

## • 论著 •

八肽胆囊收缩素对脂多糖攻击小鼠  
抗炎症细胞因子表达的影响

倪志宇 闫玉仙 丛军 徐锦荣 高峰 李淑瑾 马春玲 丛斌

**【摘要】** 目的 观察脂多糖(LPS)攻击小鼠白细胞介素-4(IL-4)、IL-10 的动态变化规律,以及八肽胆囊收缩素(CCK-8)对其表达的影响。方法 随机将小鼠分组,每组 7 只。腹腔注射 LPS 10 mg/kg,于攻击后 0、2、4、6 和 12 h 检测血清、肺组织 IL-4 和 IL-6 表达高峰的时间。对照组腹腔注射生理盐水 0.2 ml;LPS 组腹腔注射 LPS 10 mg/kg;LPS+CCK-8 组在注射 LPS 前 30 min 腹腔注射 CCK-8 60  $\mu$ g/kg;CCK-8 组腹腔注射 CCK-8 60  $\mu$ g/kg。用酶联免疫吸附法(ELISA)及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测各组小鼠血清和肺组织中 IL-4、IL-10 的含量及其 mRNA 的表达情况。结果 LPS 攻击后 2 h 血清及肺组织 IL-4、IL-6 均显著升高,血清 IL-4、IL-6 于 4 h 和 6 h 达高峰;肺组织 IL-4、IL-6 则均于 6 h 达高峰。说明 LPS 攻击可使小鼠血清及肺组织中 IL-4、IL-10 的蛋白及 mRNA 表达均增加;预先注入 CCK-8 可使 IL-4 和 IL-10 的蛋白以及 mRNA 表达均进一步增加( $P$  均 $<0.01$ );而单独注射 CCK-8 对血清、肺组织 IL-4、IL-10 的表达无明显影响。结论 CCK-8 可能通过进一步增加 LPS 攻击小鼠 IL-4、IL-10 的表达参与抗炎反应过程,从而减轻 LPS 引起的肺组织炎症反应。

**【关键词】** 缩胆囊素; 脂多糖; 白细胞介素-4; 白细胞介素-10

**Cholecystokinin octapeptide augments expression of anti-inflammatory cytokines in mice challenged by lipopolysaccharide** NI Zhi-Yu\*, Yan Yu-Xian, CONG Jun, XU Jin-Rong, GAO Feng, LI Shu-Jin, MA Chun-ling, CONG Bin.\* The College of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China  
Corresponding author: CONG Bin (Email: hbydcongbin@126.com)

**【Abstract】** **Objective** To observe the effects of cholecystokinin octapeptide (CCK-8) on the expression of anti-inflammatory cytokines interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in lipopolysaccharide (LPS) challenged mice. **Methods** Kunming mice were randomly assigned into four groups (each  $n = 7$ ): ① Intra-peritoneal injection of LPS (10 mg/kg), and the times of peak level of IL-4 and IL-6 expression in serum and lung tissue were noted at 0, 2, 4, 6 and 12 hours after challenge. ② Control group (intra-peritoneal injection of normal saline 0.2 ml). ③ LPS+CCK-8 group (intra-peritoneal injection of CCK-8 60  $\mu$ g/kg 30 minutes before giving LPS). ④ CCK-8 group (intra-peritoneal injection injection CCK-8 60  $\mu$ g/kg) at different time points. The expressions of IL-4 and IL-10 in the serum and lung tissues were assayed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Two hours after LPS challenge, IL-4 and IL-6 were increased significantly in serum and lung tissue. At 4 hours and 6 hours, serum IL-4 and IL-6 reached their peak levels, while in lung tissue they reached their peak levels at 6 hours. Pre-treatment of CCK-8 augmented IL-4 and IL-10 expressions in LPS challenged mice (both  $P < 0.01$ ). But single CCK-8 injection showed no significant effect on IL-4 and IL-10 in serum and lung tissue. **Conclusion** CCK-8 is involved in the anti-inflammatory response by increasing the expressions of IL-4, IL-10 in LPS challenged mice, and in turn it alleviates the inflammatory response in lung tissue.

