

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01376

## 垂体腺苷酸环化酶激活多肽调节 LPS 激活的树突状细胞免疫功能

陈学清<sup>1</sup>, 肖冰<sup>2</sup>, 刘思德<sup>2</sup>, 张亚历<sup>2</sup>, 姜泊<sup>2</sup>, 李明松<sup>2\*</sup>

1. 广州医学院第一附属医院消化内科, 广州 510120

2. 南方医科大学南方医院消化内科, 广州 510515

**[摘要]** **目的:** 研究垂体腺苷酸环化酶激活多肽(pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide, PACAP)能否调节小鼠骨髓起源的 LPS 激活的树突状细胞(dendritic cell, DC)的免疫功能。**方法:** 联合应用 rmGM-CSF 和 rmIL-4 自 C57BL/6 小鼠骨髓细胞制备 DC, 以 LPS 和(或)PACAP 刺激 DC; 收集被激活的 DC 及其上清液行 ELISA 和流式细胞术分析; 自 DC 提取总 RNA 行 RT-PCR 和 RNase 分析。**结果:** PACAP 能明显抑制 LPS 激活的 DC 分泌细胞因子 IL-2、IL-12 和 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 以及 LPS 激活的 DC 分泌趋化因子 MIP-2 ( $P < 0.01$ ), 但抑制细胞因子 IL-6, 趋化因子 MIP-1 $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$  的作用并不明显 ( $P > 0.05$ )。**结论:** PACAP 对 LPS 激活的 DC 的免疫功能具有负性调节作用。

**[关键词]** 垂体腺苷酸环化酶激活多肽; 树突状细胞; 脂多糖类; 免疫

**[中图分类号]** R 392.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1376-03

### Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide modulates immune function of LPS-stimulated dendritic cells

CHEN Xue-qing<sup>1</sup>, XIAO Bing<sup>2</sup>, LIU Si-de<sup>2</sup>, ZHANG Ya-li<sup>2</sup>, JIANG Bo<sup>2</sup>, LI Ming-song<sup>2\*</sup>

1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China

2. Department of Gastroenterology, Southern Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate whether pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide(PACAP) can modulate the immune function of mouse LPS-stimulated dendritic cells. **Methods:** DCs were derived from bone marrow of C57BL/6 using rmGM-CSF and rmIL-4, then the DCs were exposed to different stimuli for indicated time periods. The stimulated DCs and their culture supernatant were subjected to ELISA and FACS analysis. The total RNA was extracted from the stimulated DC for RT-PCR and RNase Protection Assay. **Results:** PACAP significantly inhibited the production of IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  and MIP-2 in LPS-stimulated DCs ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ , respectively), but the inhibition of LPS-induced IL-6, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  production was not apparent. **Conclusion:** PACAP can negatively modulate the immunity of LPS-stimulated DCs.

**[KEY WORDS]** pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide; dendritic cells; lipopolysaccharides; immunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1376-1378]

研究<sup>[1-2]</sup>发现, 垂体腺苷酸环化酶激活多肽(pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide, PACAP)不仅对神经系统有强大的免疫活性, 对免疫系统同样具有明显的调节作用。但迄今未见 PACAP 调节脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的树突状细胞(dendritic cell, DC)免疫功能的研究报道。LPS 通过激活 DC 诱导的一系列炎症反应参与了多种疾病的发生和发展, 如感染性疾病和风湿病等<sup>[3-4]</sup>。因此, 调节 LPS 激活的 DC 的免疫功能可改变这些疾病的发生和发

展, 从而起到治疗作用。本研究旨在探讨 PACAP 对 LPS 激活的 DC 免疫功能的调节作用。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物 雌性 C57BL/6 小鼠(8~12 周龄)购自本校动物实验室, SPF 级饲养。

1.2 试剂与单克隆抗体 rmGM-CSF、rmIL-4、抗鼠单抗(抗 IL-2 单抗, 抗 IL-6 单抗, 抗 IL-12 单抗和抗 TNF- $\alpha$  单抗)、PE 标记的抗 CD11c 抗体、ELISA

**[收稿日期]** 2009-06-23 **[接受日期]** 2009-08-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30570839), 广东省自然科学基金(2006105111). Supported by National Natural Science Foundation of China (30570839) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province(2006105111).

