

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0776-04

## CCK-8 上调小鼠腹腔巨噬细胞 B7.1 和 B7.2 表达并增强其协同刺激活性\*

张风华<sup>1</sup>, 李淑瑾<sup>1</sup>, 丛斌<sup>1△</sup>, 张正茂<sup>2</sup>, 朱桂军<sup>2</sup>,  
马春玲<sup>1</sup>, 丛军<sup>3</sup>, 刘宁<sup>1</sup>, 倪志宇<sup>1</sup>, 付丽红<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>河北医科大学法医系, 河北石家庄 050017; <sup>2</sup>河北医科大学第四医院,  
河北石家庄 050011; <sup>3</sup>河北省赵县人民医院, 河北赵县 051530)

**[摘要]** 目的: 探讨八肽胆囊收缩素(CCK-8)对静息巨噬细胞 B7.1 和 B7.2 表达及其协同刺激功能的影响。方法: 用 CCK-8( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  mol/L) 孵育小鼠腹腔巨噬细胞一定时间, 采用流式细胞术分析细胞表面 B7.1 和 B7.2 含量的变化。用免疫磁珠从小鼠脾细胞分离 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 按 4:1 数量比与腹腔巨噬细胞(预先用 CCK-8 和/或抗 B7.1 抗体、抗 B7.2 抗体、CCK1R 拮抗剂 CR1409、CCK2R 拮抗剂 CR2945 孵育 24 h) 共同体外培养, 同时加入 ConA 5 mg/L, 采用 [<sup>3</sup>H] 掺入法测定 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖反映巨噬细胞的协同刺激活性。结果: CCK-8 可上调静息巨噬细胞 B7.1 及 B7.2 的表达, 并增强巨噬细胞的协同刺激活性。CCK-8 的作用呈剂量依赖性, 最大效应剂量是在  $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  mol/L 之间。抗 B7.2 抗体可减轻 CCK-8 增强巨噬细胞协同刺激活性的作用, CR1409 及 CR2945 均能逆转 CCK-8 的上述作用, 且 CR1409 的作用较 CR2945 更明显。结论: CCK-8 通过上调巨噬细胞 B7.2 表达而增强其协同刺激活性, 该作用由 CCK1R 及 CCK2R 介导, 其中 CCK1R 起主要介导作用。

**[关键词]** 巨噬细胞; 胆囊收缩素

**[中图分类号]** R363.2

**[文献标识码]** A

## CCK-8 upregulates B7.1 and B7.2 expressions and enhances the costimulatory activity of murine peritoneal macrophages

ZHANG Feng-hua<sup>1</sup>, LI Shu-jin<sup>1</sup>, CONG Bin<sup>1</sup>, ZHANG Zheng-mao<sup>2</sup>, ZHU Gui-jun<sup>2</sup>,  
MA Chun-ling<sup>1</sup>, CONG Jun<sup>3</sup>, LIU Ning<sup>1</sup>, NI Zhi-yu<sup>1</sup>, FU Li-hong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Forensic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; <sup>2</sup> The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; <sup>3</sup> The People's Hospital of Zhao County, Hebei 051530, China. E-mail: bincong@263.net)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate *in vitro* effects of cholecystokinin octapeptide(CCK-8) on the expressions of B7.1 and B7.2 and the costimulatory activity of T lymphocytes in unstimulated macrophages. **METHODS:** Mouse peritoneal macrophages were isolated and incubated with CCK-8( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  mol/L) for indicated time. The B7.1 and B7.2 expressions of murine peritoneal macrophages were analyzed by flow cytometry. CD4<sup>+</sup>T cells were isolated from mouse spleen using immunomagnetic beads, and cultured with 1/4 numbers of macrophages which were pretreated with CCK-8 and/or anti-B7.1 antibody, anti-B7.2 antibody, CCK1R antagonist CR1409, CCK2R antagonist CR2945 for 24 h. ConA was added into the culture medium to stimulate CD4<sup>+</sup>T cell proliferation. The proliferation was determined by measuring [<sup>3</sup>H]-TdR incorporation in a  $\beta$ -scintillation counter. **RESULTS:** B7.1 and B7.2 expressions and costimulatory activity of peritoneal macrophages were enhanced by CCK-8 in a dose-dependent manner, and the maximal effects occurred at the concentrations of  $10^{-9}$  mol/L to  $10^{-7}$  mol/L. Anti-B7.2 antibody, but not anti-B7.1 antibody, reduced the modulatory role of CCK-8 on costimulatory activity. Both CR1409 and CR2945 reversed the effect of CCK-8 on costimulation, and the role of CR1409 was more significant. **CONCLUSION:** CCK-8 enhances macrophage costimulatory activity by upregulating B7.2 expression, which is mediated by CCK1R and CCK2R. CCK1R might be the major receptor responsible for the modulation of CCK-8 on costimulation.

