

# 催乳素对外周血 T 细胞巨噬细胞移动抑制因子表达的影响

郭继强, 宋向凤, 牛志国

(新乡医学院免疫学教研室, 河南 新乡 453003)

[摘要] 目的: 观察催乳素(PRL)对人外周血 T 细胞分泌巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibition factor, MIF)的调节作用。方法: 采用 FicolHypaque 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞, 再经尼龙棉柱过滤法纯化 T 细胞。采用植物凝集素(PHA, 10 μg/ml)和乙酸豆蔻佛波酯(PMA, 5 μg/ml)刺激 T 细胞活化, 再分别加入不同浓度的催乳素(20 300 1 000 ng/ml)进行干预。细胞培养 24 h 后收集细胞, RT-PCR 法检测外周血 T 细胞 MIF 基因表达水平; ELISA 法检测 T 细胞培养液上清中的 MIF 含量。同时将 MIF 荧光素酶报告基因(pGL3-BasicMIF)转染各组 T 细胞, 检测各转染组的荧光素酶相对活性。结果: 各催乳素处理组的 MIF 基因的表达水平、细胞培养上清的 MIF 浓度和 MIF-luc 报告基因的荧光素酶相对活性比对照组显著增高。结论: 催乳素可增强外周血 T 细胞表达和分泌巨噬细胞移动抑制因子。

[关键词] 催乳素; T 细胞; 巨噬细胞移动抑制因子; 报告基因

[中图分类号] R392.1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-7783(2008)01-0030-04

## Effects of prolactin regulating the expression of macrophage migration inhibition factor derived from human peripheral blood T cell

GUO Ji-qiang, SONG Xiang-feng, NIU Zhi-guo

(Department of Immunology, Xinxiang Medical College, Xinxiang Henan 453003 China)

[Abstract] **Objective** To study regulating effects of prolactin on the expression and secretion of MIF in human peripheral blood T cells. **Methods** Mononuclear cells were obtained from human peripheral blood by the method of FicolHypaque density gradient centrifugation. T cells were collected by nylon column. PHA (10 μg/ml) and PMA (5 μg/ml) were added into the medium to active the T cells. Different concentration PRL (20 300 1000 ng/ml) were applied to T cells at the same time. T cells were collected after cultured for 24 h. the expression level of MIF gene was detected by RT-PCR and the content of MIF in T cell supernatant was assayed by ELISA. MIF-luc report gene were transfected into each group that method above, the relative luciferase activity of MIF-luc report gene was tested by kit. **Results** The expression of MIF, the concentration of MIF in culture supernatant and the relative activity of MIF-luc report gene were significantly increased in each PRL treated group compared with control group. **Conclusion** PRL had significant efforts to increase the expression and secretion of MIF derived from T cells.

[Key words] prolactin; T cell; macrophage migration inhibition factor; report gene

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是由垂体分泌的应激性激素,属于相对分子质量小的蛋白质。在垂体外组织中 MIF 主要由活化的 T 细胞分泌,巨噬细胞则为 MIF 作用的主要靶细胞, MIF 可抑制巨噬细胞的游走,促进巨噬细胞分泌炎症因子来发挥其促炎作

用<sup>[1]</sup>。MIF 在炎症反应、感染性休克和机体变态反应中都具有重要的作用<sup>[2]</sup>。催乳素(prolactin, PRL)也是垂体分泌的应激性激素,多种淋巴细胞可表达催乳素受体,因此催乳素对免疫细胞有着重要的调节作用。许多研究表明催乳素在免疫应答中有着相似的作用,表现为催乳素与 MIF 都可以促进淋巴细

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究资助项目(200510472009)

