

# 甾类激素合成灵敏调节蛋白在大鼠黄体中的表达 及其受 $\text{IFN}_\gamma$ 的调节

高洪娟 陈鑫磊 石磊 刘以训\*

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080. \*联系人, Email: liuyx@panda.ioz.ac.cn)

**摘要** 甾体激素合成灵敏调节蛋白(StAR)是甾体激素合成的关键调节因子. 甾体激素的合成需要将胆固醇从细胞质转运到位于线粒体内膜的细胞色素 P450 侧链切除复合体上, 这是甾体激素合成的限速步骤. 它依赖于 StAR 的从头合成. 以成年大鼠假孕模型, 用原位杂交和免疫组化的方法研究了不同时期大鼠黄体中 StAR mRNA 和抗原的表达及其受  $\text{IFN}_\gamma$  调节的情形. 结果表明 StAR 的表达与孕酮的水平相一致,  $\text{IFN}_\gamma$  对 StAR 表达有抑制作用.

**关键词** 黄体 甾体激素合成灵敏调节蛋白 原位杂交 免疫组化  $\text{IFN}_\gamma$

所有的甾类激素的生物合成都起始于胆固醇到孕烯醇酮的转化. 这一反应是由位于线粒体内膜的细胞色素 P450 侧链切除酶(P450<sub>scc</sub>)催化的<sup>[1,2]</sup>. 长期以来, 人们认为促性腺激素对甾类激素合成的调节作用是由于其对 P450<sub>scc</sub> 活性的调控, 即此步为限速步骤. 然而其后的许多实验表明真正的限速步骤是胆固醇转运到线粒体内膜和 P450<sub>scc</sub><sup>[3]</sup>. 而 StAR 是此过程的重要调节因子<sup>[4,5]</sup>. StAR 的表达与甾类激素合成在时空上密切相关<sup>[6,7]</sup>. 在缺乏激素调节的情况下 MA-10 小鼠 Leydig 肿瘤细胞和 cos-1 细胞中 StAR 蛋白的表达会引起甾类激素合成的显著增加<sup>[8,9]</sup>.

$\text{IFN}_\gamma$  能抑制大鼠中颗粒细胞分化和甾类激素合成<sup>[10]</sup>, 并能增加前列腺素  $\text{PGF}_2\alpha$  的合成, 抑制孕酮产生来影响黄体的功能<sup>[11]</sup>. 黄体中甾类激素的灵敏调节是由 StAR 完成的, StAR 的表达受 cAMP<sup>[5]</sup>和  $\text{PGF}_2\alpha$ <sup>[12]</sup>的调节. 因此  $\text{IFN}_\gamma$  可能直接影响 StAR 的表达.

## 1 材料与方法

(i) 动物. SD 大鼠由中国科学院动物研究所实验动物研究室提供. 将 3 只雌性成年大鼠与 1 只输精管结扎的雄鼠合笼, 雌鼠只在动情期的晚上交配, 此时排卵即将发生. 如果交配, 在阴道里就会形成一个凝固的阴道栓, 用阴道检查法在早晨可以方便地检测到. 发现阴道栓的那天作为假孕第 1 天. 分别在假孕的第 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13 天处死动物, 收集卵巢, 固定于福尔马林固定液中. 假孕第 4 天时注射  $\text{IFN}_\gamma$  500, 1 000, 5 000, 10 000 IU, 对照组只注射生理盐水, 24 h 后处死动物, 分离收集卵巢, 固定于福尔马林固定液中. 组织以常规方法石蜡包埋, 切片(6  $\mu\text{m}$ ), 贴附于铬明矾-明胶处理的载玻片上.