**[KEY WORDS]** Macrophages; Cholecystokinin

[收稿日期] 2006-10-12

[修回日期] 2006-12-25

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500193)

△通讯作者 Tel: 0311-86265602; E-mail: bincong@263.net

八肽胆囊收缩素 (cholecystokinin octapeptide, CCK-8) 对巨噬细胞的活性具有一定的调节作用, 如抑制巨噬细胞的吞噬功能及趋化活性<sup>[1]</sup>, 抑制脂多糖诱导的巨噬细胞生成促炎性细胞因子<sup>[2]</sup>, 显示出直接的抗炎效应。

活化的巨噬细胞除在诱导炎症反应中起关键作用外, 还可作为抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC) 启动适应性免疫应答, 诱导 T 细胞活化、增殖、分化为效应细胞。该过程不仅需要特异性抗原刺激, 还需要协同刺激分子的参与。激活 T 细胞最重要的协同刺激分子是 T 细胞表面 CD28 和 CTLA-4 与 APC 表面相应配体 B7.1 和 B7.2 的结合<sup>[3]</sup>。B7 分子的表达程度影响了 APC 的协同刺激活性及 T 细胞的活化。但 CCK-8 对巨噬细胞的协同刺激功能有何影响, 目前尚无报道。因此, 本课题拟观察 CCK-8 对静息巨噬细胞 B7.1 和 B7.2 表达及其协同刺激功能的影响, 探讨 CCK-8 是否通过影响巨噬细胞的协同刺激功能而调节适应性免疫应答。

## 材 料 和 方 法

### 1 试剂

CCK-8、CR-1409、CR2945、刀豆蛋白 A (ConA) 均购自 Sigma 公司。胎牛血清 (FCS, 北京圣马元亨生物有限公司); RPMI-1640 培养基 (Gibico); FITC anti-mouse CD80、FITC anti-mouse CD86 购自 Biolegend 公司。Mouse CD4 (L3T4) MicroBeads 购自 Miltenyi Biotec 公司。<sup>[3H]</sup>-TdR 购自北京高科电子股份有限公司。Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse CD4 购自 eBioscience 公司。Anti-mouse CD80 antibody 和 anti-mouse CD86 antibody 购自 R&D 公司。

### 2 动物

健康无热原雌性 BALB/c 小鼠, 体重 18-20 g, 由河北医科大学实验动物中心提供。

### 3 小鼠腹腔巨噬细胞的分离纯化及处理

脱颈处死小鼠, 75% 乙醇浸泡 5 min。用不完全 RPMI-1640 培养基 5 mL 反复灌洗腹腔, 收集灌洗液, 4 °C 离心 10 min。用完全 RPMI-1640 培养基 (含 20% FCS, 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 重悬细胞, 进行细胞计数和台盼蓝染色, 检测细胞存活率大于 95%, 调整细胞浓度至  $2 \times 10^9$  cells/L。接种到 24 孔板或 96 孔板内, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 培养 2 h 后洗去未贴壁细胞, 剩余贴壁细胞即巨噬细胞。

### 4 小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分离纯化

脱颈处死小鼠, 置 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌取脾脏, 置于冰冷的 PBS-buffer (含 0.2 mol/L EDTA、0.5% FCS) 中, 洗去血迹, 剪去脂肪和筋膜组织, 过 200 目钢网, 注射器针芯研磨, 收集细胞悬液于无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 8 min, 沉淀加 5 倍体积的溶血素, 吹打, 室温放置 5 min, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用 PBS-buffer 洗 1-2 次, 过 400 目滤网, 此为脾细胞, 计数细胞。按照说明书加入相应体积的 CD4 (L3T4) MicroBeads 磁珠及 PBS-buffer, 4 °C 孵育 15 min, 洗涤细胞, 过 MS 分选柱, 收集 CD4<sup>+</sup>T 细胞并计数。用流式细胞术鉴定 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分选效率及纯度, CD4<sup>+</sup>T 细胞的纯度大于 98%。用完全 RPMI-1640 培养基 (含 10% FCS、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 重悬细胞。

