论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0120-04

皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

周建云,蒋建新,杨 策,严 军,王海燕,刘 庆,程 英 (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 进一步明确天然糖皮质激素对巨噬细胞免疫功能的影响及其时效和量效关系。方法 收集大鼠腹腔巨噬细胞,分别用10~1 000 ng/ml的皮质酮(corticosterone, CORT)刺激,检测细胞的黏附、趋化和吞噬功能;使用ELISA试剂盒检测细胞培养上清中TNF-α的含量。结果 50 ng/ml的皮质酮显著增强巨噬细胞的黏附功能($P<0.05$),10 ng/ml和50 ng/ml的皮质酮刺激细胞后,其趋化功能均显著增加($P<0.05$)。同时,50 ng/ml的皮质酮还可显著增强巨噬细胞的吞噬功能($P<0.05$)和促进巨噬细胞分泌TNF-α($P<0.01$),而使用高浓度皮质酮(500 ng/ml和1 000 ng/ml)处理时,巨噬细胞的上述功能增强趋势减弱或无增强;在0.5~5 h范围内,皮质酮处理1 h时细胞的吞噬功能和分泌TNF-α的功能增强最明显,刺激更长时间后其功能的增强趋势逐渐减弱。结论 一定剂量的天然糖皮质激素急性刺激可明显增强免疫功能。

关键词:皮质酮;巨噬细胞;免疫
中图法分类号:R392.12;R967;R977.11 文献标识码:A

Effect of corticosterone on functions of rat peritoneal macrophages

ZHOU Jian-yun, JIANG Jian-xin, YANG Ce, YAN Jun, WANG Hai-yan, LIU Qing, CHENG Ying (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 effect of endogenous glucocorticoids on the immune function of macrophages and their dose-effect or time-effect relationship. Methods The peritoneal macrophages obtained from male SD rats were stimulated with corticosterone (10, 50, 100, 500, 1000 ng/ml) for different time period. Then the innate immunity of macrophages was evaluated, such as adherence, Chemotaxis, phagocytic capacity and the ability to secret TNF-α. Results Corticosterone (50 ng/ml) enhanced adherence and phagocytic ability of macrophages ($P<0.05$) and their ability to secret TNF-α ($P<0.01$). Corticosterone (10 ng/ml and 50 ng/ml) enhanced Chemotaxis of macrophages ($P<0.05$). When stimulated by 500 or 1000 ng/ml corticosterone, the immune function of macrophages was depressed or not influenced. Within the time period of stimulation from 0.5 to 5 h, the corticostetone treatment for 1 h could improve the phagocytic function and TNF-α secretion of peritoneal macrophages, but longer stimulation suppressed this effect. Conclusion Acute stimulation of endogenous glucocorticoids at a certain dosage can enhance the immune function.

Key words: corticosterone; macrophage; immunity

创伤应激是创伤早期机体的主要反应之一,创伤后机体免疫功能变化和炎症反应是创伤后全身性损害以及各种并发症发生、发展的病理生理基础[1]。神经内分泌系统和免疫系统关系密切,但是关于神经内分泌对免疫的调控多数是基于免疫激活状态下大剂量的人工合成类激素的抑制作用,而创伤早期无免疫刺激状态下内源性激素对免疫的调控作用少见报道。下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)是创伤应激中兴奋的主要神经内分泌轴,糖皮质激素是HPA轴的主要效应激素。天然免疫系统在机体的防御反应和维持内环境稳定中起到非常重要的作用,因此本研究通过体外实验模型,检测皮质酮对

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522602);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(06G080)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522602) and the "Eleventh Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (06G080)
作者简介:周建云,男,江西省高安县人,硕士研究生,主要从事创伤早期救治方面的研究。电话:(023)66253893
通信作者:蒋建新,电话:(023)68757401,E-mail:hellojjx@126.com
收稿日期:2007-06-01;修回日期:2007-09-21