(ii) 原位杂交. 原位杂交采用德国 Boehringer 公司地高辛标记非放射杂交系统, StAR 和 LH 受体(LHR)探针以体外转录方式标记地高辛. 石蜡切片脱蜡后, 用 5~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K 37  $^\circ\text{C}$  消化 10 min, PBS 洗 2 min, 4% PFA 固定 5 min, PBS 洗 5 min. 切片经梯度酒精脱水、晾干后用 50% 甲酰胺/2  $\times$  SSC 预杂交 2 h, 45~50  $^\circ\text{C}$  杂交过夜(杂交液成分: ~200 ng/mL DIG 标记探针; 10 mmol/L Tris-Cl(pH = 7.5); 2  $\times$  SSC; 50% 去离子甲酰胺; 1  $\times$  Denhardt; 5% 硫酸葡聚糖; 2.5 mmol/L DDT; 0.5% SDS; 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  酵母 tRNA). 杂交后, 切片在 40  $^\circ\text{C}$  下用 2, 1, 0.1  $\times$  SSC 各

洗  $2 \times 15$  min, DIG 缓冲液 I (0.1 mol/L 马来酸; 0.15 mol/L NaCl; pH = 7.5) 中平衡 5 min, 1% 封闭液封闭 1 h, 1 : 500 碱性磷酸酶连接的抗 DIG 抗体温育 30 min, DIG 缓冲液 I 洗  $3 \times 10$  min, DIG 缓冲液 III (0.1 mol/L NaCl; 50 mmol/L  $MgCl_2$ ; 0.1 mol/L Tris-Cl; pH = 9.5) 平衡 5 min, 加碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP, 避光温育 3 ~ 6 h. 染色充分后用光学树胶封片. 对照用 StAR 正义 RNA 探针代替反义 RNA 探针, 对照无特异性染色.

(iii) 免疫组化(ABC 法). 石蜡切片脱蜡后, 用含 0.3% 双氧水的甲醇温育 30 min, PBS 洗  $3 \times 5$  min. 切片经微波炉抗原修复 5 min (1.8 mmol/L 柠檬酸; 8.2 mmol/L 柠檬酸钠; pH = 6.0), 室温中冷却 10 min, 正常山羊血清(NGS)封闭 20 min, 抗 StAR 兔血清温育 30 min, PBS 洗  $3 \times 10$  min, 生物素连接的二抗(山羊抗兔血清)温育 30 min, PBS 洗  $3 \times 5$  min, 亲和素 A 和生物素 B(联结辣根过氧化物酶)混合物温育 1 h(A 和 B 提前 30 min 混合), PBS 洗  $3 \times 5$  min, 辣根过氧化物酶底物 DAB/双氧水温育 2 ~ 7 min, 自来水冲洗, 脱水封片. 对照用 NGS 代替一抗, 对照无特异性染色.

## 2 结果与讨论

在假孕大鼠黄体中第 1 ~ 2 天 StAR 抗原表达较低, 到第 4 天表达显著增加, 第 6 天维持在较高水平上, 第 8 天时略有下降, 到第 10 天明显降低, 到第 13 天基本上检测不到 StAR 抗原的表达(图 1).

假孕大鼠第 1 ~ 6 天黄体中 StAR mRNA 表达都比较高, 第 8 ~ 13 天表达很低(图 2).

注射  $IFN_\gamma$  500 IU 的大鼠黄体中 StAR 抗原表达与对照组基本相同, 注射  $IFN_\gamma$  1000 IU 后 StAR 抗原的表达略有降低. 而注射 5 000, 10 000 IU 大鼠黄体中 StAR 抗原的表达明显下降(图 3).

我们以前对促性腺激素诱导的假孕大鼠黄体 StAR 研究表明, StAR mRNA 和抗原在第 1 ~ 4 天呈上升趋势, 到第 4 天达最高, 第 8 天溶黄体开始时下降; 在妊娠大鼠黄体中 StAR 在黄体早期表达高, 到第 13 天溶黄体时下降<sup>[13]</sup>. 我们用成年大鼠假孕模型得出的结果与促性腺激素诱导的假孕和妊娠大鼠模型得到的结果基本相同<sup>[13]</sup>, 并且 StAR 的表达与孕酮形成的水平一致<sup>[14]</sup>. 因此, StAR 的表达可视为黄体功能的可靠指标. 这与以前的报道是一致的<sup>[15 ~ 17]</sup>.

