论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1278-03

去甲肾上腺素对脂多糖诱导的巨噬细胞活化的影响

周建云,周琳琳,严 军,杨 策,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,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 检测去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的腹腔巨噬细胞活化的影响,并探讨其可能的分子机制。**方法** 收集大鼠腹腔巨噬细胞,分别用不同浓度(2~100 ng/ml)NE预处理1 h或以10 ng/ml NE分别预处理0.5~5 h后,再用LPS刺激1h,分别检测巨噬细胞吞噬功能和分泌TNF-α能力;RT-PCR法检测其CD14、清道夫受体(scavenger receptor, SR)和TLR4表达水平。**结果** 低浓度(2~10 ng/ml)NE显著促进LPS诱导的巨噬细胞吞噬和分泌TNF-α,而更高浓度(50~100 ng/ml)对此无作用;时效作用方面,NE处理1 h对LPS诱导的TNF-α分泌促进作用最明显。同时,低浓度(2~10 ng/ml)NE促进巨噬细胞CD14和SR的表达,更高浓度对其表达无影响;各浓度NE对TLR4表达水平无影响。**结论** 一定浓度NE可增强LPS对巨噬细胞的活化,并且此过程与巨噬细胞CD14和SR表达水平升高有关。

关键词: 去甲肾上腺素;巨噬细胞;吞噬;LPS;TNF-α;CD14;SR;TLR4
中图法分类号: R392.12; R392.3; R977.11 **文献标识码:** A

Effects of norepinephrine on the activation of LPS-induced macrophages

ZHOU Jian-yun, ZHOU Lin-lin, YAN Jun, YANG Ce, 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 observe the effects of norepinephrine on the activation of macrophages induced by LPS and to explore its possible molecular mechanisms. Methods The peritoneal macrophages collected from male SD rats were pretreated by norepinephrine at different concentrations for 1 h, or norepinephrine at the dose of 10 ng/ml for a period ranging from 0.5 h to 5 h, and then treated by LPS for another 1 h. The phagocytic capacities and TNF-α secretion abilities of macrophages were measured. The CD14, SR, and TLR4 mRNA expression levels were evaluated by semi-quantitative RT-PCR. Results Norepinephrine at low concentrations (2 ng/ml ~ 10 ng/ml) predominantly enhanced the phagocytic capacities and the TNF-α secretion abilities of peritoneal macrophages induced by LPS, but it had no effects on these functions at higher concentrations (50 ng/ml ~ 100 ng/ml). Besides, norepinephrine at low concentrations improved CD14 and SR mRNA expression levels of peritoneal macrophages, but it had no effects at higher concentrations. Further more, norepinephrine had no effects on TLR4 mRNA expression at the observed concentrations. Conclusion Norepinephrine at a suitable concentration can enhance the activation of macrophages induced by LPS, which may be associated with the elevated expressions of CD14 and SR mRNA.

Key words: norepinephrine; macrophage; phagocytosis; LPS; TNF-α; CD14; SR; TLR4

巨噬细胞是机体重要免疫细胞,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的巨噬细胞活化在严重感染时机体内环境紊乱中起到关键作用。去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)是交感-肾上腺髓质轴重要神经内分泌激素,业已有研究表明,NE对巨噬细胞功能具有重要调控作用[1]。然而,NE对LPS活化巨噬细胞的影响鲜见文献报道。模式识别受体在识别细菌各成分及介导效应细胞活化方面发挥关键作用,其表达水

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G080)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522602) and the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (06G080)
作者简介:周建云,男,江西省高安市人,硕士,研究实习员,主要从事创伤早期救治方面的研究,现在本校科研部工作。电话:(023)68752180
通信作者:蒋建新,电话:(023)68757401,E-mail:hellojjx@126.com
收稿日期:2008-09-27;修回日期:2008-11-15

平影响效应细胞对 LPS 的反应性[2]。为此,本研究观察了 NE 对 LPS 活化巨噬细胞的影响,并初步探讨其与模式识别受体表达水平变化的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　成年雄性 SD 大鼠(体质量 220 ~ 250 g)100 只,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.1.2　主要试剂　　RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司(USA),新生小牛血清(new calf serum, NCS)购自民海生物,NE 购自 Sigma(USA),TNF-α 检测用 ELISA 试剂盒购自 R&D Systems (USA),RNA 提取试剂购自 Roche(USA),逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司,2 × *Taq* MasterMix 购自 TIANGEN。