**【Key words】** cholecystokinin octapeptide; lipopolysaccharide; interleukin-4; interleukin-10

在全身炎症反应综合征(SIRS)发展的过程中,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270529);河北省科技厅博士基金资助项目(06547008D)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学基础医学院(倪志宇,闫玉仙,徐锦荣,高峰,李淑瑾,马春玲,丛斌);051530 河北赵县医院(丛军)

通讯作者:丛斌,医学博士,教授,博士生导师(Email:hbydcongbin@126.com)

作者简介:倪志宇(1975-),女(汉族),河北省人,医学博士,讲师(Email:nzy0603@126.com)。

机体在释放促炎症细胞因子的同时,亦可分泌抗炎细胞因子以维持机体内环境的稳定<sup>[1]</sup>。白细胞介素-4(IL-4)、IL-10 即为强有力的抗炎细胞因子,它们在炎症的发生发展过程中主要起抗炎和免疫调节作用<sup>[2]</sup>。八肽胆囊收缩素(CCK-8)属小分子肽类物质,参与调节中枢神经、内分泌、免疫等多系统机能活动。本实验室对 CCK-8 的系列研究表明,CCK-8 具有抗内毒素休克(ES)作用,可通过抑制脂多糖(LPS)诱导的血管内皮细胞核转录因子- $\kappa$ B

(NF- $\kappa$ B)及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达上调,从而抑制过量生成的NO及其衍生物过氧亚硝基阴离子而发挥抗ES的作用<sup>[3-4]</sup>。在ES大鼠肺组织及肺间质巨噬细胞,CCK-8可抑制LPS诱导的CD14、Toll样受体4(TLR4)的表达及NF- $\kappa$ B的活性,并抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 的表达而发挥抗炎作用<sup>[5-8]</sup>。但CCK-8对ES时IL-4、IL-10等抗炎症细胞因子的调控目前尚未见报道。本实验主要观察LPS攻击小鼠的血清、肺脏IL-4、IL-10含量的动态变化以及CCK-8对其表达的影响,以探讨CCK-8是否通过调控抗炎症细胞因子的表达而发挥抗炎作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂:**大肠杆菌 E. Coli O111:B4 LPS、硫酸化CCK-8为美国Sigma公司产品;小鼠IL-4、IL-10酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒分别为美国PIERCE公司及法国Diacclone公司产品;IL-6引物由北京赛百盛生物公司合成; $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、IL-4、IL-10引物由上海Sangon公司合成。

**1.2 实验分组:**雄性昆明小鼠119只,体重18~22g,由河北省实验动物中心提供。按随机数字表法分组,每组7只。分别于腹腔注射LPS 10 mg/kg攻击后0、2、4、6和12h检测各细胞因子的表达高峰期。检测CCK-8对LPS攻击小鼠IL-4、IL-10表达的作用,在同一时间点分为4组:①对照组:腹腔注射生理盐水0.2 ml;②LPS组:腹腔注射LPS 10 mg/kg;③LPS+CCK-8组:腹腔注射LPS前30 min腹腔注射CCK-8 60  $\mu$ g/kg;④CCK-8组:腹腔注射CCK-8 60  $\mu$ g/kg。

**1.3 血清及肺脏中各细胞因子的测定:**按时间点摘除眼球取血,离心收集血清,并迅速摘取肺脏。将肺组织标本置于液氮中(左肺提取RNA、右肺测量细胞因子)、血清样本存于-80℃待分析。冻存的组织标本称重后于4℃下用磷酸盐缓冲液(PBS)进行匀浆〔含1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF),1 mg/L胃蛋白酶抑制剂A,1 mg/L抑肽酶,1 mg/L亮抑肽酶,5 g/L Triton X-100,pH 7.2〕,15 000 r/min(离心半径4.5 cm)离心10 min。使用ELISA分析血清及组织上清中IL-4、IL-10浓度,操作按试剂盒说明书进行。

**1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测IL-4、IL-10的mRNA表达:**用TRIzol Reagent提取组织总RNA。取4.0  $\mu$ g总RNA,65℃变性

5 min,逆转录酶42℃逆转录30 min,合成cDNA。取5  $\mu$ l cDNA,依次加入10 $\times$ PCR缓冲液,上、下游引物各50 pmol,dNTP 0.2 mmol/L,MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L,Taq DNA polymerase 1 U;以下列条件进行扩增:94℃3 min,94℃45 s,51.3℃45 s(IL-10),55℃45 s(IL-4, $\beta$ -actin),72℃45 s,进行30次循环后进一步延伸72℃5 min。