大鼠腹腔巨噬细胞天然免疫功能的影响及其量效和时效关系,初步探讨创伤早期出现感染前应激性糖皮质激素对免疫功能的影响,并深化对创伤早期机体病理生理变化规律的认识。

1　材料与方法

1.1　材料

成年雄性 SD 大鼠 108 只(体质量 220 ~ 250 g),购自大坪医院野战外科研究所实验动物中心。实验前禁食,自由饮水。RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司(USA),胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自民海生物,皮质酮和 f-met-leu-phe(FMLP)购自 Sigma(USA),TNF-α 检测用 ELISA 试剂盒购自 R&D Systems (USA),Sysmex F-820 细胞计数仪为 SYSMEX 公司(日本),趋化小室购自 Neuro Probe(USA),5 μm 孔径趋化滤膜为 Millipore 公司(USA),表达红色荧光蛋白的大肠杆菌为本实验室制作。

1.2　腹腔巨噬细胞的分离、培养

大鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, PMφ)的分离、培养参照 Chou 等[2]的方法,略有改进。每批取 4 只雄性 SD 大鼠,肌肉注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,消毒腹部皮肤后向腹腔注射 40 ml 预冷的 PBS,按摩 1 ~ 2 min 后,打开腹腔回抽灌注液(可回抽 35 ml 左右),以 4 ℃ 300 × g 离心 10 min,用 RPMI1640 完全培养基(含 10% FBS,20 mmol/L 谷氨酰胺,100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)重悬,混和收集的细胞后按照 2×10^6/孔接种至 24 孔板,5% CO_2,饱和湿度,37 ℃ 培养箱培养 2 h 后,用预温的 D-Hanks 液轻轻洗涤细胞 2 次以纯化巨噬细胞。经 Wright 染色证明 90% 以上为巨噬细胞,台盼蓝染色显示细胞活率超过 95%。纯化细胞后每孔准确加入 1 ml RPMI1640 完全培养基培养过夜。

1.3　巨噬细胞黏附功能的检测

参照 Garcia 等[3]的方法,略有改变。用 RPMI1640 完全培养基将所收集的腹腔细胞调整细胞数至 1.5×10^6 ml^{-1},每管 500 μl 加入 1.5 ml EP 管内,然后分别加入 20 μl 不同工作浓度的皮质酮,以达到对应的终浓度(10、50、100、500 ng/ml),培养基作为阴性对照(各浓度设 3 个重复管),EP 管置 37 ℃ 水浴摇床分别振荡培养 10、30 min 和 60 min,各时间点分别取 100 μl 细胞悬液,用细胞计数仪检测细胞密度。黏附功能以黏附指数(adherence index, AI)表示,AI 计算公式为:AI = 100 - (某时间点悬液中细胞密度/初始细胞密度) × 100。

1.4　巨噬细胞趋化功能的检测

参照 De-la-Fuente 等[4]的方法,用 RPMI1640 完全培养基将所收集的腹腔细胞调整细胞数至 5×10^6 ml^{-1}。向 Neuro Probe 趋化小室下板每孔加入 28 μl 10^{-7} mol/L FMLP 作为巨噬细胞趋化因子,趋化小室上下板间隔以趋化滤膜,上室每孔加入 50 μl 含有不同终浓度皮质酮(10、50、100、1 000 ng/ml)的细胞悬液,以普通培养基为对照(每批实验各浓度设 3 个复孔,共重复 4 次)。趋化小室置 5% CO_2,饱和湿度,37 ℃ 培养箱 2 h 后,取出滤膜,经过刮膜、干燥、固定、染色处理步骤后,显微镜观察计数,趋化结果以趋化指数(chemotactic index, CI)表示。CI 以 100 倍镜下 3 个视野中穿膜巨噬细胞数目的平均值反映。

1.5　巨噬细胞吞噬功能的检测

参照 Alvarez 等[5]的方法,向过夜培养的巨噬细胞中加入不同终浓度的皮质酮(10、50、100、500、1 000 ng/ml),以培养基作为对照(每批次各浓度设 3 个复孔,重复 3 次)。5% CO_2,饱和湿度,37 ℃ 培养箱内处理相应时间后,收集培养上清至 1.5 ml EP 管,置 -80 ℃ 冰箱保存;细胞用预温的 D-Hanks 液轻轻洗涤细胞两次后,然后每孔准确加入 0.5 ml RPMI1640 完全培养基以及 50 μl 细胞数为 $2 \times 10^8 ml^{-1}$ 的表达有红色荧光蛋白的大肠杆菌,吞噬 30 min,弃上清并空干,预温的 PBS 洗涤细胞 5 次,4% 多聚甲醛固定后,以激发波长 488 nm,检测波长 568 nm 进行激光共聚焦显微镜观察并照片,每孔 5 个视野。细胞内有红色荧光信号的巨噬细胞视为吞噬了细菌的细胞,细胞的吞噬功能以吞噬指数(phagocytic index, PI)和吞噬率(phagocytic rate, PR)表示[4, 5]:吞噬率 = 100 个巨噬细胞中吞噬了大肠杆菌的细胞数目/100;吞噬指数 = 100 个巨噬细胞中吞噬了的大肠杆菌总数/100

