

结核分枝杆菌及抗原 ESAT - 6、Ag85B 对中性粒细胞白三烯 B4 表达的影响

赵 青 冯国栋 王雯菁 朱 旗 张 敏 刘 扬 史 明 赵 钢

摘 要 **目的** 观察结核分枝杆菌及其抗原成分对人外周血中性粒细胞白三烯 B4 表达的影响。**方法** ELISA 法检测结核分枝杆菌不同菌株及抗原分别与外周血中性粒细胞共培养上清白三烯 B4 及相关细胞因子 TNF - α 表达量,应用花生四烯酸代谢通路抑制剂来探讨其可能的机制。**结果** BCG、ESAT - 6、Ag85B 刺激中性粒细胞生成白三烯 B4 和 TNF - α 、ESAT - 6、Ag85B 刺激生成 LTB4 呈剂量依赖,H37Ra 不引起 LTB4 表达但可增加 TNF - α 表达,Ag85B 刺激生成的 LTB4 可被齐留通和苯丁抑制素阻断,但对 TNF - α 表达无明显影响。**结论** 卡介苗及 ESAT - 6、Ag85B 诱导人中性粒细胞产生 LTB4 和 TNF - α ,Ag85B 诱导的 LTB4 可被抑制剂阻断但不影响 TNF - α 表达。感染早期中性粒细胞通过生成 LTB4 发挥抗结核作用。

关键词 结核分枝杆菌 Ag85B ESAT - 6 白三烯 B4 中性粒细胞

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.006

Effects of Mycobacterium Tuberculosis and Antigen85B,ESAT - 6 on Leutrine B4 Production from Human Neutrophil. Zhao Qing,Feng Guodong,Wang Wenjing,et al. Department of Neurology,Xijing Hospital,The Fourth Military Medical University,Shaanxi 710032,China

Abstract Objective To study the effects of Mtb and antigen on leutrine B4 production from human neutrophil. **Methods** The fresh peripheral blood samples from healthy adults were incubated with Mtb and antigen at different dose. Supernatants were collected for LTB4 and TNF - α detection by ELISA. Pharmacological inhibitors of leukotrienes synthesis was used to find possible mechanism. **Results** In this study we found that neutrophils could release LTB4 and TNF - α induced by BCG,ESAT - 6 and Ag85B.ESAT - 6 - and Ag85B - activated human PMN secreting the LTB4 in a dose dependent manner. Neutrophils did not produce LTB4 in response to H37Ra. Treatment of PMN with the leukotriene B4 inhibitor Zileuton or Bestatin prior to stimulation with Ag85B partially blocked LTB4 induction but did not work on TNF - α production. **Conclusion** BCG,ESAT - 6,Ag85B may induce neutrophil activation and enhance LTB4 release. These effects can be reduced by arachidonic acid metabolism pathway inhibitors of Zileuton and Bestatin which did not work on TNF - α production. We conclude that PMN contribute to early resistance to Mtb via LTB4 secretion.

Key words Mycobacterium tuberculosis;Ag85B;ESAT - 6;Leukotrienes B4;Neutrophil

结核病是威胁全球公共卫生的重大问题之一,据 WHO 报道,2012 年 860 万人患病,130 万人死亡,是全球范围因感染性疾病死亡的第 2 大原因,主要由结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染引起,Mtb 感染机体后主要在巨噬细胞内生存和复制^[1]。Mtb 可分泌多种蛋白,某些蛋白如 Ag85 复合物、6 - kDa 早期分泌靶抗原 (6 - kDa early secreted antigen target,ESAT - 6) 具有很强的抗原性和免疫原性^[2]。中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 是微生物入侵后最先到达感染部位 (一般在感染后的 1 ~ 3h 内到达) 机体固有免疫的主要细胞,在

