水平。这些结果显示在急性炎症反应早期内源性 CRH 的合成即显著增高,显示其可能参与了早期炎症反应。如果以平均每个巨噬细胞 500 pg 计算[6],我们所测得的 CRH 浓度约 40 ng/ml,与人胎盘中 CRH 含量 1 ng/g,下丘脑中含量 106 ng/g 在数量级上相当(不考虑人与大鼠种属差异)。因此,巨噬细胞可能作为炎症局部重要的 CRH 来源之一。而高剂量 CRH(50 ng 至 5 μg)可引起大鼠皮下肿胀且不能改变注射促炎成分后的局部水肿,但预注射低剂量 CRH (0.5 ~ 5 ng)则可抑制水肿,我们的研究结果为我们进一步研究 CRH 对巨噬细胞的功能调控提供了依据。

Ucn 作为 CRH 结构相关肽之一,不仅在受体亲和力上与 CRH 有显著性差异[9,10],在组织分布及功能上也与 CRH 不同[11]。而巨噬细胞具有异质性已经得到大家的共识,有研究显示,在大鼠肝脏 kupffer 细胞表达 Ucn 而不表达 CRH[12]。我们在实验中得到胞溶 Ucn 的基础表达量为 (1.00 ± 0.48) ng/10^7 细胞,而其在 LPS 作用 8 h 后达峰值[(8.68 ± 1.25) ng/10^7 细胞],约为基础水平的 9 倍,其 mRNA 水平也在 LPS 作用 4 h 后达峰值,约为基础水平的 2 倍;8 h 后两者仍维持在高水平。这些结果提示巨噬细胞同时可能是炎症局部 Ucn 的一个重要的来源。比起 CRH,Ucn 合成水平要高 20 倍,这是否提示 Ucn 在通过自分泌方式调控巨噬细胞功能上更加重要?而 CRH 及 Ucn 在不同亚群巨噬细胞的差异性表达也提示 CRH 家族在不同亚群巨噬细胞功能调控上可能具有不同的意义。

总之,在本研究中证实了在腹腔巨噬细胞可以同时合成 CRH 和 Ucn,进一步揭示了在炎症反应中 CRH 家族与巨噬细胞的双向联系。

参考文献:

[1] Baigent S M. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response[J]. Peptides, 2001, 22(5): 809 - 820.

[2] Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, *et al*. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages *in vitro* and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice[J]. Infect Immun, 2002, 70(11): 6068 - 6074.

[3] Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, *et al*. Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2[J]. FEBS Lett, 2005, 579(20): 4259 - 4264.

[4] Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, *et al*. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages *via* activation of the transcription factors PU.1 and AP-1[J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1869 - 1877.

[5] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, *et al*. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response[J]. Am J Pathol, 2006, 168(6): 1921 - 1930.

[6] Kempuraj D, Papadopoulou N G, Lytinas M, *et al*. Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells[J]. Endocrinology, 2004, 145(1): 43 - 48.

[7] Venihaki M, Zhao J, Karalis K P. Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide[J]. J Neuroimmunol, 2003, 141(1 - 2): 3 - 9.

[8] 张德明, 邓青南, 李永旺, 等. 脂多糖结合蛋白多抗对大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性及 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2): 140 - 143.

[9] Aguilera G, Nikodemova M, Wynn P C, *et al*. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later[J]. Peptides, 2004, 25(3): 319 - 329.

[10] Grammatopoulos D K, Chrousos G P. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists[J]. Trends Endocrinol Metab, 2002, 13(10): 436 - 444.

[11] Slominski A, Pisarchik A, Tobin D J, *et al*. Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system[J]. Endocrinology, 2004, 145(2): 941 - 950.

[12] Charalampopoulos I, Androulidaki A, Minas V, *et al*. Neuropeptide urocortin and its receptors are expressed in rat Kupffer cells[J]. Neuroendocrinology, 2006, 84(1): 49 - 57.

(编辑　王　红)