1.6　培养上清 TNF-α 浓度的检测

按照 ELISA 试剂盒操作说明书步骤,每个样本取 100 μl,检测激素刺激后巨噬细胞培养上清中 TNF-α 的浓度。

1.7　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行统计分析,黏附、趋化、TNF-α 和吞噬功能的量效关系结果数据采用单因素方差分析方法分析,吞噬功能和 TNF-α 分泌的时效关系数据采用独立样本的 t 检验。

2　结果

2.1　皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞黏附功能的影响

不同浓度皮质酮处理大鼠腹腔巨噬细胞在 10、30 min 和 60 min 后,细胞的黏附指数随时间的延长而增加。在各个时间点,10 ~ 500 ng/ml 皮质酮可增强细胞的黏附功能,其中 50 ng/ml 皮质酮处理后细胞黏附功能达到峰值,并且 50 ng/ml 皮质酮处理后细胞在 10 min 和 30 min 的黏附指数显著高于对照,但是在 60 min 时,各处理组间无显著差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1　不同浓度皮质酮刺激对巨噬细胞黏附功能的影响

组别	黏附时间(min)		
	10	30	60
对照组	38.6 ± 3.5	50.0 ± 7.1	57.4 ± 6.6
皮质酮 10 ng/ml	42.3 ± 7.1	55.5 ± 8.9[a]	61.5 ± 9.8
50 ng/ml	45.4 ± 8.5[a]	55.9 ± 8.4[a]	61.8 ± 11.6
100 ng/ml	43.3 ± 6.7	53.3 ± 8.2	58.7 ± 9.7
500 ng/ml	43.7 ± 8.2	51.6 ± 10.2	59.0 ± 10.1

a: $P < 0.05$,与对照组比较

2.2　皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞趋化功能的影响

不同浓度皮质酮处理巨噬细胞后,随着皮质酮刺激浓度的增加 10 ~ 1 000 ng/ml,细胞趋化指数先升高后降低,在 50 ng/ml 时达到峰值。实验中各浓度皮质酮处理后细胞的趋化指数均高于对照组,其中 10 ng/ml 和 50 ng/ml 皮质酮处理后细胞趋化指数显著增加($P < 0.05$)。

2.3 皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

50 ng/ml 皮质酮处理巨噬细胞 1 h 后，细胞的吞噬指数和吞噬率均显著增加（$P<0.01$），而延长处理时间（处理 2～5 h）后，与对照组相比其增强趋势反而减弱，甚至无显著差异（$P>0.05$），见表 2。

表 2 50 ng/ml 皮质酮对巨噬细胞吞噬功能影响的时效关系

处理时间	吞噬指数		吞噬率	
	对照组	皮质酮	对照组	皮质酮
0.5 h	1.30±0.19	1.73±0.47[a]	0.39±0.07	0.40±0.08
1 h	1.31±0.31	1.82±0.54[a]	0.40±0.09	0.51±0.08[a]
2 h	1.35±0.21	1.39±0.25	0.42±0.09	0.51±0.12
3 h	1.30±0.25	1.34±0.27	0.44±0.11	0.49±0.11
5 h	1.32±0.23	1.35±0.27	0.40±0.08	0.41±0.08

a：$P<0.01$，与对照组比较

不同浓度皮质酮（10～1 000 ng/ml）处理 1 h 后，细胞的吞噬指数和吞噬率均增加，其中吞噬指数以 50 ng/ml 皮质酮处理时达到峰值，显著高于对照（$P<0.01$），并且此时细胞的吞噬率也显著增加（$P<0.01$）；但是使用更高浓度皮质酮处理后，细胞吞噬指数和吞噬率均逐渐降低（表 3）。