急性感染早期起到重要作用,作为专职吞噬细胞,PMN 激活后主要通过吞噬、呼吸爆发和脱颗粒发挥杀菌功能,构成机体抵御 Mtb 入侵的第 1 道屏障^[3],较早期的研究局限在 PMN 对 Mtb 的吞噬和杀伤功能的探讨,然而目前越来越多的证据显示,其不仅参与了 Mtb 感染早期的固有免疫应答。最近的研究发现中性粒细胞还通过分泌细胞因子和释放炎性介质参与到固有和适应免疫反应中,参与结核病适应性免疫的诱导和调节,对结核病免疫的发展有重要影响^[3,4]。白三烯 B4 (leukotrienes B4, LTB4) 是花生四烯酸 5 - 脂氧合酶代谢途径中的产物,中性粒细胞是其主要来源之一。LTB4 是强有力的促炎脂质介质,参与很多免疫性疾病的病理过程,比如哮喘、类风湿性关节炎等,其在感染性疾病发挥的作用日益受到重视^[5]。本研究旨在探索结核分枝杆菌不同菌株及其

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81371334)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院神经内科

通讯作者:赵钢,教授,主任医师,电子信箱:zhaogang@fmmu.edu.cn

分泌的抗原 ESAT - 6, Ag85B 对中性粒细胞表达 LTB4、TNF - α 的影响。

材料与方法

1. 材料:(1)菌株:结核分枝杆菌 H37Ra 菌株,购自美国底特律 Difco 实验室 48232 - 7058;卡介苗菌株(BCG)购自上海生物制品研究所。(2)主要试剂:抗原 ESAT - 6, Ag85B 购自 Prospec 公司;中性粒细胞分离液购自方舟生物技术公司;TNF - α 酶联免疫吸附试验(Elisa)试剂盒购自欣博盛公司,白三烯 B4 酶联免疫吸附试验(Elisa)试剂盒购自 Cloud - clone 公司,RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Hy-Clone 公司,红细胞裂解液购自 Solarbio 公司。齐留通(Zileuton)和苯丁抑制素(Bestatin)购自 Cayman 公司。

2. 方法:(1)菌体制备:取固体结核分枝杆菌 H37Ra 及卡介苗(BCG),溶于磷酸盐缓冲液 PBS,用麦氏比浊法测定其浊度,配制成含菌量为 1×10^8 CFU/ml 的菌悬液, - 20℃ 保存备用^[6]。(2)外周血中性粒细胞的分离:健康志愿者,所有入选者均知情同意,采用密度梯度离心法分离中性粒细胞,具体方法如下:取肝素抗凝新鲜静脉血 12ml,1800r/min 离心 10min,分别吸取血浆、白膜层;血浆 2600r/min 离心 5min,得无血小板血浆。将 Percoll 分离液与 8.5% 氯化钠按体积比配成 100% Percoll,并用无血小板血浆稀释为 60%,70% 各 2ml;取灭菌玻璃试管,依次缓慢加入 70%,60% Percoll,白膜层,1800r/min 离心 25min,旋转缓慢吸取中性粒细胞层,1 $\times$ PBS 缓冲液 1800r/min,5min 洗两遍,如混有红细胞,按细胞体积 6 倍加入红细胞裂解液,置于冰上裂解 15min,经 PBS 洗涤后,以含 10% FBS 的 1640 培养基重悬细胞,调整细胞数为 1×10^6 /ml,MGG 染色验证其纯度,台盼蓝检测活细胞 > 98%。(3)H37Ra、BCG、ESAT - 6 及 Ag85B 刺激中性粒细胞产生细胞因子:将离体培养的中性粒细胞加入不同的处理,分为 8 组(表 1),3h 后收集细胞培养上清, - 70℃ 冻存待测。(4)ELISA 检测中性粒细胞培养上清中 LTB4 及 TNF - α 表达量:取上述冻存的中性粒细胞培养上清样品,采用酶联免疫吸附试验检测 LTB4、TNF - α 水平,按试剂盒说明书操作。主要步骤如下:每孔加入 50 μ l 标准品或样品 37℃ 温育 1h,洗板 3 次,加生物素抗体工作液 100 μ l,37℃ 温育 30min,洗板 5 次,随后加入 90 μ l 酶结合液避光 15min,加入终止液,3min 内酶标测试仪 450nm 读数。

