

LAVORO ORIGINALE

Effetti degli ormoni sessuali sull'espressione tempo-dipendente di citochine infiammatorie in monociti umani (THP-1) attivati*

17beta-estradiol and testosterone influence the mRNA expression and the time course of inflammatory cytokines in activated human monocytic cell line (THP-1)

S. Capellino, B. Villaggio, P. Montagna, A. Sulli, C. Craviotto, M. Cutolo

U.O. Clinica Reumatologica, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Genova

SUMMARY

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of 17 β -estradiol (E_2) and testosterone (T) on the mRNA expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β in cultured human monocytic cells (THP-1) after INF- γ activation.

Methods: THP-1 were cultured with E_2 and T (10 nM) for 24 hs and then activated with INF-g (500 U/ml), during different periods of time (1, 3, 6, and 12 hs). After total RNA extraction, all samples were analyzed by multiple RT-PCR to detect mRNA expression of the selected cytokines.

Results: Cells cultured without hormonal treatment expressed IL-1 β mRNA after 1 h; on the contrary TNF- α , TGF- β and IL-6 mRNA were expressed only after 3 hs. At 6 and 12 hs only IL-6 mRNA was still expressed. Interestingly, cells cultured with testosterone never expressed IL-1 β nor TNF- α mRNA and showed an IL-6 mRNA expression similar to the untreated controls at 3, 6 and 12 hours. On the contrary, cells treated with E_2 showed the expression of all cytokines at 3 and 12 hs, and in general showed a higher expression of all the analyzed cytokines mRNA when compared to the other conditions.

Conclusions: This study suggests that sex hormones may modulate the cytokine mRNA expression in the inflammatory cells. In fact, T inhibits TNF- α production at all the tested times, whereas E_2 seems to accelerate and to enhance the inflammatory response. Therefore, the altered sex hormone ratio, as observed in the synovial fluid of RA patients (high E_2 /low T), might contribute to the occurrence and last of synovitis.

Reumatismo, 2005; 57(3):193-196

INTRODUZIONE

Numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono che durante l'età fertile le donne siano più soggette, rispetto agli uomini, a patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide (AR) e il lupus eritematoso sistemico (LES). Malattie quali

l'AR e il LES rappresentano il risultato della combinazione di diversi fattori di rischio, tra cui una predisposizione genetica e l'incontro con vari fattori scatenanti.

Per esempio, un ruolo fondamentale nell'eziopatogenesi dell'AR è svolto dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (1), dal sistema nervoso simpatico (SNS) (2) e dagli ormoni gonadici. Il coinvolgimento degli ormoni sessuali nella patogenesi di malattie infiammatorie croniche quali l'AR è oggetto di studio da diversi anni (3-7). È ormai noto che in pazienti affetti da AR, sia maschi sia femmine, i livelli serici di androgeni ed estrogeni risultano alterati (8-10); in particolare, in uomini affetti da AR i livelli serici di T sono risul-

*Lavoro premiato al XLI Congresso SIR, Stresa 2004

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Silvia Capellino
Viale Benedetto XV, 6
16132 Genova
E-mail: silvia.capellino@unige.it

tati significativamente più bassi rispetto ai controlli sani (11). Importante inoltre sottolineare come questa alterazione nelle concentrazioni ormonali nei liquidi sinoviali e nel siero di pazienti AR sia associata ad un aumento dei livelli di alcune citochine infiammatorie (12-14), e possa influire direttamente sulle funzioni di monociti, macrofagi sinoviali e linfociti T, alterandole. È stato infatti dimostrato che tutte le popolazioni cellulari citate esprimono recettori funzionali per androgeni ed estrogeni (15, 16).

Queste evidenze cliniche correlano con i risultati di precedenti studi *in vitro*, che dimostrano il ruolo immunosoppressivo degli androgeni e l'effetto stimolatorio degli estrogeni nella risposta immunitaria umorale (17-19).

Sulla base di queste evidenze circa il coinvolgimento ormonale nella AR, lo scopo di questo lavoro è stato di valutare gli effetti modulatori del

testosterone (T) e del 17 β -estradiolo (E₂) sull'espressione dell'mRNA di citochine infiammatorie quali TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β a livello di cellule monocitarie umane (THP-1) dopo attivazione con interferone- γ (INF- γ).