表 3 皮质酮对巨噬细胞吞噬功能影响的量效关系

组别	吞噬指数	吞噬率
对照组	0.40±0.09	1.31±0.31
皮质酮 10 ng/ml	0.54±0.09[a]	1.52±0.21[b]
50 ng/ml	0.51±0.08[a]	1.82±0.54[a]
100 ng/ml	0.46±0.12[b]	1.49±0.22[b]
500 ng/ml	0.45±0.08	1.41±0.22
1 000 ng/ml	0.43±0.11	1.39±0.29

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较

2.4 皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响

50 ng/ml 和 100 ng/ml 皮质酮处理巨噬细胞 1 h 后，培养上清 TNF-α 浓度显著高于对照组，其中又以 50 ng/ml 处理后最高，而继续增加激素浓度后 TNF-α 浓度逐渐降至基础水平。在使用 50 ng/ml 皮质酮处理不同时间后（0.5～5 h），0.5 h 和 1 h 组显著高于对照（$P<0.05$），继续延长处理时间后，TNF-α 浓度增加趋势减弱，与对照组无差异（$P>0.05$）（表 4，5）。

表 4 皮质酮对巨噬细胞分泌 TNF-α 影响的时效关系（pg/ml）

组别	0.5 h	2 h	3 h	5 h
对照组	218.3±52.1	208.6±67.2	212.3±55.3	201.3±31.3
50 ng/ml	282.0±44.9[b]	284.5±66.8	267.8±51.9	288.3±101.9

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与对照组比较

表 5 皮质酮处理 1 h 对巨噬细胞分泌 TNF-α 影响的量效关系（pg/ml）

组别	TNF-α 浓度
对照组	215.4±54.6
皮质酮 10 ng/ml	264.7±50.1
50 ng/ml	309.8±51.9[a]
100 ng/ml	282.9±45.0[b]
500 ng/ml	247.3±50.6
1 000 ng/ml	222.8±50.0

3 讨论

应激即神经内分泌反应，是随创伤发生而即刻出现的一种机体反应[1]，是引起机体内环境和免疫功能变化的原因之一。神经内分泌系统与免疫系统关系密切，但是过去研究主要探讨感染等免疫因素刺激情况下神经内分泌反应的反馈调控作用，关于神经内分泌反应对无感染情况下免疫功能的影响尚少见报道[6]。因为 HPA 轴以及糖皮质激素分别是创伤应激中的主要神经内分泌轴和内分泌激素，通过检测天然糖皮质激素对非激活状态下机体免疫功能的影响，可在一定程度上反映创伤早期神经内分泌对机体免疫功能调控的方式，深化对创伤早期机体病理生理变化的认识。本研究通过使用一定浓度范围（10～1 000 ng/ml）的皮质酮刺激大鼠腹腔巨噬细胞后显示，50 ng/ml 的皮质酮可显著增强其免疫功能，并且这种作用在 1 h 左右最强。

大鼠内源性的天然糖皮质激素为皮质酮，其生理剂量约为 35 ng/ml[7]，在应激状态下其水平升高。本研究选用 10～1 000 ng/ml 的皮质酮主要是为了观察生理状态及不同应激状态下皮质酮的免疫调控作用。50 ng/ml 相当于适度应激下机体皮质酮水平，此浓度皮质酮刺激可显著增强巨噬细胞免疫功能，这在一定程度上解释了急性适度应激下机体免疫力增强的原因[8,9]。糖皮质激素出现免疫抑制作用的浓度往往高于 10^{-6} mol/L（500 ng/ml）[10]，实验对象常合并感染或 LPS 等免疫激活剂的刺激，并且使用的多数为人工合成类激素，而它们具有特殊的代谢动力学，在体内很少与血浆蛋白结合而绝大多数为具有活性的游离状态，但天然糖皮质激素则 90% 以上与血浆蛋白结合而无活性；另外人工合成类激素与糖皮质激素受体的亲和力也高于天然激素[7]，这也是本研究中 1 000 ng/ml 的皮质酮也没有出现免疫抑制作用的主要原因，文献[11]报道甚至使用 2 000 ng/ml 的皮质酮时小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能仍不被抑制。

