论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2228-04

CRH对腹腔巨噬细胞分泌IL-10的影响及其信号机制

王伍超,陈金萍,张岫竹,代 维,刘大维,周继红 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军/重庆市交通医学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 研究促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing hormone,CRH)对大鼠腹腔巨噬细胞分泌白介素-10(interleukin-10,IL-10)的影响及其信号转导机制。**方法** 将原代培养的大鼠腹腔巨噬细胞分为正常对照组、CRH组、CP+CRH组、HL+CRH组、H89+CRH组以及PKAi+CRH组。其中正常对照组仅加入新鲜RPMI1640培养液2 ml;CRH处理组,加入含CRH终浓度为10^{-9} mol/L的培养液2 ml;后4组在分别用CRHR1选择性阻断剂CP-154526(5×10^{-4} mol/L)、CRHR1/2非选择性阻断剂α-helical CRH9-41(10^{-6} mol/L)、AC抑制剂H89(10^{-6} mol/L)和PKA抑制剂PKAi(6-22) amide(10^{-4} mol/L)预孵育2 h后,加入含终浓度为10^{-9} mol/L的CRH培养液,再分别加入CRH(终浓度为10^{9} mol/L)刺激。各组分别于CRH刺激后0.5、1、2、4、8 h收集培养皿中的上清液,应用ELISA方法检测IL-10的含量。**结果** 正常对照组巨噬细胞分泌IL-10的含量为(29.41±3.10) μg/g。CRH组IL-10含量呈现双峰,在1、4 h达到高峰,分别为(53.15±7.98)、(46.01±1.70)μg/g,与CRH组0.5 h相比差异均非常显著($P<0.01$),接近正常对照组的2倍($P<0.01$)。CP+CRH组与HL+CRH组IL-10含量在1、4 h均明显低于CRH组($P<0.01$),并接近正常对照组水平。但在8 h时明显增加,显著高于正常对照组($P<0.05$)和CRH组($P<0.05$)。且两组之间IL-10含量在0.5~4 h差异不显著,但在8 h时HL+CRH组显著低于CP+CRH组。H89预孵育后细胞IL-10含量在1、4、8 h显著下降,与CRH组比较差异显著($P<0.01$);在4、8 h低于正常对照组水平($P<0.05$)。PKAi(6-22) amide预孵育细胞后,IL-10含量在0.5~8 h下降,与正常对照组以及CRH组比较差异非常显著($P<0.01$)。**结论** CRH可通过CRHR1促进巨噬细胞分泌产生抗炎因子IL-10,其与cAMP/PKA信号通路密切相关。

关键词: 促肾上腺皮质激素释放激素;巨噬细胞;IL-10;CRHR;cAMP/PKA
中图法分类号: R392-33;R392.12;R977.11 **文献标识码:** A

Effects of corticotrophin-releasing hormone on IL-10 secretion from peritoneal macrophages and its signal mechanism

WANG Wu-chao, CHEN Jin-ping, ZHANG Xiu-zhu, DAI Wei, LIU Da-wei, ZHOU Ji-hong (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 effects of corticotrophin-releasing hormone (CRH) on production of interleukin-10 (IL-10) from macrophages and to further elucidate its signal transduction mechanism. **Methods** Rat peritoneal macrophages cultured were divided into 6 groups: control group, CRH group, CP+CRH group, HL+CRH group, H89+CRH group and PKAi+CRH group. The control group was cultured with 2 ml RPMI1640 medium. The CHR group was stimulated with 2 ml CRH at a final concentration of 10^{9} mol/L. The other four groups were respectively pretreated with CRHR1 antagonist CP154526 at 5×10^{-4} mol/L, CRHR1/2 nonselective antagonist α-helical CRH9-41 at 10^{-6} mol/L, AC inhibitor H89 compound at 10^{-6} mol/L or PKA inhibitor PKAi (6-22) amide (10^{-4} mol/L) for 2 h before stimulation with CRH. The concentration of IL-10 in the supernatant after stimulation for 0.5, 1, 2, 4 and 8 h were measured by ELISA method. **Results** In the normal control group, the average concentration of IL-10 kept at (29.41±3.10) μg/g. As macrophages exposed to CRH, the content of IL-10 increased quickly and reached its first peak at 1 h compared with that in