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stata utilizzata la linea monocitaria umana stabilizzata THP-1. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 con aggiunta di FBS 10% e PS 1%, e mantenute in atmosfera umidificata a 37°C e 5% CO₂. Per i trattamenti sono state utilizzate concentrazioni parafisiologiche (10nM) di testosterone (T) e 17 β -estradiolo (E₂).

Dopo 24 ore di coltura in presenza di ormoni o in normale terreno (controlli), le cellule sono state

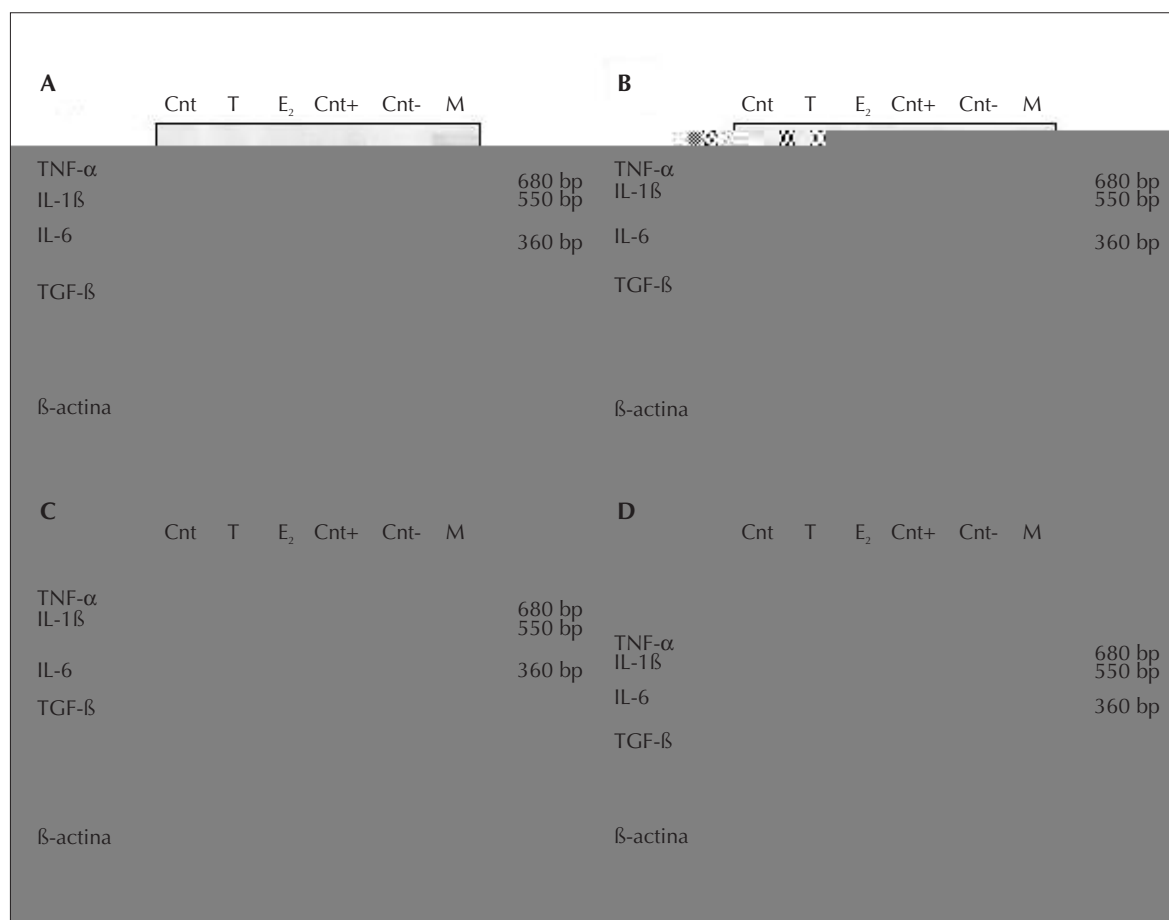


Figura 1 - Espressione dell'mRNA di TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β in cellule THP-1 coltivate con 17 β -estradiolo (E₂), con testosterone (T), o con normale RPMI (Cnt) e successivamente stimulate con interferone- γ (INF- γ) per 1, 3, 6 e 12 ore (A, B, C, D rispettivamente). Il gene per la β -actina è stato utilizzato come housekeeping. (cnt+: controllo positivo; cnt-: controllo negativo; M: marcatore di pesi molecolari; bp: paia di basi).

stimolate ed attivate con interferone- γ (INF- γ) (500 U/ml) per 1, 3, 6 o 12 ore. Al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte e lavate in DPBS. L'RNA totale è stato estratto mediante Trizol (Invitrogen, Milano Italy). Utilizzando la tecnica della RT-PCR multipla (MBI, San Francisco CA, USA) è stata valutata l'espressione degli mRNA di alcune citochine infiammatorie: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β .