黏附、趋化和吞噬颗粒是巨噬细胞吞噬过程的重要组成[12]。黏附是巨噬细胞发挥吞噬的第 1 步，50 ng/ml 皮质酮可显著促进巨噬细胞在 10 min 和 30 min 的黏附功能，但是在培养 60 min 后，由于大部分巨噬细胞都贴壁（巨噬细胞占所收集的总腹腔细胞的 60% 左右[13]），各组之间差异缩小。我们的结果显示 50 ng/ml 皮质酮处理后，可显著增强巨噬细胞的趋化作用。巨噬细胞对细菌的吞噬能力可以通过其吞噬指数和吞噬率来反映[14]，实验结果显示，50 ng/ml 的皮质酮可同时增强细胞的吞噬指数和吞噬率，这种一致性的变化更有力地说明了该浓度的皮质酮可显著增强巨噬细胞的吞噬功能。

TNF-α 是一种重要的细胞因子，在机体的免疫反应中起着重要的作用。巨噬细胞被激活后，通过分泌

TNF-α 等细胞因子,来杀灭外来细菌和自身受感染的细胞,最终达到保护机体的目的。本实验结果显示,使用 50 ng/ml 的皮质酮刺激可显著促进大鼠腹腔巨噬细胞 TNF-α 的分泌。有研究显示 35 ng/ml 的皮质酮可激活核因子 κB(NF-κB)[7],而 TNF-α 是 NF-κB 的主要下游激活分子,这与我们的结果吻合。

使用 50 ng/ml 皮质酮处理腹腔巨噬细胞不同时间,发现其免疫功能随刺激时间变化而改变。本研究结果显示巨噬细胞吞噬功能和分泌 TNF-α 的功能在 50 ng/ml 皮质酮处理后均增强,但是以 1 h 增强最显著。有研究表明急性应激后小鼠免疫功能增强,但是慢性应激时其免疫功能被抑制[9],这说明皮质酮的免疫调控作用还受时间的影响。

总之,本实验通过体外模型检测皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞黏附、趋化、吞噬和分泌 TNF-α 功能的影响及其量效和时效关系,说明无免疫刺激条件下一定剂量的天然糖皮质激素急性刺激可显著增强免疫功能,初步反映创伤早期适度的创伤应激可提高机体的免疫力。

参考文献:

[1] 蒋建新, 粟永萍, 黄跃生, 等. 严重创伤后早期全身性损害基础研究的现状与展望. 中华创伤杂志, 2002, 18(4): 197 - 199.

[2] Chou R C, Dong X L, Noble B K, *et al*. Adrenergic regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha generation during a chronic polyarthritis pain model[J]. J Neuroimmunol, 1998, 82(2): 140 - 148.

[3] Garcia J J, del-Carmen-Saez M, De-la-Fuente M, *et al*. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxyphenyl-glycol. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 254(1 - 2): 299 - 304.

[4] De-la-Fuente M, Del-Rio M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions[J]. J Neuroimmunol, 2001, 116(2): 156-167.

[5] Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, *et al*. Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals[J]. Nutrition, 2006, 22(9): 913 - 921.

[6] 王正国,蒋建新. 创伤医学[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(24): 1704 - 1706.

[7] Smyth G P, Stapleton P P, Freeman T A, *et al*. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages[J]. J Surg Res, 2004, 116(2): 253 - 261.

[8] Dhabhar F S, Viswanathan K. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289(3): R738 - R744.

[9] Dhabhar F S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 917: 876 - 893.

[10] Schuld A, Birkmann S, Beitinger P, *et al*. Low doses of dexamethasone affect immune parameters in the absence of immunological stimulation[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006, 114(6): 322 - 328.

[11] BARRIGA C, Martin M I, ORTEGA E, *et al*. The effect of melatonin and corticosterone on the phagocytic function of BALB/c mice macrophages[J]. Biogenic Amines, 2003, 18(2): 107 - 116.

[12] De-la-Fuente M, Del-Rio M, Ferrandez M D, *et al*. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C[J]. Immunology, 1991, 73(2): 205 - 211.

[13] Asfora K K, Santos-Mdo C, Montes M A, *et al*. Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of the adherence capacity and morphology of macrophages [J]. J Dent, 2005, 33(2): 155 - 162.

[14] Victor V M, Rocha M, De-la-Fuente M. Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 97 - 106.

(编辑　张大春)

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部