

[文章编号] 1000-4718(2008)09-1835-04

# 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导小鼠分泌 IL-12 的影响及其机制研究\*

魏春华<sup>1</sup>, 李淑瑾<sup>1</sup>, 丛斌<sup>1Δ</sup>, 宋宁<sup>1</sup>, 姚玉霞<sup>1</sup>, 马春玲<sup>1</sup>, 倪志宇<sup>1</sup>, 丛军<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 河北医科大学基础医学院, 河北省法医学重点实验室, 河北 石家庄 050017; <sup>2</sup> 河北省赵县人民医院, 河北 赵县 051530)

**[摘要]** 目的: 观察八肽胆囊收缩素(CCK-8)对脂多糖诱导小鼠分泌 IL-12 的影响, 探讨核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)的信号转导作用。方法: 雌性 BALB/c 小鼠经 LPS 诱导后分别给予 CCK 及 CCK-A、B 受体拮抗剂。ELISA 法检测小鼠血清及肺、脾组织中 IL-12p40、p70 的表达; Western blotting 法检测肺脏、脾脏 I $\kappa$ B、p38 MAPK 的表达; EMSA 法检测肺、脾组织中 NF- $\kappa$ B/DNA 的结合活性。结果: CCK-8 进一步提高了 LPS 诱导的小鼠血清及肺、脾组织中 IL-12p40、p70 的表达; 抑制 I $\kappa$ B 磷酸化和 NF- $\kappa$ B/DNA 结合活性; 促进 p38 MAPK 磷酸化。而 CCK-A 受体拮抗剂(CR-1409)及 CCK-B 受体拮抗剂(CR-2945)部分逆转了 CCK-8 的效应。结论: CCK-8 可促进 LPS 诱导小鼠分泌 IL-12, p38 MAPK 可能参与了其信号转导机制, 而 NF- $\kappa$ B 途径可能并未参与 CCK-8 促 IL-12 分泌这一过程。

[关键词] 胆囊收缩素; 脂多糖类; 白细胞介素 12; NF- $\kappa$ B; p38 MAPK

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Effect of CCK-8 on signal mechanisms of IL-12 secretion in LPS-induced mice

WEI Chun-hua<sup>1</sup>, LI Shu-jin<sup>1</sup>, CONG Bin<sup>1</sup>, SONG Ning<sup>1</sup>, YAO Yu-xia<sup>1</sup>, MA Chun-ling<sup>1</sup>, NI Zhi-yu<sup>1</sup>, CONG Jun<sup>2</sup>( <sup>1</sup> Institute of Basic Medicine, Hebei Key Laboratory of Forensic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; <sup>2</sup> The People's Hospital of Zhaoxian County, Zhaoxian 051530, China. E-mail: bincong@263.net )

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the effects of CCK-8 on IL-12 secretion in LPS-induced mice and to investigate the signal transduction mechanisms involving NF- $\kappa$ B and p38 MAPK. **METHODS:** Female BALB/c mice were induced by LPS in the presence or absence of CCK-8, CCK-A or B receptor antagonist. The productions of IL-12p40 and p70 in the sera, lung and spleen tissues were evaluated by ELISA. Changes of pI $\kappa$ B, p-p38 protein expression and the NF- $\kappa$ B/DNA binding activity were examined by Western blotting and EMSA, respectively. **RESULTS:** CCK-8 increased the expressions of IL-12p40, p70 in the serum, lung and spleen tissues of LPS-induced mice, inhibited I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B/DNA binding activity, increased p38 phosphorylation. **CONCLUSION:** CCK-8 increases the production of IL-12 in LPS-induced mice probably via activating p38 MAPK. NF- $\kappa$ B might not mediate the activating effect of CCK-8 on IL-12 production.