RISULTATI

In presenza di uno stimolo infiammatorio quale INF- γ , le cellule coltivate in assenza di ormoni sessuali hanno espresso mRNA per IL-1 β già dopo 1 ora dallo stimolo con INF- γ (Fig. 1A). Dopo 3 ore di coltura con INF- γ è stato osservato un effetto maggiore, infatti sono stati rilevati anche gli mRNA per TNF- α , IL-6 e TGF- β , mentre non risultava più espressa IL-1 β (Fig. 1B). Dopo 6 e 12 ore di induzione con INF- γ è risultato espresso solo l'mRNA per IL-6 (Fig. 1C, 1D).

Il trattamento con T ha determinato una totale inibizione dell'mRNA per TNF- α dopo 3, 6 e 12 ore di stimolo con INF- γ , mentre l'espressione di mRNA per IL-6 è risultata simile ai controlli. Non è stata rilevata espressione di mRNA per IL-1 β dopo 3, 6 né 12 ore di stimolazione. L'induzione con INF- γ nei monociti trattati con T ha determinato inoltre un'espressione di mRNA per TGF- β maggiore rispetto al controllo dopo 6 ore, mentre non sono state osservate evidenti differenze di espressione dopo 3 e 12 ore. Dopo 1 ora di induzione, non è stata riscontrata una diversa risposta nella produzione di mRNA nei due trattamenti ormonali (Fig. 1A).

Al contrario di T, la presenza di E₂ ha determinato l'espressione di mRNA per TNF- α e IL-1 β già dopo 3 ore di stimolo con INF- γ , oltre ad una maggiore produzione di mRNA per IL-6. Allo scadere delle 6 ore di induzione e trattamento con E₂ risultavano espressi mRNA per TNF- α , IL-6 e TGF- β (Fig. 1C), mentre dopo 12 ore di stimolo è stata rilevata una sovraespressione dell'mRNA di tutte le citochine indagate, in particolare TNF- α e IL-1 β (Fig. 1D).

DISCUSSIONE

Dai risultati di questo studio si evince un diverso ritmo di produzione di mRNA delle principali ci-

tochine in seguito ad uno stimolo infiammatorio. Infatti, mentre IL-1 β e TNF- α vengono espressi e modulati precocemente, l'espressione di IL-6 sembra essere più costante a tutti i tempi e nei diversi trattamenti.

Questi risultati confermano quanto già evidenziato in numerosi studi, che hanno definito il ruolo di primaria importanza di IL-1 β e TNF- α nella patogenesi della AR (20, 21) e la costante produzione di IL-6 in fase di flogosi, sebbene il ruolo specifico di questa citochina sia ancora da definire (22).

Per quanto concerne il ruolo degli ormoni sessuali nella patogenesi della AR, sebbene fosse già noto il loro coinvolgimento nella patologia, questo studio suggerisce un effetto di T ed E₂ già sulle prime fasi della risposta infiammatoria, ovvero direttamente sull'espressione di mRNA di citochine quali TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β . In particolare, va evidenziato il potente effetto inibitorio dimostrato da T sull'espressione di TNF- α . Il trattamento con T determina infatti una totale inibizione nell'espressione di TNF- α anche dopo tempi lunghi di stimolazione con INF- γ . E₂ conferma al contrario la sua azione pro-infiammatoria; infatti i monociti attivati con E₂ presentano un'espressione più rapida di tutte le citochine prese in esame (3 ore di stimolo con INF- γ), e la risposta appare più marcata e più persistente rispetto ai controlli.

L'azione diretta di T ed E₂ sulla modulazione dell'espressione di citochine infiammatorie è stata confermata mediante l'utilizzo di inibitori specifici (Flutamide e Tamoxifene rispettivamente), in presenza dei quali non è più riscontrabile la modulazione ormone-dipendente sopra descritta (dati non riportati).

