

糖皮质激素对糖皮质激素受体的调节*

——II. 大鼠肝、脑、脾的研究

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

将氢化可的松 (F) 混合在聚乙烯醇 (PVA) 内, 给大鼠皮下注射, 将血浆糖皮质激素 (GC) 维持在应激浓度, $20-40 \mu\text{g}/\text{dl}$ 3 天, 结果发现肝胞液糖皮质激素受体 (GR) 的结合容量 (R_0) 和脾细胞 GR 的结合量 (R_s) 于注射后 1h 已明显减少, 并维持于低水平. 注射后 7 天, 血浆 GC 已下降到正常水平, 但 GR 恢复得较慢, 直到 11 天脾细胞 GR 尚未完全恢复. GR 的 K_d 不变, 脑胞液 GR 的变化不明显. 实验结果表明, 在整体动物 GC 对 GR 和在培养细胞一样也存在着负调节, 但对不同的靶器官, GR 的负调节可能具有不同的特点.

关键词: 糖皮质激素, 糖皮质激素受体, 受体调节

糖皮质激素 (GC) 引起糖皮质激素受体 (GR) 结合量减少 (以下简称 GR 减少), 这一负调节 (down-regulation, 也可译为下调) 现象在培养细胞基本上已经得到证明; 但在整体动物, 血浆 GC 升高是否可以引起 GR 减少则尚无定论, 有关的文献报道也寥寥无几^[1-6]. Shipman 等^[1,2]报道, 给白血病人和健康志愿者口服地塞米松 (Dex) 可引起白血细胞和外周血淋巴细胞 GR 减少. Sapolsky 等^[3]给大鼠皮下注射 5mg 皮质酮的油剂, 每天一次, 连续注射 4 天, 最后一次注射后 36h 处死, 发现海马的 GR 减少. Murakami 等^[4]给羊肌肉注射 ACTH, 每天两次, 每次 40u, 连续注射 24 天, 在此期间内白细胞 GR 的结合容量 (R_0) 与注射前相同. Kontula 等^[5]报道, 柯兴氏症候群和阿狄森氏病病人的外周血淋巴细胞 GR 和健康人的比较没有明显的差别. 最近 Brentani 等^[6]报道, 未经治疗的肾上腺皮质功能不全病人的外周血单个核白细胞的 GR 低于正常, 经用 GC 补充治疗后, GR 正常. 既然 GC 对各种培养细胞的 GR 呈现负调节, 推测在整体动物也应当存在着同样的调节过程; 上述混乱的实验结果只是说明整体动物比培养细胞复杂得多, 要明确地显示出这一调节现象必须要有合适的实验条件. 复习上述文献, 发现其共同的缺点是在实验过程中没有连续、系统地检测血浆 GC, 因此难于将各实验室的结果加以比较并作进一步深入的分析. 本文是在文献[7]用培养细

1988 年 3 月 4 日收到修改稿.

* 国家自然科学基金资助项目.

胞研究的基础上,在整体动物设法将血浆 GC 浓度维持在应激水平 3 天(这既是模拟培养细胞的实验条件^[7],又符合于生理性和病理性应激的实际情况),于不同的天数检测几种 GC 靶器官的 GR 的同时检测血浆 GC,借此了解血浆 GC 升高对 GR 的影响,目的在于证明整体动物和培养细胞一样,应激浓度的 GC 可以引起 GR 减少,与此同时建立一个稳定的 GC 对 GR 负调节的动物模型,为进一步深入研究打下坚实的基础。

一、材料和方法

1. 材料

Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体重 150g 左右。氢化可的松 (F) 由扬州制药厂生产的纯品。聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 是北京有机化工厂产品,乙醇处理去除杂质备用。[1,2,6,7-³H]皮质酮 ([³H]B) 为英国放化中心产品,3.11TBq/mmol (84Ci/mmol),放化纯度 97%。[1,2,4-³H] Dex, Dex 及其他试剂见文献[8]。

2. 方法

(1) F 的给予方法 将 PVA 配成 12% 水溶液,加一定量的 F,搅匀,使成糊状(以下简称 F-PVA),皮下注射 0.5ml。第一次注射的 F-PVA 中 F 的含量为 40mg/0.5ml (40mg F-PVA),24h 后补充注射 F 含量为 20mg/0.5ml 的 F-PVA (20mg F-PVA),详见文献[9]。预试验证明, PVA 不干扰血浆 GC 的测定,对 GR 没有明显的影响。

(2) 血浆 GC 的测定 用竞争性蛋白结合分析法,结合蛋白用本实验室制备的大鼠皮质激素结合球蛋白 (CBG),标记激素用 [³H]B。由于 B 和 F 与 CBG 均呈高亲和力的结合,故测得的是血浆 B 和 F 的总浓度(以下简称血浆 GC)。

(3) 肝、脑胞液 GR 的测定 大鼠断头处死后,取肝和两侧大脑半球,按前文报道的方法^[10,11]制备胞液,以 [³H] Dex 为配体,用改进了的 Hubbard 的交换法^[8]测定。此法充分排除了内源性 GC 占据受体对 GR 总量测定的影响。从 Scatchard 公式和作图求出 R_0 和平衡解离常数 K_d 。

(4) 肝核 GR 的测定 见文献[12]。

(5) 脾细胞 GR 的测定 用李峰的方法^[13],稍加修改。以最终浓度 10nmol/L [³H]Dex 作一点分析,所测得的特异结合量 (R_s) 以 fmol/ 10^6 个细胞表示。