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522602)
作者简介: 王伍超,男,山东省单县人,博士研究生,医师,主要从事创伤应激及神经内分泌调控方面的研究。电话:(023)68757440,E-mail: wchao118@126.com
通信作者: 周继红,E-mail: Traumazjh@126.com
收稿日期: 2009-04-21;**修回日期:** 2009-05-20

CRH group at 0.5 h ($P<0.01$), nearly two folds of that in normal control group ($P<0.01$), then its level decreased by degrees. There existed a second peak of IL-10 expression at 4 h, which was significantly higher than that in CRH group at 0.5 h ($P<0.01$) and that in control group ($P<0.01$). The concentration of IL-10 in CP + CRH group and HL + CRH group at 1 and 4 h were significantly lower than that in CRH group ($P<0.01$), and were similar to that in control group ($P>0.05$). At 8 h, the concentration of IL-10 in the 2 groups were significantly higher than that in normal control group ($P<0.01$) or CRH group ($P<0.01$). There was no statistical difference of IL-10 concentration between CP + CRH group and HL + CRH group ($P>0.05$) at 0.5 to 4 h, however that in HL + CRH group was significantly lower than that in CP + CRH group at 8 h ($P<0.01$). Furthermore, pretreatment of macrophages with AC inhibitors H89 in H89 + CRH group induced a significant inhibition of the content of IL-10 cytokines at 1, 4 and 8 h, while the content of IL-10 cytokines at 4 and 8 h was lower than that in normal control group ($P<0.05$). After pretreated with PKAi (6-22) amide, the content of IL-10 was significantly inhibited during 0.5 to 8 h compared with that in CRH group or control group ($P<0.01$). **Conclusion** CRH increases IL-10 production by rat peritoneal macrophages through activating CRHR1, which involves in the intracellular cAMP/PKA signal pathway.

Key words: corticotrophin-releasing hormone; macrophage; IL-10; CRHR; cAMP/PKA

促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing hormone,CRH)在直接巨噬细胞激活和细胞因子产生层面上可直接影响免疫系统。前期研究证实 CRH 在正常大鼠腹腔巨噬细胞有表达,并且脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激后明显上调[1]。巨噬细胞表达有 G 蛋白相偶联的跨膜 CRH 受体(CRH receptors,CRHR),主要有 2 种类型(CRHR1 与 CRHR2)。CRH 通过与其受体结合并激活 G 蛋白偶联信号通路介导多种不同的生物学效应[2]。本研究旨在探讨 CRH 是否对巨噬细胞天然分泌 IL-10 具有调节作用及其可能机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和材料

RPMI1640 培养基、L-谷氨酰胺购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,台盼蓝、synthetic human/rat CRH 购自 Sigma 公司,戊巴比妥钠购自 SERVA 公司, H89、PKAi (6-22) amide、α-helical CRH9-41 购自美国 Calbiochem 公司,CP-154526 购自美国 Pfizer Inc 公司,IL-10 ELISA 检测试剂盒购自美国 Pierce Chemical 公司。健康雄性成年 Wistar 大鼠(购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心)体质量 200 ~ 220 g,实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.2　大鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

参照文献[3]方法,无菌分离培养腹腔内巨噬细胞。主要步骤:3.0% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)肌肉注射将大鼠麻醉并固定,腹膜腔内注入 4 ℃ 20 ml 冰冷的 D-Hanks 应用液,按摩 2 min 后在腹部沿腹白线剪开约 1 cm,收集腹腔灌洗液,离心 1 200 r/min × 5 min。弃上清,应用 RPMI1640 培养液(含 10% FBS、10 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素/链霉素)吹打重悬,接种于 35 mm 培养皿内,于 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养 2 h,洗去未粘附细胞,0.25% 胰酶消化,用 RPMI1640 调整细胞数为 5×10^6 ml^{-1},所得细胞经台盼蓝拒染实验证实活细胞比例 > 98%,且绝大部分表现出典型的巨噬细胞形态学特征。置于 37 ℃、5% CO_2 细胞孵箱中继续培养 20 ~ 22 h 待用。