[KEY WORDS] Cholecystokinin; Lipopolysaccharides; Interleukin-12; NF-kappa B; p38 MAPK

八肽胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK-8)具有抗炎和调节免疫应答的作用,除可调节巨噬细胞介导的天然免疫应答之外,也可调节 T 细胞介导的适应免疫应答<sup>[1-3]</sup>。CCK-8 可促进 Th1 反应,抑制 Th2 反应,使 Th2 优势反应向 Th1 方向极化<sup>[3]</sup>。IL-12 是一个重要的免疫调节因子,在机体的免疫调节中起着重要的作用,诱导 Th1 细胞分化并抑制 Th2

细胞分化,它甚至可以使已建立的 Th2 型为主的反应向 Th1 型极化<sup>[4,5]</sup>。本研究通过观察 CCK-8 对 LPS 诱导小鼠分泌 IL-12 的影响,探讨 CCK-8 调节 Th1/Th2 平衡的作用是否与 IL-12 有关。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物

[收稿日期] 2007-06-14 [修回日期] 2008-01-08

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500193)

Δ 通讯作者 Tel: 0311-86266406; E-mail: bincong@263.net

魏春华,李淑瑾并列第一作者

雌性 BALB/c 小鼠,清洁级,6-8 周龄,购自河北医科大学实验动物中心,恒温(23 ± 2) °C,湿度 45% - 65%,每天光照 12 h。常规高压灭菌饮食。

## 2 主要试剂

硫酸化 CCK - 8、LPS、CCK - A、B 受体拮抗剂(CR1409、CR2945)均购自 Sigma。小鼠 IL - 12p40 ELISA 试剂盒购自 R&D, IL - 12p70 ELISA 试剂盒购自 Biosource,检测灵敏度均为 4 ng/L。IκB、β - actin 抗体购自 Santa Cruz,pIκB、p38、p - p38 抗体均购自 Cell Signaling。HRP - 羊抗小鼠 IgG、HRP - 羊抗兔 IgG 购自北京中山生物公司。Gel shift assay 试剂盒购自 Promega。

## 3 动物模型和实验分组

雌性 BALB/c 小鼠分为 6 组( $n = 4$ ):(1) 对照组:腹腔注射生理盐水 0.3 mL;(2) LPS 组:腹腔注射 LPS 5 mg/kg(0.1 mL);(3) CCK + LPS 组:腹腔注射 CCK - 8 5 nmol/mouse(0.1 mL),10 min 后腹腔注射 LPS 5 mg/kg(0.1 mL);(4) 单独 CCK 组:腹腔注射 CCK 5 nmol/mouse(0.1 mL);(5) CR1409 + CCK + LPS 组:腹腔注射 CR - 1409 5 μg/kg(0.1 mL),30 min 后腹腔注射 CCK - 8 5 nmol/mouse(0.1 mL),10 min 后腹腔注射 LPS 5 mg/kg(0.1 mL);(6) CR2945 + CCK + LPS 组:腹腔注射 CR - 2945 5 μg/kg(0.1 mL),30 min 后腹腔注射 CCK - 8 5 nmol/mouse(0.1 mL),10 min 后腹腔注射 LPS 5 mg/kg(0.1 mL)。3h 后处死小鼠,肺、脾冻存于液氮中,留置血清于 -70 °C。

## 4 细胞因子的测定

取右肺、脾称重后置于匀浆缓冲液中,每 100 g 组织加入 1 mL 缓冲液。缓冲液中含蛋白酶抑制剂混合物,包括 1 mmol/L PMSF、1 mg/L 亮抑肽酶溶于含 50 mmol/L(pH7.4) Tris、1% NP - 40、0.25% 脱氧胆酸钠、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L NaF、1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mmol/L EDTA 的蛋白提取液中。标本匀浆后以 14 000 × g 离心 30 min。用小鼠 ELISA 试剂盒分别检测肺、脾组织上清 IL - 12p40、p70 的含量。

## 5 Western blotting 检测 IκB、p38 MAPK 蛋白及其磷酸化水平

提取细胞浆蛋白,方法同上,用考马斯亮蓝 G250 试剂盒测定蛋白浓度。150 μg 或 250 μg 胞浆蛋白,经 SDS - 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将凝胶上的蛋白质转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉封闭膜,37 °C 缓摇 1 h,TBS 振荡漂洗,10 min × 3 次,加入兔抗小鼠 IκB 抗体(1:150 稀释)、p38、pIκB (phosphorylated IκB, pIκB)、p - p38 (phosphorylated p38, p - p38) 抗体(1:1 000 稀释),4 °C 孵育过夜。TBS 振荡漂洗,10 min × 3 次,加入 HRP 标记的羊抗

兔或羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光法 X 光片显影定影。同时检测 β - actin 的表达作为内参对照。