[作者简介] 郭继强(1972-),男,河南开封人,讲师,硕士,主要研究激素对免疫功能的影响。

细胞的增殖, 在炎症反应中抑制淋巴细胞的凋亡, 促进自身免疫损伤的发生等<sup>[3,4]</sup>。另外 MIF 与催乳素都表现出了对于糖皮质激素的拮抗作用, 如两者都可抑制糖皮质激素诱导的淋巴细胞的凋亡<sup>[5,6]</sup>。我们推测催乳素与 MIF 在“神经-内分泌-免疫”的调节网络中可能存在相互调节作用, 这类似于细胞因子相互之间的调节作用。近年研究表明催乳素对 T 细胞有着重要的调节作用, 可增强其分泌 IL-2 等细胞因子<sup>[7]</sup>, 而 T 细胞又是分泌 MIF 的重要细胞, 因此催乳素是否通过影响 T 细胞 MIF 的表达与分泌来发挥促炎作用, 无疑成为催乳素功能研究的重要问题, 特别是对于揭示催乳素在局部炎症反应及自身免疫疾病中的作用机制具有重要的意义。

本研究以 PHA 和 PMA 活化的人外周血 T 细胞为实验模型<sup>[8]</sup>, 并用不同浓度的催乳素 (20 300 和 1 000 ng/ml) 分别为催乳素生理浓度、女性妊娠期催乳素浓度上限和病理状态催乳素浓度上限<sup>[9]</sup> 干预 T 细胞表达 MIF 的过程, 以分析催乳素对于 T 细胞表达和分泌 MIF 的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

主要试剂: 健康人外周血 (新乡医学院第一附属医院); 催乳素, 植物凝集素, 乙酸豆蔻佛波酯 (Sigma); 淋巴细胞分离液 (上海生工); T 细胞尼龙毛柱 (Gibco 公司); TransFast™ Reagent (Promega); MIF-荧光素酶报告基因 (pGL3-Basic-MIF, 英国 Manchester 大学 A. Lourfi 博士惠赠); pGL3-Basic, pGL3-Control, 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega); RT-PCR 试剂盒 (Takara); MIF EIA Kit 试剂盒 (Chemicon)。

### 1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检查 MIF 基因的表达 细胞总 RNA 的提取: 于 24 h 收集细胞 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清, PBS 洗涤 1 次, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 取 5 μl RNA 进行琼脂糖电泳。MIF 及内参 GAPDH 引物的合成: MIF 引物 (399 bp) 正义 5'-TTCCCTCTCCGAGCTCACG-3', 反义 5'-CGTT-TATTTCTCCCCACCAG-3'。GAPDH 引物 (639 bp): 正义 5'-AGCTCCACTGGCGTCTTCAC-3', 反义 5'-GCTTGA CAAAGTGGTCGTTGAG-3'。RT-PCR 法检查 MIF 基因的表达: 按逆转录试剂盒说明书进行。取 10 μl PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统检测。

1.2.2 T 细胞培养液上清中 MIF 浓度测定 采用 ELISA 法按产品说明书操作: 各组细胞 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清加入 96 孔板, 每孔 10 μl 每组设 3 个复孔。同时设空白对照孔 (加入 10 μl 完全 RPMI 640) 和标准品 (各 10 μl)。于每孔加入 90 μl MIF-HRP 抗体, 混匀, 室温孵育 120 min, 弃去孔内液体, 洗涤 5 次后, 每孔加入底物液 100 μl 避光室温孵育 30 min 后, 每孔加入终止液 100 μl 终止反应, 立即于酶标仪波长 450 nm 读取 D 值, 根据样品的 D 值由标准曲线查出相应的浓度。

1.2.3 MIF 荧光素酶报告基因 (pGL3-Basic-MIF) 转染试验 ①质粒 DNA 的纯化: 将质粒 pGL3-Basic-MIF, pGL3-Basic, pGL3-Control 和 pSVβ-gal 分别转化细菌, 获得转化菌, 用质粒大提试剂盒按产品说明书提取质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 纯度, 用蛋白核酸分析仪检测质粒 DNA 含量及纯度 ( $D_{260}/D_{280} > 1.8$  为合格)。④质粒 DNA 瞬时转染 T 细胞: 按照 TransFast™ Reagent 产品说明书进行操作。④药物干预: 转染 5 h 后各转染组加入终浓度 1 mg/L PHA, 其中 pGL3-Basic-MIF 转染组加入终浓度为 0 20 300 和 1 000 μg/L 的催乳素, 加药后置于 37°C、体积分数为 0.05 CO<sub>2</sub> 继续培养。④荧光素酶相对活性测定: 用 β-gal ELISA 检测试剂盒及酶标仪检测各组 β-半乳糖苷酶活性 (D 值)。④荧光素酶相对活性的计算方法: 荧光酶活性校正值 = 荧光素酶光强度值 / β-gal D 值, 荧光素酶相对活性 = 各组荧光酶活性校正值 / pGL3-Basic 转染组校正值。