### 5 分析巨噬细胞的协同刺激活性

调整 CD4<sup>+</sup>T 细胞浓度至  $1 \times 10^9$  cells/L, 接种于 96 孔板中, 每孔  $2 \times 10^5$  细胞。用不同浓度的 CCK-8 和/或抗 B7.1 抗体、抗 B7.2 抗体、CCKAR 拮抗剂 CR1409、CCKBR 拮抗剂 CR2945 孵育细胞 24 h 后, 用培养基洗细胞 1-2 次, 以  $5 \times 10^4$  cells/well 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞共同培养, 加入 ConA 5 mg/L 刺激 T 细胞增生。每组设 5 个复孔, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h, 在培养结束前的 18 h, 每孔加入 [<sup>3H</sup>]-TdR ( $1 \times 10^{-2}$  mL/well,  $3.7 \times 10^{-2}$  GBq/well), 继续培养至实验结束。用多头细胞收集仪将各孔细胞收集于玻璃纤维滤纸上, 于 90 °C 干燥 1 h, 用  $\beta$ -液闪仪检测 [<sup>3H</sup>]-TdR 的掺入率代表 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增生, 以反映巨噬细胞的协同刺激活性。每分钟放射性计数值, 即 counts per minute (counts · min<sup>-1</sup>) 值, 取平均值表示脾细胞增殖活性。

### 6 流式细胞术检测巨噬细胞 B7.1/B7.2 蛋白表达

分离小鼠腹腔巨噬细胞, 用 CCK-8 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  mol/L) 孵育细胞 24 h, 在有些组中加入 CR1409 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  mol/L) 或 CR2945 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  mmol/L)。收集上述巨噬细胞, 用 PBS 洗细胞 1 次, 加入 FITC-抗 B7.1 或 FITC-抗 B7.2 抗体  $2 \times 10^{-3}$  mL (即  $1 \times 10^{-3}$  mg 抗体/ $4 \times 10^6$  细胞) 室温, 避光, 孵育 30 min; 生理盐水洗 2 次后, 上机检测。每次实验用同型抗体作为对照。用平均荧光强度 (mean channel fluorescence, MCF) 来表示 B7.1/B7.2 蛋白表达。

### 7 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 统计分析软件进行统计学分析。各组均数的比较行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 用最小显著差法

(least significant difference, LSD)作两两比较。

## 结 果

### 1 CCK - 8 增强小鼠腹腔巨噬细胞的协同刺激活性

CCK - 8 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  mol/L) 作用于小鼠腹腔巨噬细胞 24 h 后, 与  $CD4^+$  T 细胞共同培养, 加入 ConA 孵育细胞, 可剂量依赖性地使  $CD4^+$  T 细胞 [ $^3H$ ] - TdR 的掺入率升高, 即促进其增殖, 说明 CCK - 8 增强小鼠腹腔巨噬细胞的协同刺激活性(图 1)。

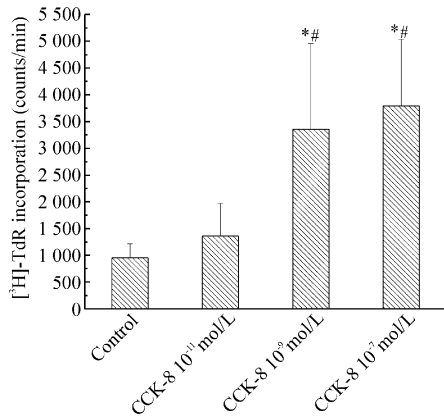


Fig 1 Effects of CCK - 8 on the costimulatory activity of T lymphocytes in unstimulated macrophages.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs CCK - 8  $10^{-11}$  mol/L group.

### 图 1 CCK - 8 对静息小鼠腹腔巨噬细胞协同刺激活性的影响

### 2 CCK - 8 致小鼠腹腔巨噬细胞表达 B7.1 及 B7.2 的剂量与时间效应

CCK - 8 ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  mol/L) 作用小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 可使巨噬细胞 B7.1 及 B7.2 的表达明显增加, 呈剂量依赖性,  $10^{-8}$  mol/L CCK - 8 可使两者的表达达到高峰(图 2)。B7 表达的时效结果表明,  $10^{-8}$  mol/L CCK - 8 作用 12 h 即可显著提高巨噬细胞 B7.2 的表达, 24 h 及 48 h 时有所下降, 但仍维持在较高水平; 而 B7.1 的表达于 24 h 开始明显增加, 48 h 达到高峰(图 3)。