## 6 电泳迁移率改变分析 NF - κB 活性

提取肺、脾组织核蛋白,用考马斯亮蓝 G250 试剂盒测定蛋白浓度。含有 NF - κB 特异性识别位点的双链脱氧寡核苷酸为:5' - AGTTGAGGG - GACTTCCAGG - 3',用 T4 多核苷酸激酶进行末端标记[γ - <sup>32</sup>P] ATP,乙醇沉淀法纯化标记的寡核苷酸。取 20 μg 核蛋白与同位素标记的探针 DNA 在室温下进行结合反应 30 min。DNA - 蛋白结合物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,真空干燥凝胶,-70 °C 放射自显影。

## 7 统计学处理

用 SPSS10.0 统计分析软件进行统计学分析。数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组均数的比较行单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差异法(least significant difference, LSD)做两两比较。

# 结 果

## 1 CCK - 8 对 LPS 诱导小鼠血清、肺、脾组织 IL - 12p40、p70 水平的影响

LPS 诱导明显提高小鼠血清、肺、脾组织 IL - 12p40、p70 水平,CCK - 8 进一步提高 IL - 12p40、p70 水平,给予 CCK - A、B 受体拮抗剂后则明显降低,但仍明显高于 LPS 组,CCK - 8 单独作用对 IL - 12p40、p70 水平无明显影响,见表 1。

## 2 CCK - 8 对 LPS 诱导小鼠肺、脾组织 IκB、p38 及 pIκB、p - p38 蛋白水平的影响

给予生理盐水、脂多糖、CCK - 8 及 CCK - A、B 受体拮抗剂后,肺、脾组织总 IκB、p38 的表达在各组之间有所不同,但无显著差异( $P > 0.05$ ),见图 1、2。

LPS 组 pIκB 蛋白水平明显高于对照组( $P < 0.01$ );CCK - 8 可降低 LPS 诱导的肺、脾组织 pIκB 蛋白水平( $P < 0.01$ );并可被 CCK - A、B 受体拮抗剂所抑制( $P < 0.05$ );CCK - 8 单独作用对 pIκB 蛋白水平无明显影响,见图 1。

LPS 组 p - p38 蛋白水平明显高于对照组( $P < 0.01$ );CCK - 8 可进一步促进 LPS 诱导的肺、脾组织 p - p38 蛋白表达( $P < 0.05$ );并可被 CCK - A、B 受体拮抗剂所抑制( $P < 0.05$ );CCK - 8 单独作用对 p - p38 蛋白水平无明显影响,见图 2。

## 3 CCK - 8 对 LPS 诱导小鼠肺、脾组织 NF - κB 活性的影响

LPS 组肺、脾组织 NF - κB 活性显著高于对照组( $P < 0.01$ );给予 CCK - 8 后,NF - κB 活性明显降低( $P < 0.01$ ),CCK - 8 的作用可被 CCK - A、B 受体

拮抗剂减弱 ( $P < 0.05$ ), CCK-8 单独作用对 NF- $\kappa$ B 活性无明显影响。用同源性寡核苷酸(含 NF- $\kappa$ B 结合位点)及异源性寡核苷酸(含 AP-2 结合位点)作为竞争物证实了 DNA-蛋白结合的特异性,见图 3。