表 1 实验分组

序号	组别	浓度(μ g/ml)	MOI
1	对照	-	-
2	LPS	1.00	-
3	ESAT - 6	0.25	-
4	ESAT - 6	0.50	-
5	Ag85B	0.50	-
6	Ag85B	0.10	-
7	H37Ra	-	10:1
8	BCG	-	10:1

MOI. 感染复数,表示感染时细菌与细胞数量的比值

3. 统计学方法:数据统计分析采用 Graphpad Prism 软件,5 次独立重复试验,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的比较用 *t* 检验,多组之间的比较用方差分析(ANOVA)和 LSD - *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 外周血中性粒细胞分离:采用密度梯度分离法提取外周血中性粒细胞,MGG 染色,中性粒细胞比例 > 97% (图 1)。

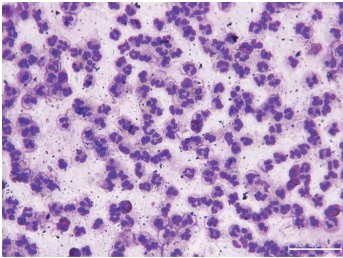


图 1 外周血中性粒细胞 MGG 染色($\times 400$)

2. 结核分枝杆菌及其抗原对中性粒细胞 LTB4 产生的影响:PMN 分别与 LPS (1 μ g/ml)、ESAT - 6 (0.5 μ g/ml)、Ag85B (0.1 μ g/ml)、H37Ra、BCG 共培养 3h 后培养上清 LTB4 表达量,LPS 组 33.28 ± 3.31 pg/ml,Ag85B 组 28.89 ± 3.82 pg/ml,ESAT - 6 组 41.32 ± 6.02 pg/ml、H37Ra 组 21.08 ± 2.94 pg/ml,BCG 组 72.18 ± 6.10 pg/ml 与对照组 14.70 ± 1.16 pg/ml 相比,检测上清液中 LTB4 含量均高于对照组,除 H37Ra 组外差异均有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。加入不同剂量抗原 ESAT - 6 (0.50 μ g/ml、0.25 μ g/ml),Ag85B (0.10 μ g/ml,0.05 μ g/ml)后,中性粒细胞 LTB4 的表达量 0.25 μ g/ml ESAT - 6 组 29.03 ± 2.15 pg/ml,0.50 μ g/ml ESAT - 6 组 52.73 ± 1.69 pg/ml(图 3A),0.05 μ g/ml Ag85B 组 22.46 ± 1.06 pg/ml,0.50 μ g/ml Ag85B 组 35.32 ± 1.94 pg/ml(图 3B)与对照组 LTB4 含量 14.70 ± 1.17 pg/ml 相比,均随抗原的浓度升高而增加,呈剂量依赖($P < 0.05$)。

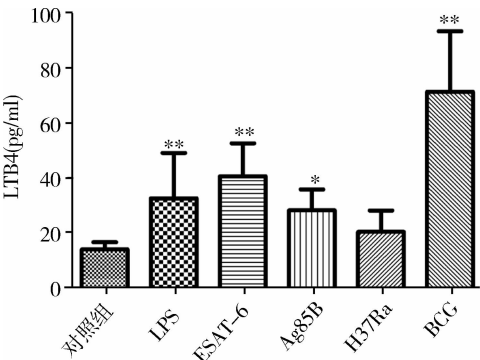


图 2 结核分枝杆菌及抗原对中性粒细胞 LTB4 表达的影响
与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

