

致死性和非致死性烫伤大鼠胞液和胞核糖皮质激素受体的研究

徐仁宝 谭金兴

(中国人民解放军第二军医大学病理生理教研室, 上海)

摘 要

本文以 [^3H] 地塞米松 (Dex) 为配体, 用放射配体结合测定法研究了致死性和非致死性烫伤大鼠的肝、脑胞液中糖皮质激素受体 (GCR) 的变化, 与对照组比较, 两组烫伤大鼠肝、脑胞液的 [^3H] Dex 特异结合的结合容量 (R_0) 均减少, 表观上的平衡解离常数 (K_d) 均增加; 和非致死性烫伤组比较, 致死性烫伤组 R_0 的减少更为明显。为了探讨胞液 GCR 的减少是否由于 [^3H] Dex-GCR 复合物转位到核内, 用交换法测定了肝核的 [^3H] B 特异结合, 结果对照组和烫伤组之间无明显差别。对这些变化的可能的机制和临床意义作了讨论。

应激时肾上腺糖皮质激素 (GC) 分泌增多已为众所周知, 但要全面认识应激时的 GC 效应, 还必须研究应激时靶细胞对 GC 的反应。我们曾报道^[1,2], 大鼠烫伤性应激时, 糖皮质激素受体 (GCR) 的结合容量 (R_0) 减少, 表观解离常数 (K_d) 偏大, 这种变化不仅见于肝脏, 也发生于脑, 提示这种变化为非器官特异性。之后不久, Turinsky^[3] 报道了热损伤后大鼠骨骼肌胞液 GCR 减少, Stith^[4] 报道了内毒素引起去肾上腺小鼠肝胞液 GCR 减少, 说明病理性应激时 GCR 的研究正在引起重视。为了进一步研究应激的强度, 即病情的严重程度和 GCR 变化之间的关系, 本文比较了致死性和非致死性烫伤大鼠的肝、脑胞液 GCR 的变化, 并通过对照组和烫伤组肝核 GCR 的比较, 对胞液 GCR 减少的可能机制作了初步的探讨。

一、材料和方法

1. 材料

动物 Wistar 大鼠, 2.5—3 个月, 体重 180—240 g, 性别不拘。

[1, 2, 6, ^3H] 皮质酮 (B) 和 [1, 2, 4 ^3H] 地塞米松 (Dex): 英国放化中心产品, 比活性分别为 84 Ci/mmol 和 46 Ci/mmol, 放化纯度约 97%。

其他试剂均见文献 [1, 5, 6]。

2. 方法

(1) 实验性烫伤 将大鼠背部不剪毛浸入沸水。致死性烫伤组 (以下简称致死组) 的烫

伤面积为直径 6.5 cm 的圆面积,烫伤时间为 10—15 s; 非致死性烫伤组(非致死组)为 5.3 cm 直径的圆面积, 6—7 s, 致死组大鼠由于体温下降,需予保暖方能存活到 6 h.

(2) 动物的处死 烫伤后 5.5—6.5 h, 于中午 12:00—13:00 之间断头处死. 快速处死以免动物挣扎. 对照组动物亦同时处死. 收集血液测定血浆 B, 取肝和两侧大脑半球测定胞液 GCR 和肝核 GCR. 为了消除各种干扰因素的影响,三组实验平行进行,即每次处死对照、致死和非致死组动物各 1 只,同时测定.

(3) 肝、脑胞液 [^3H] Dex 特异结合的测定 方法见文献[2,5],简述如下:将大鼠断头后,立即取出肝和大脑半球,匀浆, 175,000 g 离心 30 min, 取上清(即胞液)测定,以上操作均在 0—4℃ 下进行.

取 250 μl 胞液加 0.05 ml [^3H] Dex, 使其最终浓度为 2.5—30 nM. 非特异结合校正管再加 500 倍浓度的非标记 Dex. 0—4℃ 放置 4.5—5 h 后,加 0.3 ml 葡聚糖包裹的活性炭(DCC)吸附游离 Dex. 离心,取上清用液闪计数. 从 Scatchard 作图求出 [^3H] Dex 特异结合的 R_0 和 K_d .

(4) 肝核 [^3H] B 特异结合的测定 详见文献[6],简述如下:肝匀浆, 4,000 rpm 离心,留沉渣,再悬浮于 Tris-蔗糖缓冲液(TSS),使其浓度为 $10\text{--}15 \times 10^7$ 个核/ml. 用 TSS 洗 2—3 次,取 250 μl 核悬液加 50 μl [^3H] B, 使其最终浓度为 20 nM. 非特异结合校正管再加 500 倍浓度的非标记 B. 25℃ 保温 30 min,再用 TSS 将沉渣洗 4 次,加甲酸消化,液闪计数. [^3H] B 特异结合以 fmol/ 10^7 个核表示.