1.3　实验分组

将原代培养细胞分成 6 组,包括正常对照组、CRH 组、CP + CRH 组、HL + CRH 组、H89 + CRH 组以及 PKAi + CRH 组。其中正常对照组,仅加入新鲜 RPMI1640 培养液 2 ml;CRH 组加入含 CRH 终浓度为 1×10^{-9} mol/L 的培养液 2 ml;后 4 组分别用 CRHR1 选择性阻断剂 CP-154526 (5×10^{-4} mol/L)、CRHR1/2 非选择性阻断剂 α-helical CRH9-41 (1×10^{-6} mol/L)、腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂 H89 (10^{-6} mol/L) 和蛋白激酶 A (protien kinase A, PKA) 抑制剂 PKAi (6-22) amide (1×10^{-4} mol/L) 预孵育 2 h 后,再分别加入 CRH 刺激(终浓度为 10^{-9} ml/L)。各组分别于 CRH 刺激后 0.5、1、2、4、8 h 收集培养皿中的上清液,每个时相点收集 6 份标本。离心 10 000 × g,10 min,取上清液分装并置于 -70 ℃ 超低冰箱内保存,待进行下一步实验。

1.4　IL-10 含量检测

将上清液总蛋白含量进行 Folin-酚蛋白定量分析,然后按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测波长 550 nm 处的吸光度值[$D(550)$],并通过标准曲线的直线回归方程式计算各样品的 IL-10 的相对含量(μg/g)。

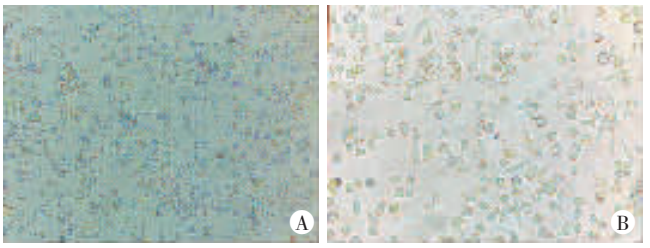
1.5　统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组各时相点之间以及同一时相点每组之间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠腹腔巨噬细胞原代培养

通过倒置显微镜观察到细胞多数呈圆形或椭圆形,折光性好,部分呈现扁平梭形,伸展并牢固粘附在培养瓶表面。台盼蓝拒染显示细胞成活率在 98% 以上。见图 1。



A：正常细胞（×100）；B：台盼蓝拒染实验（×200）

图1 大鼠腹腔巨噬细胞原代培养 （倒置相差显微镜）

2.2 CRH 对巨噬细胞 IL-10 分泌的影响

正常对照组巨噬细胞分泌 IL-10 在 0.5～8 h 有所波动，但是相互之间差异不显著（$P>0.05$），含量维持在（29.41±3.10）μg/g。CRH 组 0.5 h 的 IL-10 含量与正常对照组接近（$P>0.05$）。CRH 组 1 h 的 IL-10 达到高峰，与 CRH 组 0.5 h 以及正常对照 1 h 组比较差异非常显著（$P<0.01$）。CRH 组 2 h 明显回落，与 CRH 组 1 h 比较差异显著（$P<0.01$），并低于正常对照组（$P<0.05$）。接着在 4 h 后出现第 2 个高峰，与 CRH 组 0.5 h 以及正常对照组比较，差异非常显著（$P<0.01$），8 h 后回落至正常对照组的水平（表 1）。

表1 CRH 以及联合各种拮抗剂预处理后对巨噬细胞分泌 IL-10 的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，μg/g）