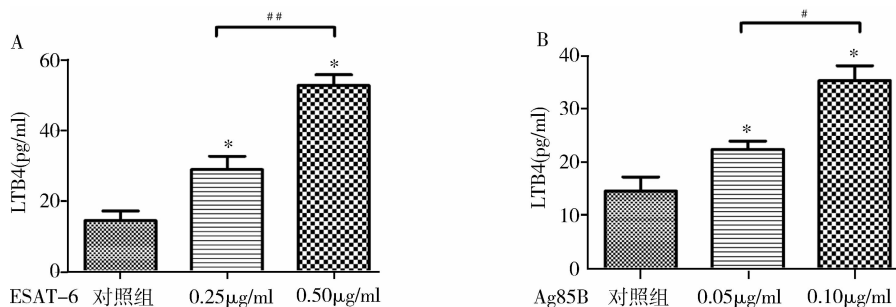
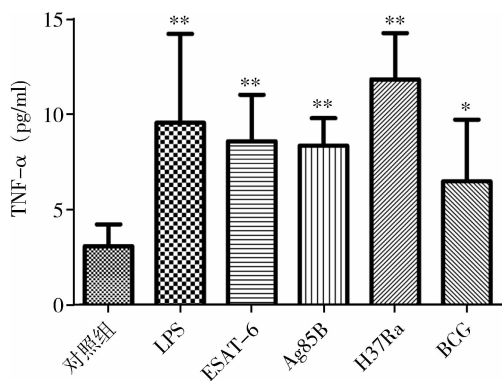


图3 不同浓度抗原对 LTB4 表达的影响

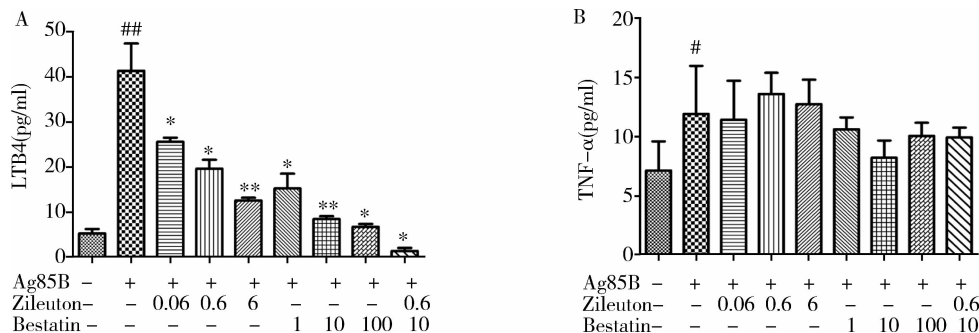
与对照组比较, * $P < 0.001$; 两组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3. 中性粒细胞培养上清中 $\text{TNF} - \alpha$ 变化: PMN 分别与 LPS ($1.00 \mu\text{g/ml}$)、ESAT - 6 ($0.50 \mu\text{g/ml}$)、Ag85B ($0.10 \mu\text{g/ml}$)、H37Ra、BCG 共培养 3h 后, 检测上清液中 $\text{TNF} - \alpha$ 含量, 对照组 $3.09 \pm 0.40 \text{ pg/ml}$, LPS 组 $9.56 \pm 1.13 \text{ pg/ml}$, ESAT - 6 组 $8.59 \pm 1.22 \text{ pg/ml}$, Ag85B 组 $8.36 \pm 0.72 \text{ pg/ml}$, H37Ra 组 $11.84 \pm 1.21 \text{ pg/ml}$, BCG 组 $6.49 \pm 1.61 \text{ pg/ml}$, 均高于对照组, 且差异有统计学意义 (图 4)。

图4 结核分枝杆菌及其抗原对中性粒细胞表达 $\text{TNF} - \alpha$ 的影响与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 抑制剂对 ESAT - 6 诱导 PMN 产生 LTB4、 $\text{TNF} - \alpha$ 的影响: 采用不同剂量白三烯代谢通路抑制