根据Genebank中IL-4、IL-10的cDNA序列,用引物设计软件Primer5设计特异性引物,序列见表1。

表1 IL-4、IL-10的cDNA序列特异性引物设计  
Table 1 Primer design of IL-4 and IL-10 cDNA

指标	引物序列	序列号	扩增长度
IL-4	上游 5'-GTT GTC ATC CTG CTC TTC-3'	NM_021283	171 bp
	下游 5'-CTC TGT GGT GTT CTT CGT-3'		
IL-10	上游 5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC C-3'	NM_010548	367 bp
	下游 5'-CAA GGA GTT GTT TCC GTT A-3'		
$\beta$ -actin	上游 5'-CTG TCC CTG TAT GCC TCT-3'	NM_007393	218 bp
	下游 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC-3'		

扩增产物经质量分数为1.8%的琼脂糖凝胶电泳。用Gel-pro凝胶分析软件对电泳谱带进行半定量分析,用任意单位(AU)表示凝胶谱带的面积 $\times$ 荧光强度值,各细胞因子与 $\beta$ -actin的AU比值代表各mRNA相对表达水平。

**1.5 统计学分析:**采用SPSS统计分析软件,数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组均数比较行单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差法(LSD)进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LPS攻击小鼠血清及肺组织IL-4和IL-10表达高峰(表2):**LPS攻击后2h各组血清及肺组织IL-4、IL-10均显著升高;血清中IL-4、IL-10表达于4h和6h达高峰,肺组织中表达则均于6h达高峰;血清和肺组织IL-4、IL-10表达高峰时间点浓度与其他时间点比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

**2.2 CCK-8对LPS攻击小鼠血清及肺组织中IL-4、IL-10表达的影响(表3,表4):**CCK-8预处理(LPS+CCK-8组)可使血清和肺组织IL-4、IL-10浓度均较同时时间点的LPS组进一步升高( $P$ 均 $<0.01$ ),但升高幅度不同,其中:4h和12h血清IL-4浓度分别升高59.7%和35.1%( $P$ 均 $<0.01$ ),6h和12h血清IL-10浓度分别升高73.6%和56.2%( $P$ 均 $<0.01$ );6h和12h肺组织IL-4浓度分别升高40.8%和24.0%( $P$ 均 $<$

0.01), 6 h 和 12 h 肺组织 IL-10 浓度分别升高 45.9% 和 27.0% ( $P$  均  $< 0.01$ )。单独注射 CCK-8 而对血清和肺组织 IL-4、IL-10 的表达均无明显影响。

表 2 LPS 不同时间攻击小鼠血清、肺组织 IL-4、IL-10 含量的变化 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 2 Change of the contents of IL-4, IL-10 in the serum and lung of LPS challenged mice at different time points ( $\bar{x} \pm s, n=7$ ) ng/L

组别	血清		肺	
	IL-4	IL-10	IL-4	IL-10
LPS 0 h 组	37.76 ± 7.17	...	44.92 ± 7.17	...
LPS 2 h 组	102.25 ± 14.33* △	38.09 ± 6.90* ▲	173.91 ± 7.17* ▲	77.23 ± 13.55* ▲
LPS 4 h 组	196.12 ± 11.59*	56.15 ± 9.40* ▲	263.48 ± 16.42* #	113.36 ± 18.07* ▲
LPS 6 h 组	161.97 ± 18.03* ●	106.13 ± 10.95*	287.76 ± 20.99*	191.03 ± 10.87*
LPS 12 h 组	123.41 ± 9.25* △	68.07 ± 10.34* ▲	201.17 ± 12.98* ▲	145.07 ± 15.78* ▲

注:与 LPS 0 h 组比较;\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 4 h 组比较;●  $P < 0.05$ , △  $P < 0.01$ ;与 LPS 6 h 组比较;#  $P < 0.05$ , ▲  $P < 0.01$ ;  
...为未发现

表 3 CCK-8 对 LPS 攻击小鼠血清 IL-4、IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 3 Effects of CCK-8 on contents of IL-4, IL-10 in the serum of LPS challenged mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ ) ng/L

组别	mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )			
	IL-4		IL-10	
	4 h	12 h	6 h	12 h
对照组	43.73 ± 9.02	48.27 ± 9.62	...	...
LPS 组	193.02 ± 10.95*	126.14 ± 10.95*	104.33 ± 11.95*	69.70 ± 10.43*
LPS+CCK-8 组	308.15 ± 11.24* △	170.33 ± 9.48* △	181.11 ± 9.03* △	108.84 ± 16.28* △
CCK-8 组	47.31 ± 14.92	44.92 ± 21.50	...	...