1.2　实验方法

1.2.1　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[3]的方法。每批取 4 只雄性 SD 大鼠,混合收集的细胞后按照 2×10^6/ml 的细胞数接种至孔板,2 h 后洗涤纯化巨噬细胞,经 Wright's 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%。

1.2.2　巨噬细胞吞噬功能的检测　　分别使用 2 ~ 100 ng/ml NE 预刺激接种在 24 孔板内的巨噬细胞 1 h,再用 10 ng/ml LPS 继续刺激 1 h,以单纯 LPS 处理为对照。按照细菌:细胞为 10∶1 的比例加入表达有红色荧光蛋白的大肠杆菌(第三军医大学免疫研究所万瑛教授惠赠),吞噬 30 min,激光共聚焦显微镜观察计数,分别计算其吞噬率(phagocytic rate)和吞噬指数(phagocytic index,PI)。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。

1.2.3　TNF-α 浓度的检测　　分别使用 2 ~ 100 ng/ml NE 预刺激接种在 24 孔板内的巨噬细胞 1 h,或以 10 ng/ml NE 分别预处理 0.5 ~5 h,经 10 ng/ml LPS 继续刺激 1 h 后收集细胞培养上清,以 10 ng/ml LPS 单独处理为对照组。按照 ELISA 试剂盒操作说明检测其 TNF-α 浓度。

1.2.4　巨噬细胞 CD14、SR 和 TLR4 mRNA 表达　　分别使用 2 ~ 100 ng/ml NE 刺激按照 2×10^6/孔接种在 6 孔板内的巨噬细胞 1 h,以无激素处理为对照。提取总 RNA 后,RT-PCR 反应体系按逆转录试剂盒说明进行。根据 GenBank 设计引物,由上海生工合成。引物序列:CD14 上游引物:5′-CGCTCAATCTATCTTTCACTGGG-3′,下游引物:5′-GCCATCTTGATTGTCCTTCCTTA-3′,产物长度 388 bp。SR 上游引物:5′-GTCGGGCAAACAGGGAAGAT-3′,下游引物:5′-CTGCGAGCCCTTTTTACTACCA-3′,产物长度 249 bp。TLR4 上游引物:5′-CATCAGTGTATCGGTGGTCAGTGT-3′,下游引物:5′-GGGCACTCCTTCTTCTAAATTCTT-3′,产物长度 205 bp。扩增条件:CD14 为 94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,27 个循环。SR 为 94 ℃ 变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,33 个循环。TRL4 为 94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,35 个循环。RT-PCR 产物定量:取上述反应管中 RT-PCR 产物各 5 μl,同时在另一样孔上 DNA 标准。琼脂糖凝胶浓度为 2%,以 0.5 × TBE 为电泳缓冲液,恒压 5 V/cm,30 min。电泳结束后,将电泳凝胶置于 GelDoc2000 型凝胶图像分析系统中进行紫外扫描并图像分析。以目的产物电泳带面积吸光度与内参照 GAPDH 的电泳带面积吸光度比值作为相对表达值。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　NE 对 LPS 处理后巨噬细胞吞噬功能的影响

10 ng/ml NE 显著促进 LPS 处理后巨噬细胞吞噬率($P < 0.01$),更高浓度(50 ~ 100 ng/ml)则对其无明显作用;低浓度(2 ~ 10 ng/ml)NE 对 LPS 处理后巨噬细胞吞噬指数具有一定的增强趋势,但是高浓度(50 ~ 100 ng/ml)无此作用(表 1)。