表 1 CCK-8 对 LPS 诱导小鼠血清、肺、脾组织 IL-12p40、p70 水平的影响

Tab 1 Effects of CCK-8 on IL-12p40, p70 production in the serum, lung and spleen tissues of LPS-treated mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Group	Serum		Lung		Spleen	
	IL-12p40	IL-12p70	IL-12p40	IL-12p70	IL-12p40	IL-12p70
Control	46.02 ± 15.62	17.44 ± 4.61	49.10 ± 6.24	26.94 ± 7.59	46.32 ± 8.41	44.54 ± 5.51
LPS	207.89 ± 53.31*	145.64 ± 3.84*	111.16 ± 9.55*	47.01 ± 3.19*	78.30 ± 8.35*	85.69 ± 6.00*
CCK + LPS	327.74 ± 63.08 <sup>#</sup>	240.37 ± 45.72 <sup>#</sup>	174.56 ± 10.82 <sup>#</sup>	86.09 ± 6.74 <sup>#</sup>	108.41 ± 10.21 <sup>#</sup>	111.85 ± 15.97 <sup>#</sup>
CCK	44.00 ± 13.24	29.18 ± 8.97	46.02 ± 10.23	28.08 ± 6.95	48.22 ± 8.47	43.54 ± 4.65
CR1409 + CCK + LPS	293.24 ± 45.04 <sup>Δ</sup>	160.93 ± 19.21 <sup>Δ</sup>	160.04 ± 4.30 <sup>Δ</sup>	67.59 ± 7.32 <sup>Δ</sup>	93.08 ± 5.02 <sup>Δ</sup>	97.24 ± 6.19 <sup>Δ</sup>
CR2945 + CCK + LPS	212.88 ± 52.81 <sup>Δ</sup>	165.54 ± 14.70 <sup>Δ</sup>	143.58 ± 8.53 <sup>Δ</sup>	52.34 ± 8.96 <sup>Δ</sup>	82.16 ± 4.02 <sup>Δ</sup>	90.02 ± 6.35 <sup>Δ</sup>

\*  $P < 0.01$  vs control and CCK; <sup>#</sup>  $P < 0.01$  vs LPS; <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$  vs CCK + LPS; <sup>▲</sup>  $P < 0.05$  vs LPS; <sup>●</sup>  $P < 0.01$  vs control.

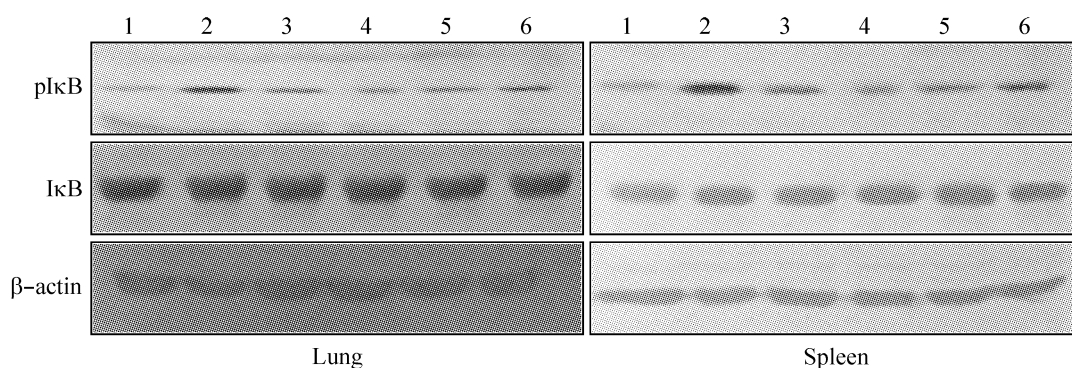


Fig 1 Effect of CCK-8 on the pI $\kappa$ B, I $\kappa$ B protein level in the lung and spleen of LPS-treated mice. 1: control; 2: LPS; 3: LPS + CCK; 4: CCK; 5: CR1409 + CCK + LPS; 6: CR2945 + CCK + LPS.

图 1 CCK-8 对 LPS 诱导小鼠肺、脾组织 I $\kappa$ B、pI $\kappa$ B 蛋白水平的影响

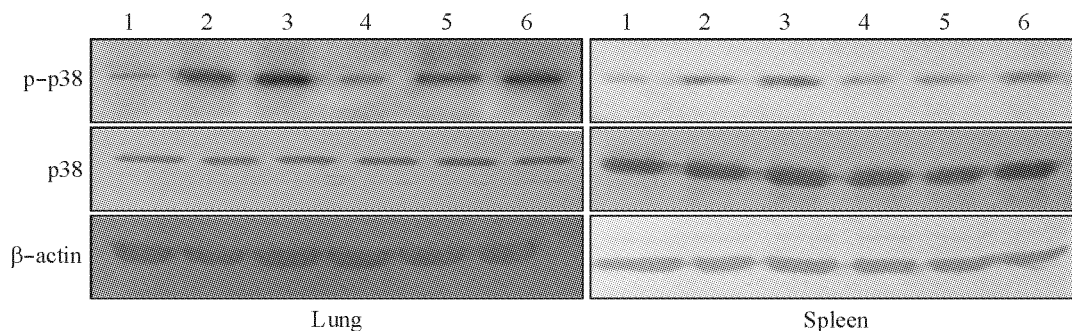


Fig 2 Effect of CCK-8 on the p-p38, p38 protein level in the lung and spleen of LPS-treated mice. 1: control; 2: LPS; 3: LPS + CCK; 4: CCK; 5: CR1409 + CCK + LPS; 6: CR2945 + CCK + LPS.