注:与对照组比较;\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较;△  $P < 0.01$ ;  
...为未发现

表 4 CCK-8 对 LPS 攻击小鼠肺组织 IL-4、IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 4 Effects of CCK-8 on contents of IL-4, IL-10 in the lung of LPS challenged mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ ) ng/L

组别	mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )			
	IL-4		IL-10	
	6 h	12 h	6 h	12 h
对照组	52.09 ± 7.17	53.28 ± 16.16	...	...
LPS 组	276.84 ± 16.42*	203.77 ± 14.48*	187.13 ± 11.37*	144.97 ± 16.28*
LPS+CCK-8 组	389.83 ± 19.50* △	252.74 ± 16.42* △	272.94 ± 13.80* △	184.12 ± 9.40* △
CCK-8 组	47.31 ± 18.03	41.33 ± 19.95	...	...

注:与对照组比较;\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较;△  $P < 0.01$ ;  
...为未发现

2.3 CCK-8 对 LPS 攻击小鼠肺组织 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达的影响 (图 1, 图 2): 对照组及 CCK-8 组均表达少量 IL-4 mRNA 和

IL-10 mRNA。注射 LPS 6 h 后,肺组织 IL-4 和 IL-10 的 mRNA 表达均显著升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); CCK-8 预处理可使肺组织 IL-4 和 IL-10 的 mRNA 表达较 LPS 组进一步升高 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

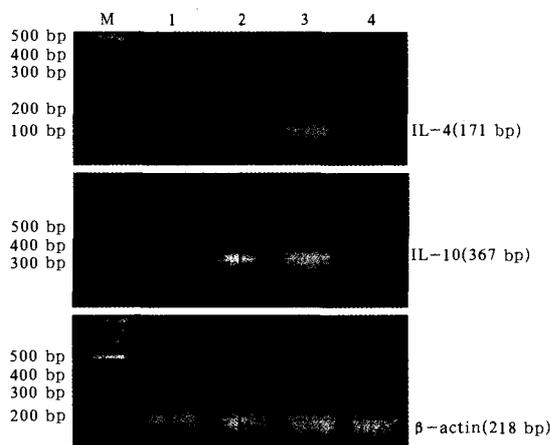
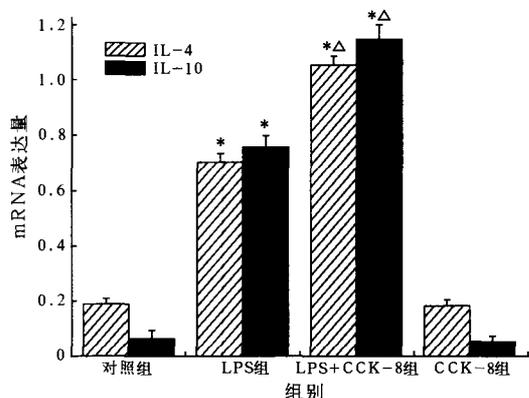


图 1 RT-PCR 检测 CCK-8 对 LPS 攻击小鼠肺组织 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达的影响

Figure 1 Expressions of IL-4 and IL-10 mRNA increased by CCK-8 in the lung of LPS challenged mice detected by RT-PCR



注:与对照组比较;\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较;△  $P < 0.01$

图 2 CCK-8 对 LPS 攻击小鼠肺组织 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达的影响

Figure 2 Expressions of IL-4 and IL-10 mRNA increased by CCK-8 in the lung of LPS challenged mice

### 3 讨论

炎症失控导致 SIRS 与代偿性抗炎反应综合征 (CARS) 失衡是多器官功能障碍综合征 (MODS) 的主要发病机制。失控的炎症反应中不仅有炎症介质过度释放,而且伴有内源性抗炎介质的不足或过度释放,两者均可加重炎性损害,最终导致多器官功能障碍、衰竭以至死亡<sup>[1]</sup>。在 MODS 发生发展的病理过程中,肺脏是公认的较早发生功能障碍的器官<sup>[9]</sup>。减轻过度的炎症反应是控制 MODS 时肺损伤的重要措施。

本研究发现, LPS 刺激可诱导小鼠血清及肺组织 IL-4、IL-10 的表达, 说明抗炎介质参与了炎症反应过程。而预先注入 CCK-8 可使 LPS 攻击小鼠血清及肺组织 IL-4、IL-10 的表达进一步增加。结合前期的系列研究我们认为, CCK-8 通过抑制促炎症细胞因子<sup>[5-8]</sup>、促进 IL-4、IL-10 等抗炎症细胞因子的表达参与机体抗炎反应过程, 这与血管活性肠肽/腺苷酸环化酶激活肽(VIP/PACAP)和 Adiponectin 等通过抑制促炎介质、增加抗炎介质的表达从而抑制炎症反应的报道相似<sup>[10-11]</sup>。已知抗炎介质的表达升高在炎症反应早期对于控制炎症、维持机体内环境的稳定是有利的; 而抗炎介质过量, 即可产生免疫功能抑制和对感染易感性增加。我们发现, 注入 CCK-8 后 4 h 和 6 h, LPS 攻击小鼠血清及肺组织 IL-4、IL-10 表达增加幅度要大于注入 CCK-8 后 12 h。提示在炎症不同阶段, CCK-8 通过机体的某些反馈和代偿机制, 较为精密地调节着炎症反应: 即在炎症相对早期, 增加抗炎介质以抑制炎症反应; 在炎症相对晚期, 减少抗炎介质的增加程度来控制 CARS。