**[作者简介]** 陈学清, 博士, 副教授. E-mail: chenxq@vip.163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:020-61641537, E-mail: lms661216@yahoo.com.cn

试剂盒、以 mCK-1 和 mCK-5b 为模板的多探针核糖核酸酶保护测定 (RNase protection assay, RPA) 试剂盒均购自 BD 公司。人工合成的药品级 PACAP 和血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP; 与 PACAP 相似的一种神经肽, 能调节 DC 免疫功能, 作为阳性对照) 购自 Calbiochem 公司, LPS 购自 Sigma 公司。RPMI 1640 完全培养液 (含 2 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L HEPES, 0.05 mmol/L 2-ME, 100 U/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 庆大霉素 和 10% 胎牛血清)、TRIzol 试剂盒购自 Life Technologies 公司。<sup>32</sup>P-核苷酸购自北京原子能研究所。

1.3 DC 的制备、纯化和激活 自 C57BL/6 小鼠分离完整长骨, 70% 乙醇中浸泡 3 min 后, 用 PBS 冲洗; 无菌条件下从长骨中分离出骨髓细胞并制备成单细胞悬液; 加入含 rmGM-CSF 和 rmIL-4 各 200 U/ml 的 RPMI 1640 完全培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下在 Petri 培养皿中培养, 调整每只培养皿中骨髓细胞密度为 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml; 培养第 3 天, 在每只培养皿中加入 10 ml 新鲜 RPMI 1640 完全培养液 (含 rmGM-CSF 和 rmIL-4 各 200 U/ml); 第 5 天, 收集培养的细胞, 以免疫磁珠标记的抗 CD11c 单抗通过全自动磁性细胞分选仪 (autoMACS) 纯化 DC。经流式细胞仪 (FACS) 检测, DC 纯度为 90%。分别以 LPS (1  $\mu$ g/ml)、PACAP (1 $\times$ 10<sup>-7</sup> mol/L)、VIP (1 $\times$ 10<sup>-7</sup> mol/L)、LPS (1  $\mu$ g/ml) + PACAP (1 $\times$ 10<sup>-7</sup> mol/L) 和 LPS (1  $\mu$ g/ml) + VIP (1 $\times$ 10<sup>-7</sup> mol/L) 激活 DC (1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml), 收集被激活的 DC 及其上清液供下一步分析。

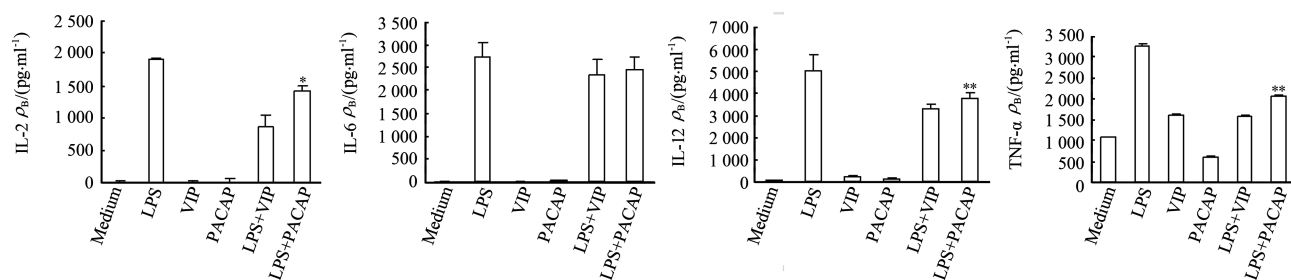


图 1 PACAP 对 LPS 诱导 DC 分泌细胞因子的影响

Fig 1 PACAP modulates production of cytokines induced by LPS in DCs

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs LPS group,  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 PACAP 调节 LPS 激活的 DC 表达趋化因子 图 2 及表 1 显示, PACAP 显著抑制 LPS 激活的 DC 表达趋化因子 MIP-2 表达 ( $P < 0.01$ ), 但对其他趋化因子的抑制作用不明显。

### 3 讨论

DC 在调节机体免疫功能, 维持免疫功能稳定中

1.4 ELISA 检测 采用 ELISA 方法, 按试剂盒操作指南检测各组上清液中的 IL-2、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  表达水平。

1.5 RPA 测定 用 RPA 方法检测趋化因子 MIP-2、MIP-1 $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$  mRNA 的表达水平。按 TRIzol 方法自 DC 提取总 RNA; 按 RPA 试剂盒操作指南合成探针, 提取、纯化并测定其放射活性; 每个样本取 RNA 5  $\mu$ g、空白对照 RNA 及阳性对照标准 RNA 各 2  $\mu$ l, 真空干燥后加入合成缓冲液溶解, 各样本再加入稀释好的 mCK-1 和 mCK-5b 探针 2  $\mu$ l, 56 $^{\circ}$ C 孵育后分别加入核糖核酸酶混合液及蛋白酶 K 混合液, 经过酶消化后多余的探针和未被结合的单链 RNA 被分解, 不被分解的探针 RNA 复合物按 TRIzol 方法再提取、纯化, 注入 5% 聚丙烯酰胺胶后室温下 50 W 电泳 2 h, 并用真空干燥器将胶转至滤纸, -70 $^{\circ}$ C 下将感光片曝光; 放射自显影图像用 Fuji-BAS 2000 分析; RNA 条带密度用 GAPDH 密度进行标准化后再相互比较。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 配对样本采用  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 PACAP 抑制 LPS 激活的 DC 分泌细胞因子 经 LPS 激活后 DC 迅速分泌大量的细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$ 。从图 1 可以看出, PACAP 可明显抑制 LPS 激活的 DC 分泌细胞因子 IL-2、IL-12 和 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 但对 IL-6 的抑制作用不明显。