1.2.4 统计学处理 样本 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳条带的灰度分析采用 Band Leader Application Version 3.00 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 差异显著性用单因素方差分析 (One-Way Anova) 和 LSD 法。

## 2 结果

### 2.1 分离纯化的 T 细胞纯度检测

图 1 为分离纯化的 T 细胞经 FITC 标记的 CD3 单克隆抗体染色后, 以流式细胞仪检测细胞表面 CD3 分子的表达阳性率, 结果显示细胞的阳性率为 90.3%, 符合 T 细胞阳性率 > 85% 的实验要求。

### 2.2 RT-PCR 检测各组 T 细胞 MIF 基因表达水平

对照组、催乳素 20 ng/ml 组、催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组 MIF/GAPDH (灰度比) 均值分别为  $0.740 \pm 0.07$ ,  $0.740 \pm 0.07$ ,  $0.814 \pm 0.090$

和  $0.804 \pm 0.09$ 。各浓度催乳素处理组 *MIF* 基因表达比对照组明显升高, 催乳素 20 ng/ml 组、催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组 *MIF*/GAPDH (灰度比) 均值分别为对照组的 1.05、1.10 和 1.86 倍,  $P < 0.05$ 。但是各浓度催乳素处理组之间比较, 差异无统计学意义,  $P > 0.05$ 。见图 2。

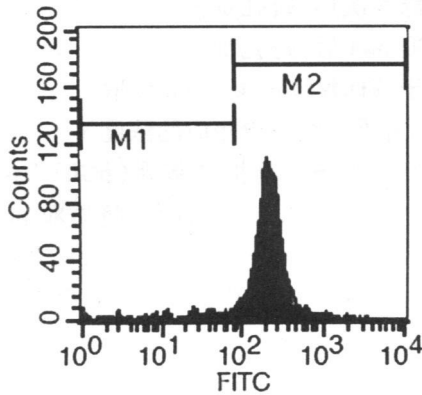
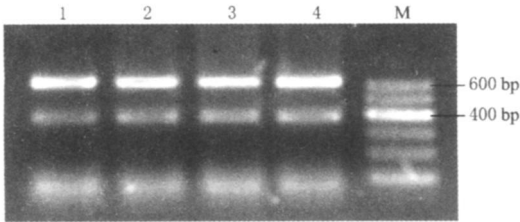


图 1 CD3表达的细胞阳性率流式检测结果

Fig 1 Results of positive cell rate of CD3 expression



1~4 对照组、催乳素 20 ng/ml 组、催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组; M: 标准参照物。RT-PCR 产物中 *MIF* 扩增产物带为 399 bp, GAPDH 扩增产物带为 630 bp, 各孔上样量为 5  $\mu$ l

图 2 1%琼脂糖凝胶电泳检测 *MIF* RT-PCR 产物  
Fig 2 RT-PCR products tested by 1% agarose gel electrophoresis

### 2.3 各组 T 细胞培养上清中 *MIF* 含量检测结果

对照组、催乳素 20 ng/ml 组、催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组 *MIF*/GAPDH (灰度比) 均值分别为  $28.2 \pm 1.83$ ,  $33.6 \pm 2.25$ ,  $68.2 \pm 4.17$  和  $65.3 \pm 4.09$ 。各催乳素处理组细胞培养上清 *MIF* 含量比对照组明显升高, 催乳素 20 ng/ml 组、催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组 *MIF* 浓度均值分别为对照组的 1.19 倍 ( $P < 0.05$ ), 2.41 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 2.31 倍 ( $P < 0.01$ )。但催乳素 300 ng/ml 组和催乳素 1000 ng/ml 组之间比较, 差异无统计学意义,  $P > 0.05$ 。