StAR 蛋白前体在胞质中合成, 在信号肽的导引下穿过线粒体膜进入线粒体<sup>[18]</sup>, 其后信号肽被切除, 形成成熟形式的 StAR. 在 StAR 穿膜过程中, 线粒体内外膜“粘合”在一起, 内外膜之间没有水性的膜间质. 这样, 极性的胆固醇就可通过这样的“粘合位点”进入线粒体. 因此认为只有在 StAR 的穿膜和成熟过程中 StAR 才能发挥转运胆固醇的功能. 但后来实验认为 StAR 蛋白的 C 末端在转运胆固醇时起重要作用<sup>[19]</sup>. 另外, StAR 很可能还依赖其他某些分子协助发挥转运作用.

已知  $IFN_\gamma$  能抑制黄体中孕酮的产生<sup>[16]</sup>. 假孕第 4 天的黄体对细胞因子的刺激比较灵敏, 因此我们选择第 4 天时注射, 低剂量  $IFN_\gamma$  并不影响 StAR 的表达, 而剂量增加到 5 000 IU 时 StAR 的表达明显受到抑制, 高剂量时抑制作用不再加强. 据报道,  $IFN_\gamma$  能抑制牛<sup>[20]</sup>和妊娠大鼠<sup>[21]</sup>黄体中孕酮的分泌. 它对黄体的作用可能是通过两种途径: 一是通过增强免疫反应而诱发 MHC 抗原 II 型的表达导致溶黄体<sup>[22]</sup>; 二是通过增加前列腺素的合成<sup>[23]</sup>.  $PGF2\alpha$  能抑制 StAR