剂苯丁抑制素 (Bestatin, $1, 10, 100 \mu\text{mol/L}$) 和齐留通 (Zileuton, $0.06, 0.6, 6 \mu\text{mol/L}$) 预孵 15min 之后, 加入 Ag85B ($0.1 \mu\text{g/ml}$), 共培养 3h 后检测培养上清中 LTB4、 $\text{TNF} - \alpha$ 表达量, 测得对照组 LTB4 $45.59 \pm 0.97 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $7.15 \pm 1.10 \text{ pg/ml}$, Ag85B 组 LTB4 $41.32 \pm 6.02 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $11.93 \pm 1.53 \text{ pg/ml}$, Zileuton ($0.06 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $25.62 \pm 0.89 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $11.44 \pm 1.64 \text{ pg/ml}$, Zileuton $0.6 \mu\text{mol/L}$ 组 LTB4 $19.62 \pm 1.99 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $13.61 \pm 0.89 \text{ pg/ml}$, Zileuton ($6 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $12.62 \pm 1.99 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $12.76 \pm 1.03 \text{ pg/ml}$, Bestatin ($1 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $15.26 \pm 3.26 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $10.62 \pm 0.51 \text{ pg/ml}$, Bestatin ($10 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $8.47 \pm 0.64 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $8.23 \pm 0.73 \text{ pg/ml}$, Bestatin ($100 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $6.75 \pm 0.65 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $10.08 \pm 0.55 \text{ pg/ml}$, Zileuton ($0.6 \mu\text{mol/L}$) Bestatin ($10 \mu\text{mol/L}$) 组 LTB4 $1.40 \pm 0.67 \text{ pg/ml}$ 、 $\text{TNF} - \alpha$ $9.95 \pm 0.41 \text{ pg/ml}$, 结果显示齐留通在 $0.06 \mu\text{mol/L}$ 可抑制 Ag85B 引起的 LTB4 生成, 并随剂量增加抑制效应越明显, 苯丁抑制素在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时即可产生抑制, 随苯丁抑制素浓度增加 LTB4 生成量减少 (图 5A), 对 $\text{TNF} - \alpha$ 生成无明显影响 (图 5B)。

图5 抑制剂对 Ag85B 诱导中性粒细胞生成 LTB4、 $\text{TNF} - \alpha$ 的影响与对照组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Ag85B 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

近年来,越来越多的研究旨在更好地理解机体应对各种微生物参与先天免疫应答的机制,包括结核分枝杆菌。结核病是一种与免疫反应密切相关的疾病,机体免疫应答的方向和水平在很大程度上决定着结核病的发展与转归,固有免疫和适应性免疫在结核感染中都发挥了重要作用,在固有免疫反应中,吞噬细胞发挥了关键的作用,一些研究已经揭示了单核-吞噬细胞的调节功能和效应^[7]。然而对作为第 1 个到达感染部位的细胞中性粒细胞研究甚少,多数集中在中性粒细胞对结核分枝杆菌的吞噬和杀伤功能,在很大程度上限制了人们对 PMN 在抗结核病免疫中的认识。过去的一些研究表明中性粒细胞也可以产生一些细胞因子,其中一部分在调节免疫反应中发挥了重要的作用^[8]。体外研究表明中性粒细胞在适当的刺激下可以分泌多种蛋白,比如 TNF- α 、IL-1 β 等,这些都表明中性粒细胞在免疫和炎症过程中扮演重要角色,中性粒细胞可能对于结核感染的早期控制有重要作用,而不同毒力的结核分枝杆菌对中性粒细胞功能影响也不同^[9,10]。