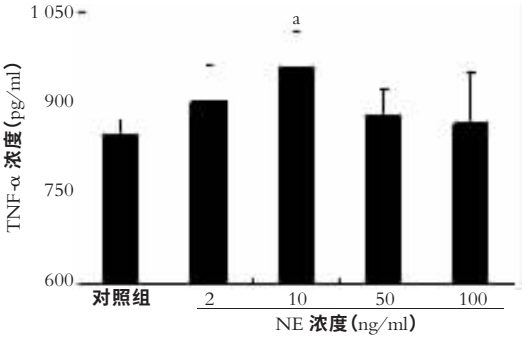
表 1　NE 对 LPS 处理后巨噬细胞吞噬功能的影响

组别	吞噬指数	吞噬率
对照组	1.19 ± 0.09	0.29 ± 0.07
NE 处理组		
2 ng/ml	1.23 ± 0.08	0.28 ± 0.09
10 ng/ml	1.32 ± 0.07[a]	0.40 ± 0.09[a]
50 ng/ml	1.24 ± 0.06	0.32 ± 0.03
100 ng/ml	1.19 ± 0.07	0.27 ± 0.04

a:$P < 0.01$,与对照组比较

2.2　NE 对 LPS 诱导的 TNF-α 分泌的影响

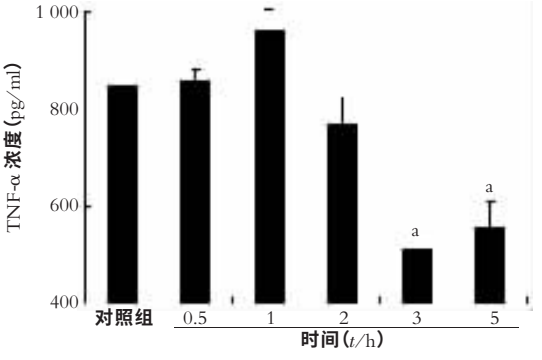
分别以 2、10、50 ng/ml 和 100 ng/ml NE 预处理巨噬细胞 1 h,其中 10 ng/ml NE 可显著促进 LPS 诱导的 TNF-α 分泌($P < 0.01$),而更高浓度对 LPS 诱导的 TNF-α 分泌无显著影响(图 1)。



a:$P < 0.01$,与对照组比较

图 1　NE 对 LPS 诱导的 TNF-α 分泌影响的量效关系

10 ng/ml NE 分别预处理巨噬细胞 0.5 ~5 h,在 1 h 内可一定程度促进 LPS 诱导的 TNF-α 分泌,更长时间则对 LPS 引起的 TNF-α 分泌产生抑制作用(图 2)。



a:$P < 0.05$,与对照组比较

图 2　NE 对 LPS 诱导的 TNF-α 分泌影响的时效关系

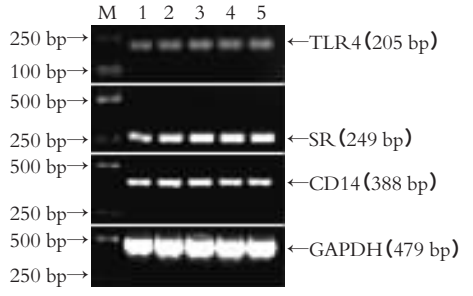
2.3 NE 对巨噬细胞 CD14、SR 和 TLR4 mRNA 表达的影响

10 ng/ml NE 处理大鼠腹腔巨噬细胞 1h 可显著促进其 CD14 和 SR mRNA 的表达($P<0.01$,$P<0.05$),更高浓度 NE 对 CD14 和 SR mRNA 的表达无显著影响($P>0.05$);各浓度 NE 处理对 TLR4 mRNA 的表达均无显著影响(表2,图3)。

表2 NE 对巨噬细胞 CD14、SR 和 TLR4 mRNA 表达的影响

组别	CD14	SR	TLR4
对照组	0.52±0.03	0.24±0.03	0.13±0.04
NE 处理组			
2 ng/ml	0.52±0.06	0.23±0.04	0.14±0.03
10 ng/ml	0.64±0.03[a]	0.32±0.04[b]	0.13±0.03
50 ng/ml	0.55±0.06	0.27±0.05	0.12±0.04
100 ng/ml	0.54±0.07	0.28±0.04	0.12±0.02