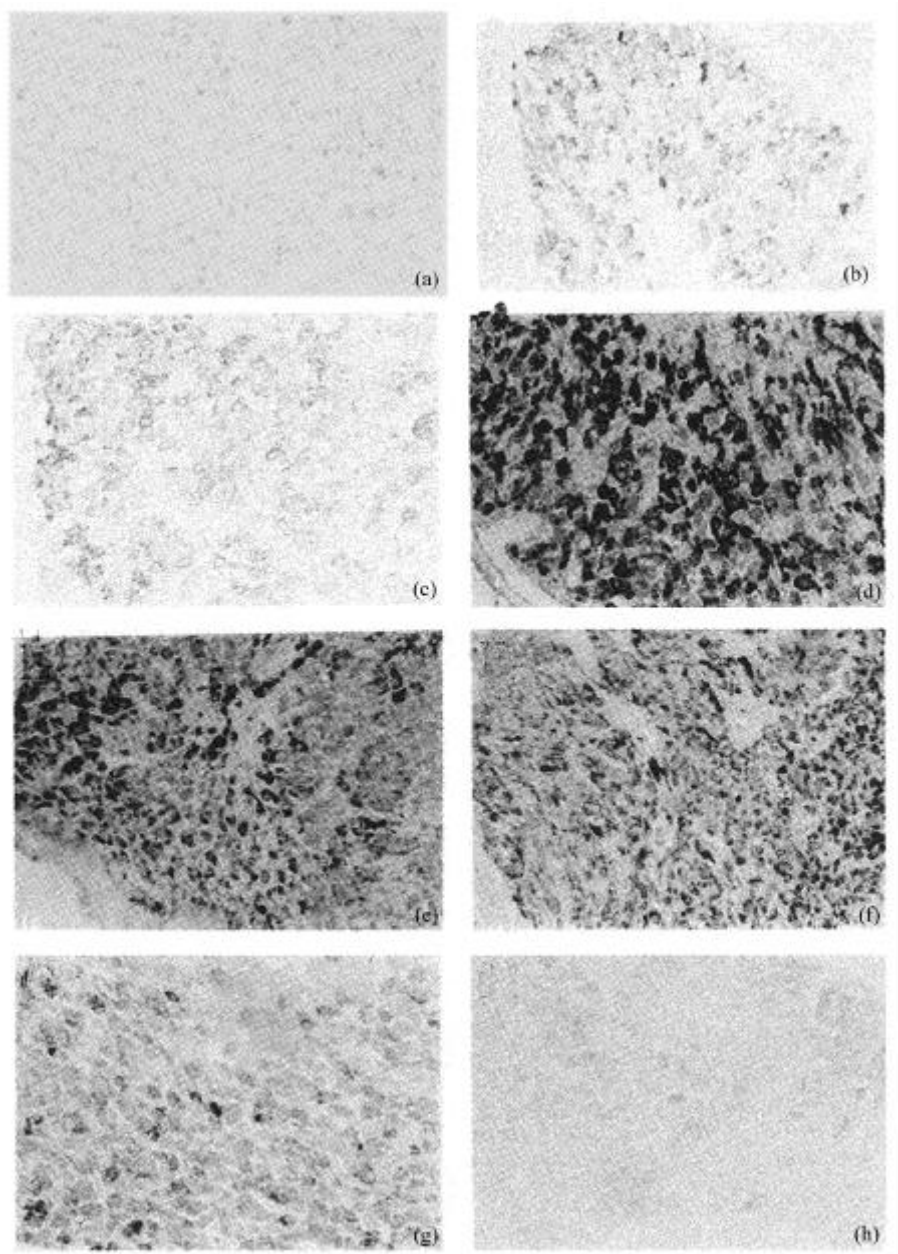


图 1 StAR 抗原在成年假孕大鼠黄体中的表达  
(a) 阴性对照; (b) D1; (c) D2; (d) D4; (e) D6; (f) D8; (g) D10; (h) D13.  $\times 140$

的表达<sup>[24]</sup>, StAR 表达的降低影响了孕酮的合成. 最近报道 IFN $\gamma$  能抑制大鼠 Leydig 细胞中 StAR 的合成, 并呈剂量依赖性<sup>[25]</sup>, 与我们的结果一致. IFN $\gamma$  的生物作用需通过其细胞表面受体<sup>[26]</sup>. IFN $\gamma$  受体有两个亚单位, 即  $\alpha$  链 (IFN $\gamma$  R $\alpha$ ) 和  $\beta$  链 (IFN $\gamma$  R $\beta$ ), 配体与  $\alpha$  链结合不能产生信号转导; 只有与  $\beta$  链结合才为信号转导所必需<sup>[26]</sup>, 与 IFN $\gamma$  结合会激活 JAK1 (Janus Kinase 1) 和 JAK2, 它们分别与 IFN $\gamma$  R $\alpha$  和 IFN $\gamma$  R $\beta$  链的细胞内结构域相联. JAK1 和 JAK2 的激活会导致酪氨酸磷酸化