### 2.4 *MIF* 荧光素酶报告基因转染荧光素酶相对活性检测结果

图 3 中结果说明催乳素处理组的荧光素酶相对活性明显高于对照组, 其中 20、300 和 1000  $\mu$ g/L

催乳素处理组的荧光素酶相对活性均值分别为对照组的 1.39、1.92 和 1.94 倍,  $P < 0.01$ 。这提示催乳素能够协同 PHA 和 PMA 提高 T 细胞内 *MIF* 启动子的活性, 促进 *MIF* 基因的表达。

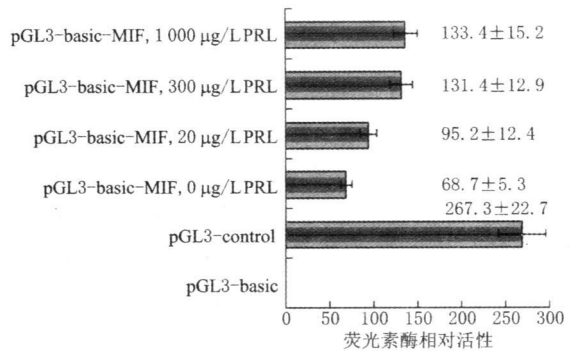


图 3 各组报告基因转染荧光素酶相对活性结果

Fig 3 Results of relative luciferase activity of each transfected group  $\bar{x} \pm s$

## 3 讨论

催乳素是人体非常重要的激素, 催乳素受体在体内绝大部分的组织细胞都有表达, 对机体的多种生理功能有着广泛的调节作用。催乳素在炎症反应和自身免疫病中的作用越来越引起人们的重视。*MIF* 在机体炎症反应中起着重要的作用, *MIF* 可活化并聚集巨噬细胞, 刺激  $\text{IL-1}$ 、 $\text{IL-6}$  和  $\text{TNF-}\alpha$  等炎症因子的产生, 在内毒素休克、脓毒血症和自身免疫病中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。催乳素是否可通过影响 T 细胞表达 *MIF* 来发挥其对于炎症反应的促进作用越来越引起人们的兴趣。

因为催乳素单独不能诱导 T 细胞活化, 本实验以 PHA 和 PMA 联合刺激人外周血 T 细胞以活化 T 细胞并诱导 T 细胞分泌 *MIF*<sup>[10]</sup>。RT-PCR 检测各组 T 细胞 *MIF* 基因的表达水平结果表明即使生理浓度的催乳素 (20 ng/ml) 便可提高 *MIF* 基因的表达, 高浓度组催乳素 (300、1000 ng/ml) 此作用更加明显。T 细胞培养上清中 *MIF* 含量检测结果还表明催乳素不但能促进 *MIF* 基因的表达, 还可增强 T 细胞分泌 *MIF*, 而且高浓度组催乳素的作用明显高于生理浓度组。上述结果提示在免疫应答中催乳素能够促进 T 细胞表达 *MIF* 基因, 并增强其分泌 *MIF*, 来发挥催乳素的促炎作用。如在病原微生物感染引起的炎症反应中, 催乳素可能会通过增强 T 细胞分泌 *MIF*, 来提升巨噬细胞的聚集和活化, 以促进免疫应答的进行。

在感染引起的炎症反应中, 大量的淋巴细胞在

抗原刺激下及炎症因子的作用下会出现活化诱导凋亡 (AICD), 从而产生对免疫应答的负面效应。但是有研究表明在创伤性感染患者中, 高分泌催乳素的女性致死率远低于男性<sup>[11]</sup>, 这可能是因为催乳素可通过下调淋巴细胞凋亡相关蛋白的表达来抑制淋巴细胞的凋亡, 从而降低了炎症反应所致的免疫细胞损伤。这说明催乳素一方面可通过刺激 T 细胞分泌 MIF 来促进炎症反应的发生, 又可减少炎症反应中免疫细胞的凋亡, 从而有效地维持免疫应答水平, 并及时清除病原微生物, 以发挥其对于机体的保护作用。对于高催乳血症患者或妊娠期女性, 机体内高浓度的催乳素有可能不断促进 T 细胞表达 MIF, 导致局部炎症反应的持续进行, 从而易引发自身免疫病。系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎等病例中往往会同时检测到血清中高水平的催乳素和 MIF, 可能与此机制有关。