当然, 要想保持 SIRS/CARS 之间的平衡, 必须了解机体处于何种状态。目前在临床上对于炎症过激及免疫抑制状态还缺乏迅速可靠的判断指标。有学者指出, 可以将单核细胞的人类白细胞 DR 抗原(HLA-DR)表达量降至 30% 以下作为 CARS 发生的一个标志<sup>[12-13]</sup>。因此, 若能在动物模型中结合 HLA-DR 的表达及其他指标判断出机体所处的免疫状态, 进而研究 CCK-8 在炎症反应不同阶段对细胞因子表达的影响及调控, 将有助于更加深入了解 CCK-8 的抗炎机制。

我们检测了肺组织细胞因子 mRNA 的表达。结果发现, 各细胞因子 mRNA 的变化趋势与蛋白水平一致, 提示 CCK-8 对细胞因子的调控作用发生在转录水平。

本研究显示, 各细胞因子在 LPS 攻击小鼠血清及肺组织表达高峰的时间、量及 CCK-8 对其影响程度并不一致。结合细胞因子的生物学特性并分析二者不平行的原因<sup>[14]</sup>, 我们认为, 肺组织炎症介质水平与肺的损伤程度具有更好的相关性。

目前, SIRS 与 CARS 的防治仍然是困扰医务工作者的难题。CCK-8 通过抑制促炎症细胞因子, 同时激活抗炎症细胞因子的表达而抑制过度的炎症反应, 提示我们在一些急、慢性炎症相关性疾病的治疗中, CCK-8 可能是一种潜在有效的治疗因子。

#### 参考文献:

- Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma [J]. *Injury*, 2005, 36(6): 691-709.
- 孙卫民, 王慧琴. 细胞因子研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1-8.
- 高峰, 谷振勇, 平静, 等. 八肽缩胆囊素调节脂多糖诱导 ECV-304 细胞核转录因子- $\kappa$ B 表达的受体机制研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(3): 150-153.
- 闫骏, 谷振勇, 王杏云, 等. 八肽缩胆囊素对脂多糖诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶表达变化的抑制作用 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2): 96-100.
- Cong B, Li S J, Yao Y X, 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.
- 丛斌, 凌亦凌, 谷振勇, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 活性增高的抑制作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(6): 615-618.
- 李淑瑾, 姚玉霞, 朱桂军, 等. 八肽胆囊收缩素抑制脂多糖诱导的大鼠肺间质巨噬细胞 TNF- $\alpha$  及 NF- $\kappa$ B 活性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(4): 635-638.
- 倪志宇, 李淑瑾, 丛斌, 等. CCK-8 抑制 LPS 诱导的大鼠肺间质巨噬细胞 TLR4 及 IL-1 $\beta$  的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2005, 25(2): 137-140.
- Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2): 145-156.
- 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.
- Wulster Radcliffe M C, Ajuwon K M, Wang J, et al. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 924-929.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L L, et al. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity [J]. *Shock*, 2001, 16(2): 83-96.
- Yoshida S. Monocyte HLA-DR expression as predictors of clinical outcome for patients with sepsis [J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(12): 2281-2284.
- Pittet J F, Mackersie R C, Martin T R, et al. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155(4): 1187-1205.

(收稿日期: 2007-02-14 修回日期: 2007-09-11)

(本文编辑: 李银平)

更正: 本刊 2007 年第 9 期第 568 页发表的“压力支持非侵入性正压通气治疗急性心源性肺水肿”一文 1.1 一般资料中, “选择由心源性肺水肿导致的急性呼吸衰竭患者 22 例, 均进行气管插管机械通气治疗。”应该为“选择 22 例由心源性肺水肿导致的急性呼吸衰竭、需进行气管插管治疗患者”。对由于编校失误给作者和读者造成的影响表示歉意。

(本刊编辑部)