L'effetto di E₂ sulla produzione di citochine infiammatorie assume un significato particolarmente rilevante, dal momento che le concentrazioni delle stesse possono agire a feedback sul metabolismo ormonale, aumentando ulteriormente il rapporto estrogeni/androgeni ed amplificando il fenomeno (7).

Pertanto, confermate le attuali conoscenze sul ruolo di estrogeni ed androgeni sullo sviluppo ed il protrarsi della AR (8, 10, 23) e la loro azione diretta sui monociti/macrofagi, questo studio dimostra che l'effetto modulatore di T ed E₂ si esercita direttamente sull'espressione dell'mRNA di alcune citochine infiammatorie, suggerendo che gli ormoni sessuali svolgano un ruolo chiave già nelle prime fasi della risposta flogistica.

RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare gli effetti modulatori del testosterone (T) e del 17 β -estradiolo (E₂) sull'espressione di mRNA di TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β in cellule monocitarie umane (THP-1) attivate con INF- γ . I risultati ottenuti suggeriscono un effetto modulatore degli ormoni sessuali su tale risposta infiammatoria. Mentre il T inibisce chiaramente l'espressione dell'mRNA per TNF- α , in presenza di E₂ la risposta infiammatoria appare più marcata. Questi risultati, associati all'aumentato rapporto estrogeni/androgeni riscontrato nel liquido sinoviale di pazienti affetti da AR, possono almeno in parte giustificare il diverso ruolo attribuito a questi ormoni nello sviluppo della malattia.

Parole chiave - 17 β -estradiolo, testosterone, citochine, artrite reumatoide, monociti.

Key words - 17 β -estradiol, testosterone, cytokines, rheumatoid arthritis, monocytes.

BIBLIOGRAFIA

- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Craviotto C, Straub RH. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical and gonadal functions in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 107-17.
- Harle P, Cutolo M, Scholmerich J, Straub RH. Rheumatoid arthritis - pathogenetic role of neuroendocrine axes and the peripheral nervous system. *Med Klin* 2002; 97: 720-9.
- Cutolo M, Accardo S. Sex hormones, HLA and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 641-8.
- Cutolo M, Serio B, Pizzorni C, Sulli A. The role of androgens in rheumatic diseases. *Israel Med Ass J* 2001; 3: 743-8.
- Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 217-26.
- Cutolo M, Wilder R. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26: 825-39.
- Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Serio B, Sulli A. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Rev* 2002; 1: 284-9.
- Cutolo M, Villaggio B, Serio B, Montagna P, Capellino S, Straub RH, et al. Synovial fluid estrogens in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 193-8.
- Straub RH, Weidler C, Demmel B, Hermann M, Kees F, Schmidt M, et al. Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 961-8.
- Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 2597-605.
- Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1314-7.
- Cutolo M, Villaggio B, Bisso A, Sulli A, Coviello D, Dayer JM. Presence of estrogen receptors in human myeloid monocytic cells (THP-1 cell line). *Eur Cytokine Netw* 2001; 12: 368-72.
- Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Villaggio B, Sulli A, Serio B, et al. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 687-90.
- Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1967-75.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Indiveri F, Carruba G, et al. Evidence for the presence of androgen receptors in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1007-15.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Bagnasco M, Coviello DA, et al. Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ T lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1087-97.
- Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 217-26.
- Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Serio B, Sulli A. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 284-9.
- Cutolo M, Sulli A, Craviotto C, Felli L, Pizzorni C, Serio B, et al. Modulation of cell growth and apoptosis by sex hormones in cultured monocytic THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 204-10.
- Dayer JM. Biological modulation of IL-1 activity: role and development of its natural inhibitor IL-1Ra. *Reumatismo* 2004; 56 (1 S): 3-8.
- Jeong JG, Kim JM, Cho H, Hahn W, Yu SS, Kim S. Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 3-7.
- Boss B, Neeck G. Correlation of IL-6 with the classical humoral disease activity parameters ESR and CRP and with serum cortisol, reflecting the activity of the HPA axis in active rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2000; 59 (2 S): II/62-4.
- Tengstrand B, Carlstrom K, Fellander-Tsai L, Hafstrom I. Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation. *J Rheumatol* 2003; 30: 2338-4.