本实验采用结核分枝杆菌分泌抗原 ESAT-6、Ag85B 刺激分离的人外周血中性粒细胞,结果表明抗原 Ag85B、ESAT-6 都可以刺激中性粒细胞生成 LTB4,并随剂量增多表达升高。Ag85B 是结核分枝杆菌的一种重要的外分泌蛋白,主要由 Mtb 和 BCG 分泌,文献报道其可以诱导结核病患者产生保护性 Th1 型细胞因子,增强抗结核能力^[11]。ESAT-6 是从结核分枝杆菌中分离纯化出的早期分泌型抗原靶蛋白 6,由 RD-1 区 RV3875 基因编码,仅存在于致病性分支杆菌中,具有较强的细胞与体液免疫活性,成为结核感染时重要的特异性抗原^[12]。近年来的研究发现,ESAT-6 对固有免疫反应的细胞功能也有调节作用,如 ESAT-6 能刺激肥大细胞 TNF、IL-6 的释放^[13]。本研究提示在感染早期中性粒细胞生成 LTB4 发挥免疫调节作用。H37Ra 是由人型结核分枝杆菌有毒株 H37Rv 减毒而来的无毒株,基本上保留了有毒株的免疫原性,有研究表明, H37Ra 能充分活化巨噬细胞,而本研究发现热灭活 H37Ra 并不能引起中性粒细胞产生 LTB4 但可以增加其 TNF- α 的表达,提示同样作为促炎因子的 LTB4 和 TNF- α 通过不同的途径参与免疫调节^[14]。

LTB4 是炎症进程、免疫应答以及宿主防御的关键介质,可刺激中性粒细胞趋化反应,细胞脱颗粒,溶

酶体释放,活化氧产生等。到达炎症部位后,中性粒细胞可以释放 LTB4 招募白细胞,扩大炎症反应^[15]。研究表明中性粒细胞生成的 LTB4 可以控制利什曼原虫感染^[16]。在巴西副球孢子菌感染时也可产生 LTB4 而外源性的 LTB4 可以巨噬细胞的吞噬功能^[17,18]。相关研究小组对斑马鱼海鱼分支杆菌模型的研究认为 LTB4 控制 Mtb 感染结局发挥了关键的作用,LTB4 可以通过影响 TNF- α 水平发挥作用,LTB4 通过影响单核-吞噬细胞 TNF- α 的量增加结核的易感性^[19,20]。本研究采用白三烯代谢通路抑制剂齐留通和苯丁抑制素,部分抑制 Ag85B 抗原引起的 LTB4 生成,但对 TNF- α 无明显影响,而目前对于 LTB4 与 TNF- α 的相互关系报道并不一致,有文献报道 TNF- α 能促进人中性粒细胞合成 LTB4。而 TNF- α 作为一个可干预治疗的靶点,在宿主抗结核免疫反应中起到重要作用,TNF- α 与不同细胞内多种炎性介质之间的相互作用方式和信号转导途径也有待于进一步探讨。

总之,本研究初步探索结核分枝杆菌菌株卡介苗及其抗原 ESAT-6、Ag85B 对人外周血中性粒细胞 LTB4、TNF- α 表达的影响,采用白三烯代谢通路抑制剂干预 Ag85B 抗原诱导的 LTB4 表达并不影响 TNF- α 的表达,结果表明在感染早期,Mtb 菌体及其分泌的抗原 ESAT-6、Ag85B 可以刺激中性粒细胞产生 LTB4、TNF- α ,这两种炎性介质可能通过不同的途径启动胞内信号途径和参与多种细胞因子协同作用,参与适应性免疫应答过程。但目前对中性粒细胞在结核病固有免疫中发挥的功能的认识还很不全面,备受争议,需要进一步研究 LTB4 在中性粒细胞抗结核免疫中发挥的作用^[21]。免疫细胞和炎性介质的作用是复杂的,在机体不同的状态下的作用也不同,尤其是在对抗结核感染中起到的双面作用一些细胞因子,深入了解这些免疫成分的发挥的作用有助于对结核病的诊断和辅助治疗提供依据。

参考文献

- 1 EE team. WHO publishes global tuberculosis report 2013 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(43):20615
- 2 Yuk JM, Jo EK. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2014, 3(2):155-167
- 3 Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view [J]. Immunol Rev, 2007, 219:88-102
- 4 Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing [J]. Trends Microbiol, 2007, 15(2):87-92
- 5 Peters - Golden M, Henderson WJ. Leukotrienes [J]. N Engl J Med,