组别	孵育时间				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
正常对照组	22.06±0.94	29.35±0.15	30.38±3.25	33.03±7.88	32.27±3.46
CRH 组	22.48±2.05	53.15±7.98^{bc}	26.87±1.70^{ad}	46.01±1.61^{bc}	29.3±5.28^{ad}
CP+CRH 组	19.22±3.56	30.11±4.11^{d}	30.91±8.10	36.36±8.10^{e}	55.41±5.06^{bf}
HL+CRH 组	26.26±3.01	29.19±3.94^{d}	28.36±5.02	30.35±3.46^{e}	38.83±7.44^{afg}
H89+CRH 组	22.94±2.93	35.01±9.07^{d}	31.88±2.11	28.18±5.02^{ae}	22.32±1.31^{af}
PKAi+CRH 组	6.45±0.20^{bch}	0.83±0.63^{bdh}	12.21±2.24^{bh}	20.27±2.42^{beh}	10.12±5.02^{bfh}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.01$，与 CRH 组 0.5 h 比较；d：$P<0.01$，与 CRH 组 1 h 比较；e：$P<0.01$，与 CRH 组 4 h 比较；f：$P<0.01$，与 CRH 组 8 h 比较；g：$P<0.01$，与 CP+CRH 组 8 h 比较；h：$P<0.05$，与 H89+CRH 组比较

2.3 阻断 CRH 受体在 CRH 调节巨噬细胞分泌 IL-10 中的作用

CP+CRH 组与 HL+CRH 组中的 IL-10 含量在 0.5、2 h 与 CRH 组相应时相点比较，差异不显著（$P>0.05$）。在 1 h 时这 2 组的 IL-10 的含量分别与 CRH 组 1 h 比较，降低均非常显著（$P<0.01$），接近正常对照组水平（$P>0.05$）。在 CP+CRH 组 4 h 中 IL-10 的含量与 CRH 组比较下降明显（$P<0.05$），亦接近正常对照组水平（$P>0.05$）；HL+CRH 组 4 h 中 IL-10 含量与 CRH 组比较下降非常显著（$P<0.01$）。但是在 8 h 时相点，CP+CRH 组中的 IL-10 明显高于正常对照组（$P<0.01$）和 CRH 组（$P<0.01$），HL+CRH 组的 IL-10 也高于正常对照组（$P<0.05$）和 CRH 组（$P<0.01$）。CP+CRH 组与 HL+CRH 组组间在 0.5～4 h 时没有显著性差异（$P>0.05$）。但是在 8 h 时相点，两组差异显著（$P<0.01$），即 IL-10 含量 HL+CRH 组低于在 CP+CRH 组。见表 1。

2.4 抑制 cAMP/PKA 信号在 CRH 调节巨噬细胞分泌 IL-10 中的作用

如表 1 所示，H89+CRH 组 1 h 的 IL-10 含量与 CRH 组比较下降显著（$P<0.01$），并接近正常对照组水平（$P>0.05$）；H89+CRH 组 4 h 的 IL-10 含量与 CRH 组比较，显著下降（$P<0.01$），且低于正常对照组（$P<0.05$）。H89+CRH 组 8 h 的 IL-10 含量均低于 CRH 组与正常对照组（$P<0.05$）。PKAi+CRH 组与 CRH 组、正常对照组比较，在 0.5～8 h 均能够非常显著抑制 IL-10 的分泌（$P<0.01$），其中 1 h 的 IL-10 含量几乎被完全抑制。PKAi+CRH 组与 H89+CRH 组组间比较，在 0.5～8 h 时差异显著（$P<0.01$）。