发挥着关键作用。DC 的免疫功能过激或免疫功能低下都将直接导致机体的免疫功能失衡。当致病性细菌感染机体后, 通过其菌体的 LPS 诱导炎症反应, LPS 激活 DC 是其中一个重要环节, 被 LPS 激活的 DC 释放出大量的炎症介质 (包括细胞因子和趋化因子), 产生炎症反应; 同时 DC 自身的免疫活性也明显加强, 进一步促进炎症反应的发生和发展,

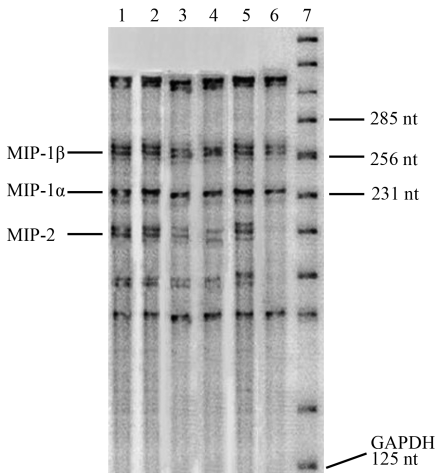


图2 PACAP对LPS激活的DC表达趋化因子的抑制作用

Fig 2 PACAP inhibited LPS-stimulated DCs to express chemotactic factors

1: LPS+PACAP; 2: LPS+VIP; 3: PACAP; 4: VIP; 5: LPS; 6: Medium; 7: Template

表1 PACAP对LPS激活的DC表达趋化因子的抑制作用

Tab 1 PACAP inhibited expression of chemotactic factors by LPS-stimulated DCs

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	MIP-2	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$
Medium	0.02 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.02
LPS	0.26 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.01
PACAP	0.12 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02
LPS+VIP	0.16 $\pm$ 0.01**	0.28 $\pm$ 0.02**	0.29 $\pm$ 0.02*
LPS+PACAP	0.15 $\pm$ 0.01**	0.34 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01

\*\* P<0.01 vs LPS group

导致感染性疾病的进一步发展,并参与某些与感染相关的风湿病的病理过程<sup>[3-4]</sup>,提示若能抑制LPS激活的DC的免疫活性,将可能有效抑制细菌感染所导致的炎症反应以及风湿病的进程。我们的研究结果显示,PACAP可能通过下列方式抑制LPS激活的DC的免疫功能:首先,PACAP抑制LPS激活的DC分泌细胞因子IL-2、IL-12和TNF- $\alpha$ ;其次,PACAP明显抑制LPS激活的DC表达趋化因子,如MIP-2。这些细胞因子和趋化因子与炎症反应的发生和发展关系密切,在炎症性疾病的发生和发展中起重要作用。

近期的研究发现,PACAP在调节机体的免疫功能中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。最新的研究也显示,PACAP在实验性地治疗某些自身免疫性疾病(如炎症性肠病和神经系统炎症性疾病)中有明显的疗效<sup>[5-8]</sup>,但确切的机制尚不清楚。这些疾病本身存在

不同程度的免疫功能过激,包括DC的功能过于强大,提示PACAP负性调节DC的免疫功能可能是PACAP在自身免疫性疾病中发挥治疗作用的一个重要方面。我们的研究结果亦显示PACAP能明显抑制LPS激活的DC分泌的细胞因子IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$ ( $P<0.01, P<0.05$ )和趋化因子MIP-2( $P<0.01$ ),但对细胞因子IL-6和趋化因子MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 的抑制作用不明显,其确切的机制尚不清楚,可能与不同的细胞因子和趋化因子的信号通道不同有关<sup>[3-4]</sup>。

综上所述,PACAP通过调节LPS激活的DC分泌细胞因子和趋化因子而调节DC的免疫功能,并可能通过该机制在治疗某些自身免疫性疾病(如炎症性肠病和神经系统炎症性疾病)中发挥作用。

[参考文献]

[1] Gomariz R P, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1070: 51-74.

[2] Ganea D, Rodriguez R, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003, 49: 127-142.

[3] Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Martynska L, Baranowska B. Can PACAP-38 modulate immune and endocrine responses during lipopolysaccharide (LPS)-induced acute inflammation[J]? Ann N Y Acad Sci, 2006, 1070: 156-160.

[4] Bik W, Wolinska-Witort E, Pawlak J, Skwarlo-Sonta K, Chmielowska M, Martynska L, et al. PACAP 38 as a modulator of immune and endocrine responses during LPS-induced acute inflammation in rats[J]. J Neuroimmunol, 2006, 177: 76-84.

[5] Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, et al. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP[J]. Int J Cancer, 2008, 122: 1803-1809.

[6] Abad C, Gomariz R P, Waschek J A. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP[J]. Curr Top Med Chem, 2006, 6: 151-163.

[7] Azuma Y T, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, et al. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis[J]. J Cell Physiol, 2008, 216: 111-119.

[8] Tan Y V, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 2012-2017.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群