(5) 胞液蛋白的测定用 Lowry 法,血浆和胞液 B 的测定用竞争性蛋白结合分析法^[7].

二、结 果

1. 烫伤后的一般表现

烫伤后致死组动物极度兴奋,乱翻滚,乱咬,随后转为抑制,反应迟钝,约 4h 后动物卧倒,运动消失,呼吸慢而微弱,体温下降,所有动物皆逐渐进入濒死状态. 处死后可见腹腔脏器严重淤血,非致死组动物烫后表现比较正常,处死后内脏无明显淤血. 两组动物肝切片的 H-E 染色在光镜下实质细胞无明显病变.

2. 血浆和胞浆 B 的变化

烫伤动物的血浆 B 显著升高,致死组升高尤为明显. 肝、脑胞液的 B 浓度也升高,但和对照组相差平均不超过 4 nM,致死组和非致死组之间却无明显的差别(表 1).

表 1 血浆、肝和脑胞液的皮质酮浓度

组 别	动 物 数	血浆皮质酮 $\mu\text{g}\%$	胞液皮质酮 nM	
			肝	脑
对照组	6	1.58 ± 1.07	1.07 ± 1.09	2.95 ± 0.90
非致死组	8	12.0 ± 7.50	3.46 ± 1.12	6.97 ± 1.34
致死组	10	20.8 ± 5.71	3.53 ± 1.35	6.66 ± 2.50

3. 肝、脑胞液 [^3H] Dex 特异结合的变化

不论是致死组或非致死组,也不论是肝或脑胞液, R_0 和 R_{sat} (加饱和浓度的 [^3H] Dex, 即 30nM 时的特异结合量)都减少, K_d 都增加。不论是肝或脑胞液,致死组的 R_0 和 R_{sat} 都明显地少于非致死组,统计学上显著或非常显著; K_d 都小于非致死组。以上结果见表 2 和图 1。图 2 为各组中 1 只动物的实验结果的 Scatchard 作图。

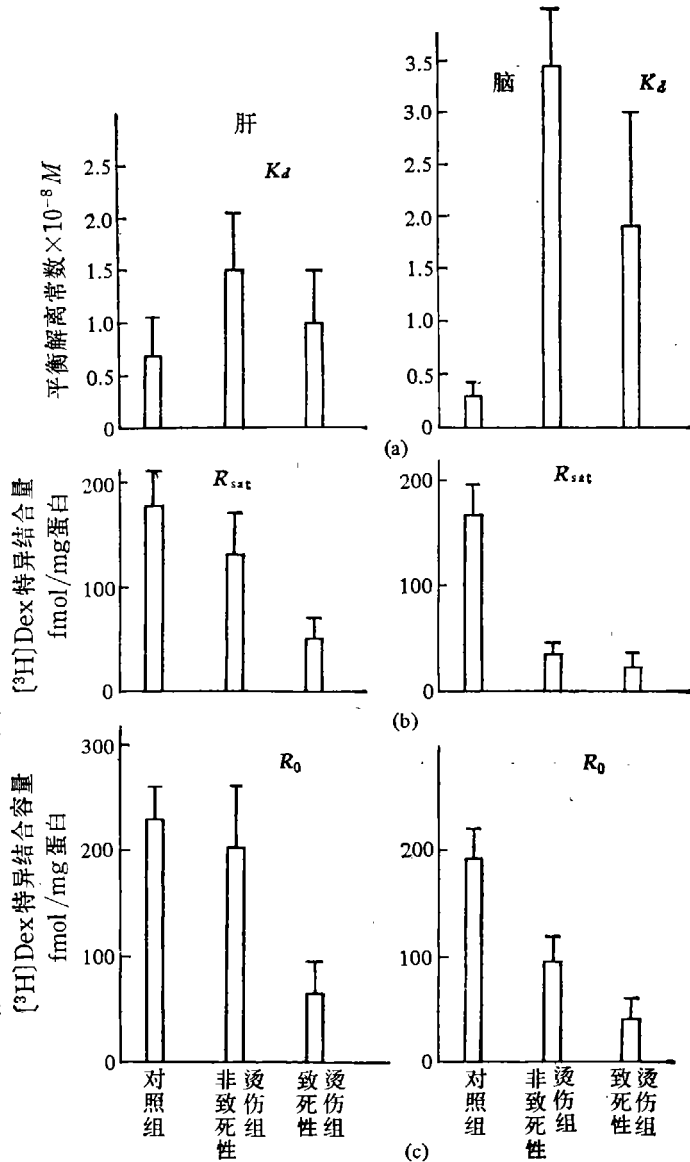


图 1 肝、脑胞液 [^3H] 地塞米松特异结合的 K_d (a), R_{sat} (b) 和 R_0 (c) 的变化

4. 肝核 [^3H] B 特异结合的变化

为了探讨上述胞液 GCR 的减少是否由于核转位,我们测定了肝核 GCR, 结果不论是非致死组和致死组,肝核 [^3H] B 特异结合与对照组比较均无明显的变化(表 3)。