图 2 CCK-8 对 LPS 诱导小鼠肺、脾组织 p38、p-p38 蛋白水平的影响

## 讨论

IL-12 是 90 年代初命名的白细胞介素家族成员,被认为是在机体早期的非特异性免疫和随后的抗原特异性的适应性免疫过程中起桥梁作用的细胞因子,在免疫调节中具有重要作用。它能诱导 Th0 向 Th1 细胞分化并抑制 Th2 细胞分化,它甚至可以使已建立的 Th2 型为主的反应向 Th1 型极化。IL-12 能促进 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$ ,而 IFN- $\gamma$  也能促进 Th1 细胞分化与增殖。因此,IL-12 促进

Th1 的分化与增殖,可能是通过 IFN- $\gamma$  起作用<sup>[6]</sup>。

近年来,CCK-8 的抗炎及免疫调节作用的研究倍受关注。我室以往的研究已经证实 CCK-8 对 LPS 致伤的内毒素血症小鼠血清及肺组织促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达有抑制性调节作用,同时激活抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 的表达<sup>[7]</sup>。IL-12 由 p35 和 p40 两个亚单位组成,IL-12p35、p40 亚单位必须在同一细胞表达才能产生具有生物活性的异二聚体 IL-12p70 单体,通常通过测定 p70 以反映 p35 含量。LPS/IFN $\gamma$  诱导 p40 基因表达的功能性启

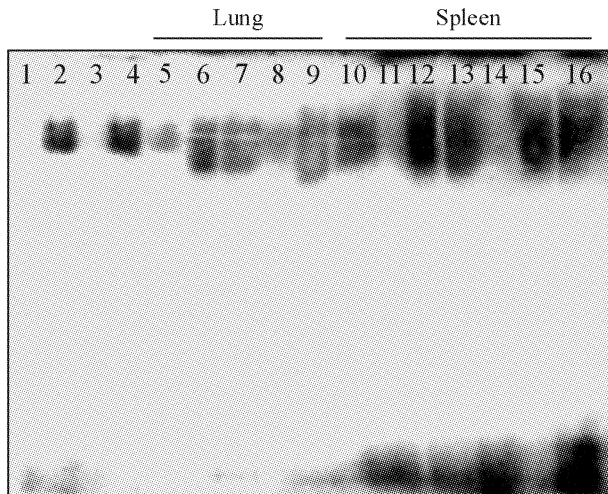


Fig 3 Effects of CCK - 8 on NF -  $\kappa$ B/DNA binding activity in the lung and spleen of LPS - treated mice. 1: negative control; 2: positive control; 3: [ $^{32}$ P] - labeled NF -  $\kappa$ B Oligo plus unlabeled NF -  $\kappa$ B Oligo (competitor); 4: [ $^{32}$ P] - labeled NF -  $\kappa$ B Oligo plus unlabeled AP - 2 Oligo(noncompetitor); 5,11:control; 6,12:LPS; 7,13:LPS + CCK; 8,14:CCK; 9,15: LPS + CCK + CR1409; 10,16: LPS + CCK + CR2945.