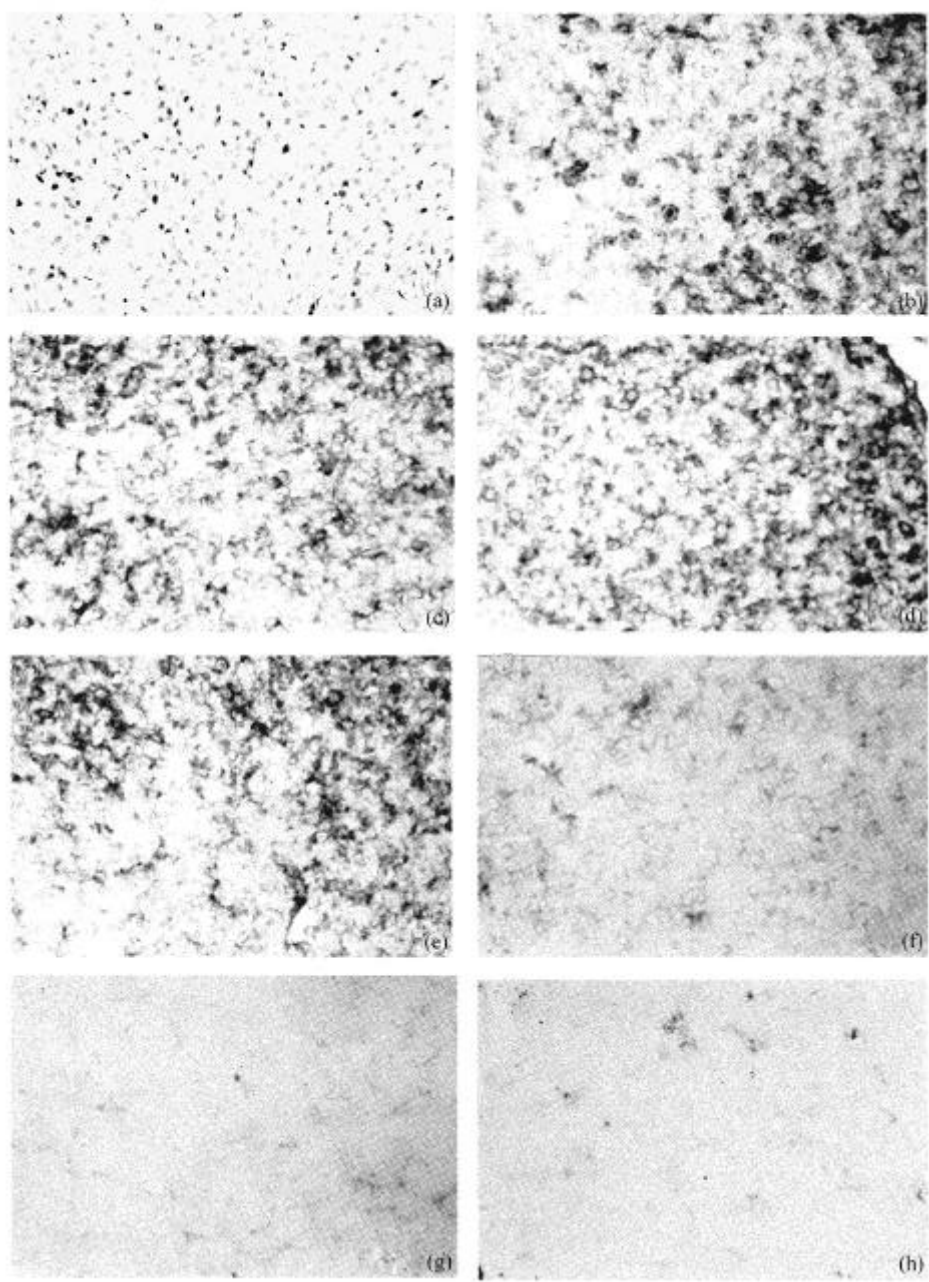


图 2 StAR mRNA 在成年假孕大鼠黄体中的表达  
(a) 阴性对照; (b) D1; (c) D2; (d) D4; (e) D6; (f) D8; (g) D10; (h) D13.  $\times 140$

激活 STAT-1. STAT-1 通过与磷酸化的酪氨酸和 Src 同源的两个结构域相互作用形成二聚体并进入细胞核来调节许多含有 $\gamma$ -激活序列元素的基因的转录<sup>[26, 27]</sup>.  $\text{IFN}_\gamma \text{R}\alpha$ 和  $\text{IFN}_\gamma$  mRNA 已在大鼠睾丸中确定,  $\text{IFN}_\gamma$  能通过 STAT-1 蛋白的磷酸化快速调节 Sertoli 细胞中的早期基因表达<sup>[28, 29]</sup>. 因此  $\text{IFN}_\gamma$  对 StAR 的调节有可能是由 JAK/STAT 途径介导的. 到目前为止, 还未见  $\text{IFN}_\gamma \text{R}\alpha$ 和  $\text{IFN}_\gamma \text{R}\beta$ 在大鼠黄体中存在的报道.  $\text{IFN}_\gamma$  对 StAR 的调节是否也是通过这个途径介