### 3 CCK - 8 通过上调 B7.2 表达而增强巨噬细胞的协同刺激活性

应用抗 B7.1 抗体、抗 B7.2 抗体或同型对照 IgG 与 CCK - 8 共同孵育小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 与  $CD4^+$  T 细胞联合培养, 加入 ConA 孵育细胞, 结果显示抗 B7.2 抗体 + CCK - 8 组  $CD4^+$  T 细胞增殖明显低于 CCK - 8 组, 但抗 B7.1 抗体、同型对照 IgG 却无明显影响(图 4)。

### 4 CCK - 8 通过 CCK 受体调节巨噬细胞协同刺激活性

CCK1R 拮抗剂 CR1409 及 CCK2R 拮抗剂

CR2945 均可逆转 CCK - 8 作用下增强的巨噬细胞协同刺激活性, 且 CR1409 的作用强于 CR2945(图 5)。

## 讨 论

本结果表明, CCK - 8 增强了巨噬细胞的协同刺激活性, 同时上调了 B7.1、B7.2 的表达。B7 表达与

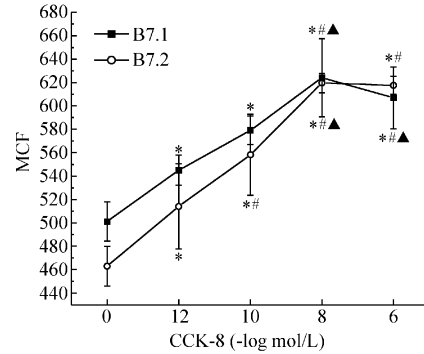


Fig 2 Effects of CCK - 8 on the B7.1 and B7.2 expressions of unstimulated macrophages.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs CCK - 8  $10^{-12}$  mol/L group;  $\Delta P < 0.05$  vs CCK - 8  $10^{-10}$  mol/L group.

### 图 2 CCK - 8 对静息巨噬细胞 B7.1 和 B7.2 表达的影响

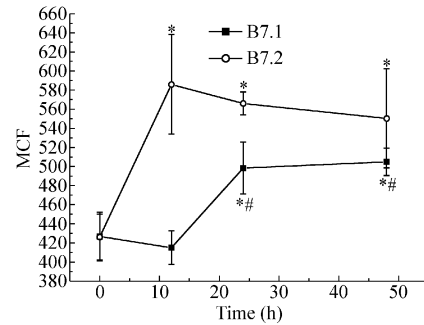


Fig 3 Time - dependent effects of CCK - 8 on B7.1 and B7.2 expression of unstimulated macrophages.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs 12 h group.

### 图 3 CCK - 8 对静息巨噬细胞 B7.1 和 B7.2 表达的时间依赖效应

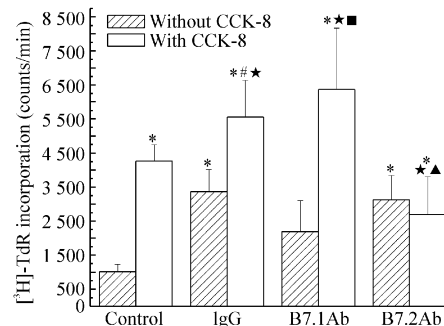


Fig 4 CCK - 8 enhanced costimulatory activity of macrophages by up - regulating B7.2 expression.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs anti - IgG group;  $\blacksquare P < 0.01$  vs anti - B7.1 group;  $\blacktriangle P > 0.05$  vs anti - B7.2 group; \*  $P < 0.05$  vs CCK - 8  $10^{-9}$  mol/L group.

### 图 4 CCK - 8 通过上调 B7.2 增强了巨噬细胞的协同刺激活性

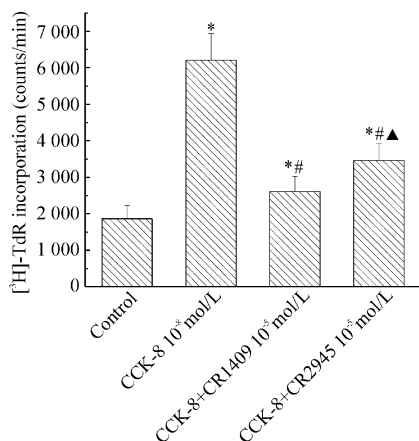


Fig 5 CCK-8 regulated costimulatory activity of macrophages through CCK1R and CCK2R.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.01$  vs CCK-8  $10^{-8}$  mol/L group; ▲ $P < 0.05$  vs CCK-8  $10^{-8}$  mol/L + CR1409  $10^{-5}$  mol/L group.