MIF 荧光素酶报告基因转染试验结果表明, 催乳素可以提高 MIF 启动子的活性。20 300 和 1 000  $\mu\text{g/L}$  催乳素处理组的荧光素酶相对活性均值分别为对照组的 1.39, 1.92 和 1.94 倍。MIF 基因调控序列上有 NF- $\kappa\text{B}$ , Sp-1 和 CRE 等顺式作用元件, 而催乳素与其细胞表面受体结合后可通过“Jak2/Stat”途径向细胞内传递活化信号, 可以诱导 NF- $\kappa\text{B}$ , Sp-1 和 CRE 等转录因子的表达<sup>[12]</sup>, 催乳素受体的信号有可能会直接增强 MIF 启动子的活性。另外在各组 T 细胞 MIF 基因的表达水平的检测结果、T 细胞培养上清 MIF 检测结果和 MIF 报告基因转染实验结果中, 300 和 1 000  $\mu\text{g/L}$  催乳素处理组之间均无显著差异, 这可能与细胞表面的催乳素受体出现饱和现象有关。相信本方向的研究将进一步明确催乳素在神经-内分泌-免疫网络调节中的作用, 特别是对于进一步阐明催乳素在炎症反应和自身免疫病中的作用将起到重要作用。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, et al Macrophage migration inhibitory factor in patients with preterm parturition and microbial invasion of the amniotic cavity[ J]. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005, 18(6): 405- 416
- [ 2 ] 刘进军, 胡川闽. 巨噬细胞移动抑制因子分子作用机制的研究进展 [ J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2006 26(5): 285- 287
- [ 3 ] Carreno PC, Saced n R, Jim nez E, et al Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors[ J]. *J Neuroimmunol* 2005, 160(1/2): 135- 145.
- [ 4 ] Buckley AR, Buckley DJ Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells[ J]. *Ann N Y Acad Sci* 2000 917: 522- 533
- [ 5 ] Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ et al Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo[ J]. *Endocrinology* 2003, 144(5): 2102- 2110.
- [ 6 ] Tiemey T, Patel R, Stead CA. Macrophage migration inhibitory factor is released from pituitary follicle-stellate like cells by endotoxin and dexamethasone and attenuates the steroid-induced inhibition of interleukin 6 release[ J]. *Endocrinology* 2005 146(1): 35- 43
- [ 7 ] Singh MP, Sharma H, Singh SM. Prolactin promotes growth of a spontaneous T cell lymphoma: role of tumor and host derived cytokines[ J]. *Cancer Invest* 2006 24(6): 601- 610
- [ 8 ] Weiser WY, Temple PA, Wittek-Giannotti JS. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor[ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(19): 7522- 7526
- [ 9 ] Mazor M, Hershkowitz R, Ghezzi F, et al Prolactin concentrations in preterm and term pregnancy and labour [ J]. *Arch Gynecol Obstet* 1996, 258(2): 69- 74
- [ 10 ] 石 瑛, 王 辉, 尹学念. 泌乳素对 T 淋巴细胞 IL-2R 和 LFA-1 表达的影响 [ J]. *新乡医学院院报*, 2005, 22(6): 545- 546
- [ 11 ] Kandeel FR, Koussa VK, Swerdloff RS. Male sexual function and its disorders: physiology, pathophysiology, clinical investigation, and treated[ J]. *Endocr Rev* 2001, 22(3): 342- 388
- [ 12 ] Olazabal I, Munoz J, Ogueta S, et al Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation inhibition by glucocorticoids[ J]. *Mol Endocrinol* 2000 14(4): 564- 575.

[收稿日期] 2007-11-29 [本文编辑] 郭欣