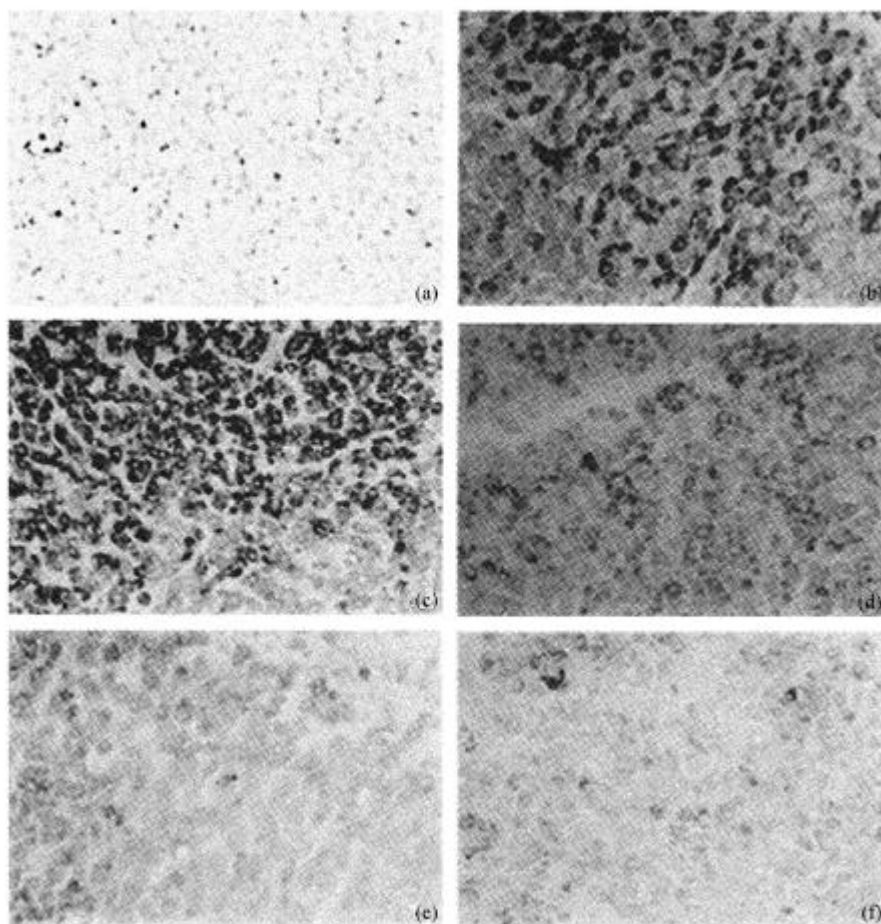


图 3 StAR 抗原在  $\text{IFN}_\gamma$  处理的成年假孕大鼠黄体中的表达

(a) 阴性对照; (b) 正常对照; (c)  $\text{IFN}_\gamma$  500 IU; (d)  $\text{IFN}_\gamma$  1 000 IU; (e)  $\text{IFN}_\gamma$  5 000 IU; (f)  $\text{IFN}_\gamma$  10 000 IU.  $\times 140$

导, 尚需进一步的研究.

致谢 本工作为洛克菲勒基金会和 WHO、国家攀登预选项目、国家自然科学基金(批准号: 39770290, 39770284, 39970107, 39770099)和中国科学院“九五”重点资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Simpson E R, Boyd G S. The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, 24: 10 ~ 17
- 2 FarkashY, Timberg R, Orly J. Preparation of antiserum to rat cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology*, 1986, 118: 1353 ~ 1365
- 3 Brownie A C, Simpson E R, Jefcoate C R, et al. Effect of ACTH on cholesterol side-chain cleavage in rat adrenal mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 46: 483 ~ 490
- 4 Stocco D M. A StAR search: implication in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod*, 1997, 56: 328 ~ 336
- 5 Clark B J, Stoucco D M. Steroidogenic acute regulatory protein ——the StAR still shines brightly. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 134: 1 ~ 8
- 6 Clark B J, Soo S C, Caron K M, et al. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein.