图 3 CCK - 8 对 LPS 诱导小鼠肺、脾组织 NF -  $\kappa$ B 活性的影响

动子区域的 -132/-122 含有 NF -  $\kappa$ B 结合位点,而 -211/-207 含有 Ets - 2 元件,NF -  $\kappa$ B 是 LPS/IFN $\gamma$  刺激后导致巨噬细胞 IL - 12p40 转录发生最大效应的主要转录调节因子<sup>[8]</sup>。本实验首次发现 CCK - 8 可促进 LPS 诱导的小鼠分泌 IL - 12,LPS 可促进 I $\kappa$ B 磷酸化降解、提高 NF -  $\kappa$ B/DNA 的结合活性,而给予 CCK - 8 后抑制了 I $\kappa$ B 磷酸化降解和 NF -  $\kappa$ B/DNA 的结合活性,这与本室以往的研究结果一致,本室的研究表明 CCK - 8 抑制了 ES 大鼠肺组织及 LPS 诱导的大鼠 PIMs NF -  $\kappa$ B 的 DNA 结合活性<sup>[9]</sup>,我们的结果提出一个疑问,即 LPS 激活 NF -  $\kappa$ B 参与 IL - 12 的生成,而 CCK - 8 抑制了 LPS 激活的 NF -  $\kappa$ B 反而却增加了 IL - 12 的生成。说明 NF -  $\kappa$ B 可能没有参与 CCK - 8 对 LPS 诱导的 IL - 12 分泌的调节,同时我们又对 LPS 诱导或同时给予 LPS 和 CCK - 8 后 p38 的磷酸化水平进行了研究,结果发现 LPS 促进 p38 磷酸化降解而给予 CCK - 8 后进一步促进了 p38 的磷酸化降解,那么 CCK - 8 有可能是通过促进 p38 的磷酸化降解,细胞浆中的 p38 蛋白激酶即转位到细胞核,活化其它转录因子,调节 IL - 12 的表达。以往也有研究表明,p38 可能参与辐射诱导 IL - 12 变化的分子调控。同时他们检测低剂量辐射对 J774A.1 细胞珠中 IL - 12 及 p38 丝裂原活化蛋白激酶的影响,结果显示低剂量辐射可引起 IL - 12 表达

增加,而 p38 MAPK 转导通路可能在其中发挥作用<sup>[10-12]</sup>。还有报道显示,在 p38 MAPK 上游激酶 MKK3 敲除的小鼠中,IL - 12 的产生存在缺陷,另外,Aicher 等发现树突细胞中 p38 MAPK 的激活对于 CD40 诱导的 IL - 12 的产生是必须的。

[参 考 文 献]

[1] Cong B, Li SJ, Yao YX, et al. Effect of cholecystokinin octapeptide on tumor necrosis factor alpha transcription and nuclear factor - kappa B activity induced by lipopolysaccharide in rat pulmonary interstitial macrophages[J]. World J Gastroenterol, 2002,8(4): 718 - 723.

[2] 高维娟,许顺江,丛 斌,等. CCK - 8 抑制 LPS 作用下大鼠肺间质巨噬细胞 NF -  $\kappa$ B 活性的 cAMP - PKA 通路研究[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(10): 1891 - 1895.

[3] 宋 宁,李淑瑾,丛 斌,等. 八肽胆囊收缩素对经钥孔戚血蓝蛋白免疫小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007,23(3): 423 - 427.

[4] Wolf SF, Dalnau SR, Freitas CS. Activity of IL - 12 as adjuvant in promoting Th1 and Th2 recall responses[J]. Res Immunol, 1995,146(7): 486 - 489.

[5] Foli A, Barnea A, Zivogel L. Effects of the Th1 and Th2 stimulatory cytokines interleukin - 12 and interleukin - 4 on human immunodeficiency virus replication[J]. Blood, 1995,85(8):2114 - 2123.

[6] Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of IFN -  $\gamma$  production by NK cell stimulatory factor (NKSF): characterization of the responder cells and synergy with other inducers [J]. J Exp Med, 1991, 173(4): 869 - 879.

[7] 倪志宇,李淑瑾,丛 斌,等. CCK - 8 对 LPS 诱导大鼠肺间质巨噬细胞 TLR4 及 IL - 1 $\beta$  表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2005,25(2):137 - 140.

[8] Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and potuitary adenylate cyclase - activating polypeptide inhibit interleukin - 12 transcription by regulating nuclear factor  $\kappa$ B and Ets activation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 31930 - 31940.

[9] Li SJ, Cong B, Yan YL, et al. Cholecystokinin octapeptide inhibits the *in vitro* expression of CD14 in rat pulmonary interstitial macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. Chinese Medical Journal, 2002, 115(2): 276 - 279.

[10] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995,9(9):726 - 735.

[11] 刘晓冬,刘树铮,马淑梅,等. 低剂量 X 射线照射对 J774A.1 细胞 IL - 12 和 p38 MAPK 表达的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2002,20(14):271 - 274.

[12] 冉新泽,粟永萍,郑怀恩. 创伤修复中白细胞介素 12 的生物学特性及其作用[J]. 中国临床修复,2004,8(17):3345 - 3348.