表 2 肝、脑胞液 [³H] 地塞米松特异结合的 K_d , R_{sat} 和 R_0 的变化

组 别	肝 胞 液				脑 胞 液			
	动物数	R_0 fmol/mg蛋白	R_{sat} fmol/mg蛋白	$K_d \times 10^{-8} M$	动物数	R_0 fmol/mg蛋白	R_{sat} fmol/mg蛋白	$K_d \times 10^{-8} M$
对照组	6	231.7±28.8	177.4±35.2	0.70±0.37	6	192.8±28.2	168.5±26.8	0.32±0.12
非致死组	8	202.0±58.6	129.2±49.2	1.51±0.72 Δ	6	94.4±24.5 $\Delta\Delta\Delta$	34.9±10.0 $\Delta\Delta\Delta$	3.45±0.66 $\Delta\Delta\Delta$
致死组	10	66.9±27.6***	49.7±19.8***	1.07±0.44	10	38.7±23.0 $\Delta\Delta\Delta$ **	22.0±14.4 $\Delta\Delta\Delta$ *	1.90±1.13 $\Delta\Delta\Delta$ *

和对照组比

Δ $P < 0.05$

$\Delta\Delta$ $P < 0.01$

$\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$

和非致死组比

$*$ $P < 0.05$

$**$ $P < 0.01$

$***$ $P < 0.001$

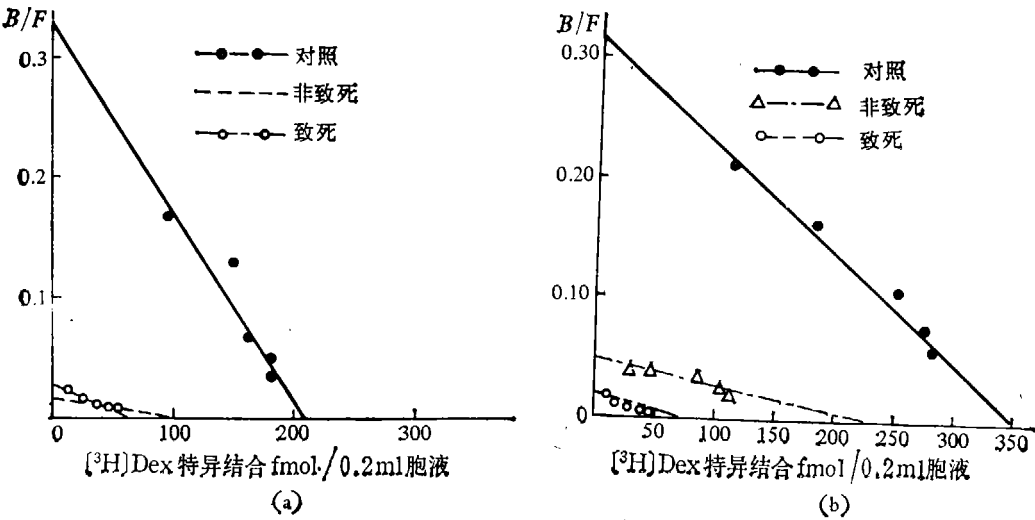


图 2 脑 (a)、肝 (b) 胞液 [³H] 地塞米松特异结合的 Scatchard 作图

表 3 肝核 [³H] 皮质酮特异结合的变化

组 别	动 物 数	[³ H]B 特异结合 fmol/10 ⁷ 个核
对 照 组	8	17.2±4.8
非致死组	8	12.3±4.3
致死组	8	16.4±6.3

三、讨 论

总结以上结果：(1)非致死组和致死组胞液 GCR 的变化和我们以前所报道的结果相似；(2)致死组胞液 GCR 的 R_0 和 R_{sat} 的减少比非致死组更为明显；(3)两个烫伤组的肝核 GCR