- Mol Endocrinol, 1995, 9: 1346 ~ 1355
- 7 Townson D H, Wang X J, Keyes P L, et al. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, 17 $\beta$ -estradiol. Biol Reprod, 1996, 55: 868 ~ 874
  - 8 Clark B J, Wells J, King S R, et al. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondria protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. J Biol Chem, 1994, 269: 28314 ~ 28322
  - 9 Sugawara T, Holt T A, Driscoll D, et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4778 ~ 4782
  - 10 Gorrope W C, Tüchel T, Kasson B G.  $\gamma$ -Interferon inhibits rat granulosa cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 157: 891 ~ 897
  - 11 Collart M A. Gamma interferon enhances macrophages transcription of the tumor necrosis factor/cathectin, interleukin-1 and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressor. J Exp Med, 1986, 164: 2113 ~ 2118
  - 12 Sandhoff T W, Mclean M P. Prostaglandin F $_{2\alpha}$  reduces steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. Endocrine, 1996, 5: 183 ~ 190
  - 13 Chen Y J, Feng Q, Liu Y X. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor  $\alpha$  in rat corpora lutea. Biol Reprod, 1999, 60: 419 ~ 427
  - 14 Ensio N, Jan O, Mats G, et al. Redistribution of ovarian blood flow after injection of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone in the adult pseudopregnant rat. Endocrinology, 1987, 120: 107 ~ 114
  - 15 Pescador N, Soumano K, Stocco D M, et al. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. Biol Reprod, 1996, 55: 485 ~ 491
  - 16 Lavoie H A, Benoit A M, Garmey J C, et al. Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. Biol Reprod, 1997, 57: 402 ~ 407
  - 17 Pollack S E, Furth E E, Kallen C B, et al. Localization of steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: 4243 ~ 4251
  - 18 Stocco D M, Clark B J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endor Rev, 1996, 17: 221 ~ 224
  - 19 Wang X J, Liu Z, Eimerl S, et al. Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein on intramitochondrial cholesterol transfer. Endocrinology, 1998, 139: 3903 ~ 3912
  - 20 Fairchild D L, Pate J L. Modulation of bovine luteal cell synthesis capacity by Interferon-gamma. Biol Reprod, 1991, 44: 357 ~ 363
  - 21 Liu Y X, Chen Y X, Shi F W, et al. Studies on the role of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type-1 in rat corpus luteum of pregnancy. Biol Reprod, 1995, 53: 1131 ~ 1138
  - 22 Fairchild D L, Pate J L. Interferon- $\gamma$  induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. Biol Reprod, 1989, 40: 453 ~ 457
  - 23 Schuitz R M. E type prostaglandins and interferon: yin-yang modulation of macrophage tumoricidal activity. Med Hypotheses, 1980, 6: 831 ~ 843
  - 24 Ji I, Slaughter R G, Ellis J A, et al. Analyses of ovine corpora lutea for tumor necrosis factor mRNA and bioactivity during prostaglandin-induced luteolysis. Mol Cell Endocrinol, 1991, 81: 77 ~ 80
  - 25 Lin T, Hu J X, Wang D L, et al. Interferon- $\gamma$  inhibits the steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid expression and protein levels in primary cultures of rat Leydig cells. Endocrinology, 1998, 139(5): 2217 ~ 2222
  - 26 Kalvakolanu D V, Borden E C. An overview of the interferon system: signal transduction and mechanism of action. Cancer Invest, 1996, 14: 25 ~ 53
  - 27 Darnell Jr J E. STATs and gene regulation. Science, 1997, 277: 1630 ~ 1635
  - 28 Jenab S, Morris P L. Differential activation of signal transducer and activator of transcription STAT-3 and STAT-1 transcription factors and c-fos messenger ribonucleic acid by interleukin-6 and interferon- $\gamma$  in Sertoli cells. Endocrinology, 1996, 137: 4738 ~ 4743
  - 29 Jenab S, Morris P L. Transcription regulation of Sertoli cell immediate early genes by interleukin-6 and interferon- $\gamma$  is mediated through phosphorylation of STAT-3 and STAT-1 proteins. Endocrinology, 1997, 138: 2740 ~ 2746

(2000-02-14 收稿, 2000-04-03 收修改稿)