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较



M:DNA 标准;1:对照;2~5:分别为2、10、50、100 ng/ml NE

图3 NE 对巨噬细胞 CD14、SR 和 TLR4 mRNA 表达的影响

3 讨论

严重创伤后肠道等空腔脏器的革兰阴性细菌及其毒素移位是目前创伤脓毒症的主要感染来源。细菌内毒素是革兰阴性菌的主要致病毒素,在创伤后脓毒症的发病中发挥重要作用。在感染免疫防御反应中,巨噬细胞通过对 LPS 的识别而活化[4,5],吞噬杀菌活性和分泌细胞因子是其最基本的功能。本实验结果显示,一定浓度 NE 可明显促进 LPS 诱导的巨噬细胞吞噬和分泌 TNF-α 功能,高浓度则对其产生抑制作用。其他研究也证实,低浓度 NE 可促进 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 TNF-α 和 IL1 分泌[6],高浓度 NE 则抑制 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞多种因子的分泌[7]。本实验结果说明一定剂量 NE 可增强 LPS 对巨噬细胞的活化。

LPS 是革兰阴性细菌细胞壁的主要组成成分,对其识别与信号转导是机体自身防御反应的重要环节,其中模式识别受体介导的对 LPS 识别及跨膜信号转导位于整个信号转导通路的最上游,对其后所介导的细胞活化起决定性作用。LPS 首先被 CD14 识别[8],与 Toll 样受体(TLR)结合后将信号由细胞外传向细胞内[9],而清道夫受体(SR)是调控巨噬细胞清除内毒素、介导巨噬细胞宿主防御功能的重要受体[10]。为了初步分析模式识别受体在 NE 增强 LPS 活化巨噬细胞的作用,本实验检测了 NE 处理后模式识别受体表达情况,结果显示,一定剂量的 NE 可明显促进巨噬细胞 CD14 和 SR 表达。其他研究也证实,一定浓度的 NE[11]可促进 THP-1 细胞 SR 的表达。上述结果提示模式识别受体在一定程度上参与了 NE 对 LPS 激活巨噬细胞的调控过程。

综上所述,一定浓度(2~10 ng/ml)NE 能增强巨噬细胞对低浓度 LPS 刺激的反应性,其机制可能与上调细胞表面 CD14、SR 的表达有关,提示除免疫抑制作用外,早期一定程度的交感-肾上腺髓质轴兴奋尚可提高后期感染时机体免疫细胞的活化状态,这为临床上深入认识交感-肾上腺髓质轴反应对后期感染时机体免疫状态的影响,寻找更理想的感染防治措施提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] 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.

[2] Yang I A, Fong K M, Holgate S T, *et al*. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2006,6(1):23-28.

[3] 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.

[4] Schenk M, Mueller C. Adaptations of intestinal macrophages to an antigen-rich environment[J]. Semin Immunol, 2007, 19(2): 84-93.

[5] 吴丽娟, 刘国栋, 陈 伟, 等. 锌指蛋白 A20 对人单核细胞 LPS 应答的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007,29(14): 1388-1390.

[6] Engler K L, Rudd M L, Ryan J J, *et al*. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta[J]. J Neuroimmunol, 2005,160(1-2):87-91.

[7] Hu X X, Goldmuntz E A, Brosnan C F. The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation[J]. J Neuroimmunol, 1991,31(1):35-42.

[8] Tartakovsky B, Fried M, Bleiberg M, *et al*. An intracellular antigen that reacts with MO2, a monoclonal antibody to CD14, is expressed by human lymphocytes[J]. Immunol Lett, 2003, 85(1): 35-40.

[9] Singh S K, Girschick H J. Toll-like receptors in Borrelia burgdorferi-induced inflammation[J]. Clin Microbiol Infect, 2006,12(8):705-717.

[10] 杨 策, 蒋建新, 朱佩芳. 小鼠肺泡巨噬细胞清道夫受体和 CD14 表达与肺损伤的相关性研究(英文)[J]. 中国临床康复, 2005,9(6): 222-224.

[11] 肖 荣, 龙石银, 张彩平, 等. 去甲肾上腺素对 THP-1 源性巨噬细胞 SR-A1 和转化生长因子-β1 表达的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2007, 23(6): 460-464.

(编辑 王小寒)