- 2007,357(18):1841-1854
- 6 马秀玲,陈蕊君,王飞,等. 吸光度法快速确定菌悬液浓度及其适用范围[J]. 微生物学杂志, 2014,4:90-92
- 7 Guirado E, Schlesinger L S, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe[J]. *Semin Immunopathol*, 2013,35(5):563-583
- 8 Morris D, Nguyen T, Kim J, *et al.* An elucidation of neutrophil functions against mycobacterium tuberculosis infection[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013,2013:959650
- 9 Kisich KO, Higgins M, Diamond G, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of mycobacterium tuberculosis by human neutrophils[J]. *Infect Immun*, 2002,70(8):4591-4599
- 10 Hilda JN, Selvaraj A, Das SD. Mycobacterium tuberculosis H37Rv is more effective compared to vaccine strains in modulating neutrophil functions: an in vitro study [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012,66(3):372-381
- 11 Russo DM, Kozlova N, Lakey DL, *et al.* Naive human T cells develop into Th1 effectors after stimulation with mycobacterium tuberculosis - infected macrophages or recombinant Ag85 proteins[J]. *Infect Immun*, 2000,68(12):6826-6832
- 12 Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P, *et al.* tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence[J]. *Tuberculosis: Edinb*, 2008,88(6):510-517
- 13 Munoz S, Hernandez-Pando R, Abraham SN, *et al.* Mast cell activation by mycobacterium tuberculosis: mediator release and role of CD48[J]. *J Immunol*, 2003,170(11):5590-5596
- 14 He ZL, Du FW, Du XZ. The viable Mycobacterium tuberculosis H37Ra strain induces a stronger mouse macrophage response compared to the heat-inactivated H37Rv strain [J]. *Mol Med Rep*, 2013,7(5):1597-1602
- 15 Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, *et al.* LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis [J]. *Dev Cell*, 2012,22(5):1079-1091
- 16 Tavares NM, Araujo-Santos T, Afonso L, *et al.* Understanding the mechanisms controlling leishmania amazonensis infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils [J]. *J Infect Dis*, 2014,210(4):656-666
- 17 Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, *et al.* Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to paracoccidioides brasiliensis. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1 [J]. *Cytokine*, 2014,67(1):36-43
- 18 Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, *et al.* Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2010,285(52):41113-41121
- 19 Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, *et al.* Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections [J]. *Cell*, 2012,148(3):434-446
- 20 Tobin DM, Vary JJ, Ray JP, *et al.* The lta4h locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans [J]. *Cell*, 2010,140(5):717-730
- 21 Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, *et al.* Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? [J]. *Trends Immunol*, 2012,33(1):14-25

(收稿日期:2014-11-24)

(修回日期:2014-12-05)

慢性给予 GHRP-6 对小鼠跑轮运动日节律的影响

郝 维 周 岚 谷婧丽 曹济民

摘 要 **目的** 本研究探讨慢性给予 GHRP-6 对小鼠日运动节律的影响。**方法** 利用 MiniMitter 鼠类跑轮活动监测系统实时记录 C57BL6/J 小鼠在全黑暗条件下跑轮运动的昼夜节律;在不同时间点(CT6、CT12、CT14、CT18、CT22 和 CT24)每日腹腔注射 GHRP-6(100 μg/kg),观察 GHRP-6 对小鼠跑轮运动昼夜节律和运动活性的影响。**结果** 在 CT12 给予 GHRP-6 引起明显的跑轮运动日节律时相延迟,而在其他时间点不引起明显的时相位移。GHRP-6 同时引起一定程度的运动活性降低,但该效应与给药时间没有明显关系。**结论** GHRP-6 可引起 C57BL6/J 小鼠的跑轮运动日节律时相的时间依赖性延迟和时间非依赖性运动活性降低,该研究提示 GHSR 信号通路对生物钟有调节作用。

关键词 生长激素释放肽 生长激素促分泌素受体 昼夜节律 相移 生物钟

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.007

Effects of Chronic GHRP-6 Administration on the Circadian Wheel-running Rhythm in Mice. Hao Wei, Zhou Lan, Gu Jingli, *et al.*
Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071072,31471126)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com