图5 CCK-8通过CCK1R和CCK2R共同调节巨噬细胞的协同刺激活性

巨噬细胞的协同刺激活性密切相关<sup>[4]</sup>。那CCK-8增强巨噬细胞的协同刺激活性的作用是否与其上调B7表达有关?本文应用B7抗体进行了中和试验,结果表明:B7.2抗体与IgG抗体均促进了巨噬细胞的协同刺激活性,表明两者可能作为一种外来抗原刺激了巨噬细胞的协同刺激活性,从而引起T细胞增生。而且在CCK-8存在的情况下,B7.1抗体与IgG抗体诱导的巨噬细胞的协同刺激活性进一步增强,表明CCK-8进一步刺激了巨噬细胞的协同刺激活性;但B7.2抗体使CCK-8引起的协同刺激活性下降,表明CCK-8是通过上调B7.2来增强巨噬细胞的协同刺激活性。

有研究报道,B7.2主要为CD4<sup>+</sup>T细胞提供协同刺激信号<sup>[5,6]</sup>,而B7.1则为CD8<sup>+</sup>T细胞提供强有力的协同刺激信号。本实验主要观察了巨噬细胞与CD4<sup>+</sup>T细胞共同培养时的协同刺激活性,因此,应用抗B7.1抗体未能使CCK-8引起的协同刺激活性下降,而抗B7.2抗体可以显著降低协同刺激信号,表明在巨噬细胞向CD4<sup>+</sup>T细胞提呈抗原的过程中,B7.2提供主要的协同刺激信号。Ganea等<sup>[4]</sup>对血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)和垂体腺苷酸环化酶活化多肽(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP)的研究亦有类似的结果,即VIP/PACAP通过上调B7.2来增强巨噬细胞的协同刺激活性。提示这些神经肽对巨噬细胞协同刺激活性的调节作用存在一些共性。

本实验应用CCK1、2受体拮抗剂CR1409和CR2945证实了CCK是通过其受体来起作用的。CCK-1R和CCK-2R共同介导了CCK-8调节巨噬细胞

协同刺激活性的作用;相同浓度(5-10 mol/L)的CR1409和CR2945比较,CR1409可以显著地增强巨噬细胞的协同刺激活性,两者有统计学差异。说明对于巨噬细胞的协同刺激活性CCK1R起主要介导作用。我们最近的研究证实了CCK-1R和CCK-2R mRNA在大鼠肺间质巨噬细胞内表达<sup>[7]</sup>,采用流式细胞也检测到小鼠腹腔巨噬细胞存在CCK1、2两种受体。CCK1、2受体在巨噬细胞的表达为CCK-8在巨噬细胞发挥作用提供了结构基础。

CCK-8是一种小分子多肽,通过特异性受体与免疫细胞相互作用,具有多种复杂的免疫调节功能。既往的研究表明:CCK-8可以抑制活化的巨噬细胞和T细胞的作用<sup>[7,8]</sup>。本文首次证实了CCK-8可增强巨噬细胞的协同刺激活性,并且通过CCK受体介导,与其上调B7.2表达有关。对于深入揭示CCK的免疫调节作用,探讨神经免疫调节网络的机制有重要意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] De la Fuente M, Medina S, Del Rio M, et al. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides[J]. Life Sci, 2000, 67(17): 2125-2135.
- [2] 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]. Chin Med J (English Issue), 2002, 115(2): 267-269.
- [3] 龚非力. 医学免疫学[M]. 第2版. 北京:科学出版社, 2004. 205-206.
- [4] Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001, 49(2): 101-110.
- [5] Manickasingham SP, Anderton SM, Burkhart C, et al. Qualitative and quantitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells *in vitro*[J]. J Immunol, 1998, 161(8): 3827-3835.
- [6] Zhang P, Martin M, Yang QB, et al. Role of B7 costimulatory molecules in immune responses and T-helper cell differentiation in response to recombinant HagB from Porphyromonas gingivalis[J]. Infect Immun, 2004, 72(2): 637-644.
- [7] Xu SJ, Gao WJ, Cong B, et al. Effect of lipopolysaccharide on expression and characterization of cholecystokinin receptors in rat pulmonary interstitial macrophages[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(10): 1347-1353.
- [8] Carrasco M, Hernanz A, De La Fuente M. Effect of cholecystokinin and gastrin on human peripheral blood lymphocyte functions, implication of cyclic AMP and interleukin 2[J]. Regul Pept, 1997, 70(2-3): 135-142.