3 讨论

中枢 CRH 影响免疫系统通过 2 个主要应激反应轴的终末产物——考的松和儿茶酚胺，发挥间接抗炎作用。然而，在炎症部位神经末稍和内皮细胞、免疫细胞表达的外周 CRH，能够以自分泌/旁分泌的方式影响驻留型免疫细胞，其直接的效应是促炎作用[2,4]。外周 CRH 作用于炎症局部单核巨噬细胞可引起 IL-6、ACTH、β-内啡肽的释放，使 T、B 淋巴细胞激活增殖，肥大细胞脱颗粒[2]，从而参与炎症渗出、细胞毒作用以及伤害性感受的调节。Agelaki 等[4]通过体外分离培养小鼠腹膜巨噬细胞以及制备内毒素休克小鼠模型发现，不论体内或体外给予 CRH 刺激对由 LPS 诱导的巨噬细胞源性细胞因子的释放均可起到促进作用。但是，在外周仍可呈现出一定的抗炎作用[5]，减轻炎症局部渗出。Tsatsanis 等[6]报道在炎症反应早期，CRH 通过 COX2/ PGE2 可以抑制由 LPS 诱导的 TNF-α 的释放，然而在炎症中晚期则通过 p38MAPK 信号促进由 LPS 诱导的 TNF-α 的转录表达。如此看来，这些研究结果显示外周 CRH 作为一种内分泌神经肽对机体免疫炎症反应具有双向调控作用，其作用依赖于环境、细胞类型以及被激活的信号通路。

IL-10 能抑制前炎性细胞因子的合成、阻断创伤后出现的细胞因子级联反应，具有显著抗炎作用。在本研究中以 10^{-9} mol/L 浓度的 CRH 孵育巨噬细胞，结果显示 IL-10 分泌增加很快，至 1 h 达峰值，为对照组的 2 倍。随后回落，至 4 h 又出现第 2 个高峰，逐渐回落至 8 h 降至最低。这样，CRH 刺激巨噬细胞后，可以增加抗炎因子 IL-10 的释放，并呈现双峰变化，从而参与巨噬细胞天然免疫功能的调节。

CRH 通过与其受体结合发挥生物学效应。CRHRs 属于 G 蛋白偶联性受体，主要有 2 种（CRHR1 与 CRHR2）亚型。CRH 与 CRHR1、CRHR2 都可结合，但亲和力却不尽相同，CRH 对 CRHR1 的亲和力较强，约是与 CRHR2 的 10 倍[7]。为了明确 CRH 调节巨噬细胞分泌功能的 CRH 受体机制，我们在研究中选择 CRHR1 的特异性拮抗剂 CP-154526 与 CRHR1/2 的非特异性拮抗剂 α-helical CRH9-41 分别预处理巨噬细

胞,结果发现二者明显抑制了 CRH 刺激巨噬细胞 1 h 与 4 h 的 IL-10 的分泌,但是在 8 h 时出现增强 IL-10 的分泌,其作用机制尚不清楚。相比较而言,α-helical CRH9-41(10^{-6} mol/L)能够抑制巨噬细胞对 IL-10 分泌,但是没有完全阻断,其抑制效应接近 CP-154526,2 组之间没有显著性差异,表明巨噬细胞膜上 CRHR1 可能是作为主要受体参与了 CRH 刺激巨噬细胞分泌功能的调节。文献[4]报道亦证实 CRHR1 是 CRH 的主要功能受体。

在多数细胞中,CRH 通过 CRHR 能够活化 cAMP/PKA 信号级联反应,这条通路启动细胞内信号事件,导致翻译后的靶蛋白分子被 PKA 修饰即磷酸化。外源性给予 CRH 刺激 HaCaT 角质化细胞(可以表达 CRHR 的一种细胞株),通过与 cAMP 依赖性通路偶联,能够刺激增加 IL-6、IL-10 合成,抑制 IL-Iβ 的合成[8]。因此,我们应用 AC 的抑制剂 H89 或 PKA 的抑制剂 PKAi (6-22) amide 分别预处理后,发现 CRH 促进巨噬细胞释放 IL-10 的效应在高峰期 1 h 与 4 h 被 H89 明显地抑制。PKAi (6-22) amide 预处理巨噬细胞后,导致 CRH 促 IL-10 分泌的作用明显降低,在 1 h 甚至可完全阻断 IL-10 的分泌。PKA 信号被阻断后,cAMP 水平积聚以及 AC 被抑制后 cAMP 不足,均无法启动核内基因转录调控使炎症因子合成抑制。可见,cAMP-PKA 信号通路参与介导 CRH 促进巨噬细胞释放 IL-10 的过程。