与对照组比较无明显变化。

烫伤后胞液 GCR 减少可能有以下原因: (1) 烫伤后血浆 GC 浓度增高, 内源性 B 对 GCR 的占据。我们曾经作了内源性 B 模拟实验^[1,2], 表明这原因是可以忽略的, 而且在本实验中, 虽然致死组和非致死组胞液 GCR 相差很大, 但胞液 B 的浓度却相差不多, 也说明占据不是 GCR 减少的主要原因。 (2) GCR 与 B 结合后转移到核内。根据目前对甾体激素作用机制的认识, 烫伤后 GCR 的核转位应当增加, 但我们的实验结果, 肝核 GCR 并不增多, 甚至还有减少的趋势。如我们在前文所报道^[6], 核内 [³H]B 特异结合包括两部分: 与内源性 B 的交换以及和核的直接结合。前者是转位到核内的 GC-R 复合物, 后者可能是未占据的 GCR。显然, 即使前者增加, 如果后者减少, 则所测得的 [³H]B 特异结合也可以不增多。不论如何, 这结果却提示, 烫伤后胞液 GCR 的减少看来主要地不是由于核转位。 (3) 血浆 B 升高对 GCR 的反向调节, 关于膜受体的反向调节研究已经很多, 对 GCR 的反向调节也已有了些报道。最近 Shipman^[8] 报道, 正常人口服 Dex 后 6h, 淋巴细胞的 GCR 比口服前减少 33—65%。卢建将氢化可的松加入培养液, 引起了人肝癌细胞 7721 系细胞的 GCR 减少^[9]。由此推测, 烫伤后 GCR 减少也可能通过类似的机制, 即反向调节, 因为烫伤后血浆 B 是明显升高的。

至于致死组 GCR 减少可能还有其他机制。在致死性烫伤, 由于严重的组织缺氧和酸中毒, 可导致 ATP 减少^[10] 和溶酶体酶的释放^[11]。有些作者报道^[12-14], ATP 对于维持 GCR 于活化型(即可以和 GC 结合的形式)是必须的。溶酶体释放的蛋白酶可以降解受体蛋白。这些可能是导致致死组 GCR 进一步减少的原因。

烫伤后 GCR 减少有何临床意义? 我们知道激素一般是要和靶细胞的受体结合后才能产生生物效应。受体减少有可能使靶细胞对 GC 的反应性减弱。Roth^[15] 等报道, 老年大鼠脂肪细胞的 GCR 减少, 与此平行地, Dex 抑制其氧化葡萄糖的反应也减弱, 提示 GCR 没有或只有很少的多余受体 (spare receptor)。因此, 像致死组, 肝、脑胞液的 R_{50} 分别地仅为对照组的 1/4 和 1/8。如此明显的减少很可能伴有靶细胞对 GC 的反应性减弱。近年来关于严重休克时的多器官衰竭讨论颇多, 但是否发生肾上腺皮质衰竭则还是一个有争论的问题。Murray 报道^[16], 临终病人血浆 17-羟皮质类固醇浓度显著升高, 我们也注意到严重烧伤病人临终前血浆皮质醇几乎无例外地都异常升高, 可达 50 $\mu\text{g}\%$ 左右 (上午 8 时的正常值为 $12.3 \pm 2.1 \mu\text{g}\%$), 说明烧伤病人直到临终一般并无肾上腺皮质功能的衰竭。但如果由于靶细胞 GCR 减少而导致靶细胞对血浆 GC 的反应性减弱, 那么其结果将和 GC 减少或肾上腺皮质功能过低类似。当然这种推测是否正确尚有待今后的探讨。

参 考 文 献

- [1] 徐仁宝等, 生理学报, **34**(1982), 460.
- [2] ———, 科学通报, **28**(1983), 3: 178.
- [3] Turinsky, J. et al., *Circulatory Shock*, **9**(1982), 205, (Abstract).
- [4] Stith, R. D. et al., *Infect. Immunol.*, **40**(1983), 613.
- [5] 徐仁宝等, 第二军医大学学报, 1981, 3: 161.
- [6] ———, 动物学报, 待发表.
- [7] 缪明等, 动物学杂志, 1980, 2: 41.
- [8] Shipman, G. F. et al., *Blood*, **61**(1983), 1086.

- [9] 卢建等, 第二军医大学学报, 待发表.
- [10] Lindberg, B. et al., *Ann. Surg.*, **187**(1978), 103.
- [11] Bell, M. L. et al., *Surgery*, **70**(1971), 341.
- [12] Wheeler, R. H. et al., *J. Biol. Chem.*, **256**(1981), 434.
- [13] Ress, A. M. and Bell, P. A., *Biochem. Biophys. Acta*, **411**(1975), 121.
- [14] Chader, G. J., *J. Neurochem.*, **21**(1973), 1525.
- [15] Roth, G. S., in *Biological Mechanisms in Aging. Conference Proceedings* (Ed. Schimke, R. T.), **U. S.** Department of Health and Human Services, NIH Publication, 1981, 678.
- [16] Murray, D., *J. Endocrinol.*, **39**(1967), 571.