CRHR 作为 7 螺旋跨膜受体,其 Ser/Thr 残基可被 PKA 磷酸化发生异脱敏,起到与 Gα 亚基下游效应器偶联的信号开关作用。高浓度(10^{-7} mol/L) CRH 刺激表达 CRHR1 重组体的 HEK293 细胞,可诱使 CRHR1 发生磷酸化以致于脱敏[9]。原因可能是由于 PKA 过度活化将 CRH-R1α 上第 3 个环的 Ser^{301} 磷酸化(该部位是 PKA 磷酸化的唯一部位)而弱化 CRH 激活的下游信号分子的活性[10]。在本研究体系中选择 CRH 以 10^{-9} mol/L 浓度刺激巨噬细胞,应属于外周 CRH 生理浓度范围,因为在 CRH 表达相对较高的肾上腺组织中波动范围是 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L,其他组织中 CRH 表达在 10^{-11} ~ 10^{-10} mol/L 水平。本研究中应用 PKAi (6-22) amide 阻断 PKA 后 CRH 对巨噬细胞释放 IL-10 的作用被显著降低,表明 10^{-9} mol/L 浓度的 CRH 孵育巨噬细胞可激活 PKA,引起下游信号级联反应,调控细胞因子的基因转录。

CRH 在体内或体外均能与 CRHR 结合并激活多种 G 蛋白,在不同组织导致产生各种第二信使,呈现信号转导通路的多样性。这些信号通路包括:PKC、PKB/AKT、ERK1/2、p38MAPK、Ca^{2+}、RhoA/Rho 激酶、Fas/FasL 等。在本研究中,H89 预处理拮抗 cAMP 后,CRH 促进巨噬细胞释放 IL-10 的作用被抑制,接近正常对照组水平。然而 PKA 被抑制后,不仅可将 CRH 的促 IL-10 分泌作用扭转,还将正常状态下 IL-10 的分泌显著抑制,表明 cAMP/PKA 信号通路在介导 CRH 调节巨噬细胞分泌功能中起着重要作用。

本研究结果证实 CRH 可通过 CRHR1 促进巨噬细胞 IL-10 分泌,其与 cAMP/PKA 信号通路密切相关。CRH 作为一种局部内分泌神经肽,研究其对巨噬细胞非特性免疫的调控及信号机制,有助于阐明 CRH 在神经内分泌-免疫网络中的作用方式及意义。

参考文献:

[1] 杨　列, 周继红, 张岫竹, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 5 - 7.

[2] Mastorakos G, Karoutsou E I, Mizamtsidi M. Corticotropin releasing hormone and the immune/inflammatory response [J]. Eur J Endocrinol, 2006, 155 (Suppl 1): S77 - S84.

[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] 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.

[5] McLoon L K, Sandnas A M, Nockleby K J, *et al*. Reduction in vesicant-induced cellular inflammation and hyperalgesia by local injection of corticotropin releasing factor in rabbit eyelid[J]. Inflamm Res, 2002, 51(1): 16 - 23.

[6] Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, *et al*. Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF-alpha release from macrophages *via* induction of COX-2 and PGE2[J]. J Cell Physiol, 2007, 210(3): 774 - 783.

[7] Hillhouse E W, Grammatopoulos D K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology [J]. Endocr Rev, 2006, 27(3): 260 - 286.

[8] Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, *et al*. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes [J]. Life Sci, 2002, 70(9): 1013 - 1021.

[9] Teli T, Markovic D, Levine M A, *et al*. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(2): 474 - 490.

[10] Papadopoulou N, Chen J, Randeva H S, *et al*. Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone R1alpha receptor-extracellularly regulated kinase signal transduction pathway: the critical role of Ser301 for signaling switch and selectivity [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18 (3): 624 - 639.

(编辑　王小寒)