二、结 果

1. 血浆 GC 的浓度

对照组大鼠断头处死后测得的血浆 GC 为 $4.4 \pm 1.3 \mu\text{g/dl}$,与本实验室历年测得的大鼠血浆 GC 的基础值近似。给大鼠皮下注射 40mg F-PVA 后 6h 内,血浆 GC 稳定在 $42-44 \mu\text{g/dl}$ 之间,24h 后下降到 $20 \mu\text{g/dl}$ 左右,这时补充注射 20mg F-PVA,血浆 GC 又迅速升高到 $40-45 \mu\text{g/dl}$ 之间(详见文献[9]),第一次注射后 7 天血浆 GC 已下降到正常水平 $10 \mu\text{g/dl}$ 以下(图 1)。

2. 肝胞液、胞核 GR 的变化

对照组肝细胞 [³H] Dex 特异结合的 R_0 为 $722.18 \pm 112.35 \text{ fmol/mg 蛋白质}$,注射 40mg F-PVA 后 1h, R_0 已减少约一半,3 天内基本上维持在这水平。补充注射后 6 天,血浆 GC 虽

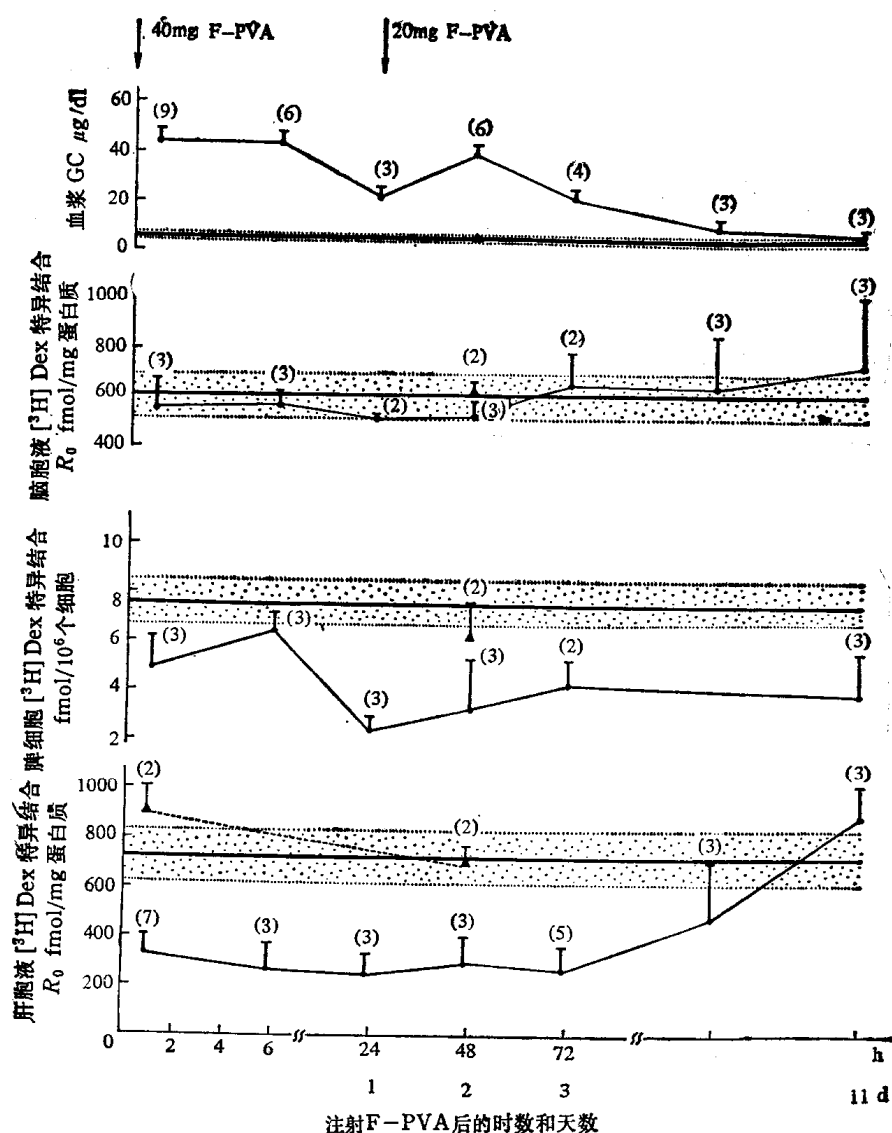


图1 大鼠注射 F-PVA 后血浆 GC, 脑胞液 GR 的 R_0 、脾胞液 GR 的 R_s 和肝胞液 GR 的 R_0 的变化 ($\bar{x} \pm SD$)

(图中横的粗线为对照组的均值, 细点区表示对照组的 $\pm SD$ 范围。

▲ 和虚线表示注射 0.5ml PVA 对照组的 $\bar{x} \pm SD$)

已下降到正常水平, 但 GR 的 R_0 仍低于注射前(见表 1, 图 1), Kd 无明显变化。

GC 浓度升高的条件下, 由于 GC-GR 复合物的生成和 GR 的活化, GR 和核的亲合力增加。为了确定上述肝胞液 GR 的减少是否由于所谓的核转位, 检测了肝核 GR。对照组肝核的 $[^3H]$ B 特异结合为 31.27 ± 9.90 fmol/mg DNA ($n=6$), 注射 40mg F-PVA 后 1h 为 32.73 ± 15.33 fmol/mg DNA ($n=7$), 两组基本相同, 说明肝胞液 GR 的减少并非核转位所致。

3. 脑胞液 GR 的变化

对照组脑胞液 $[^3H]$ Dex 特异结合的 R_0 为 598.8 ± 91.15 fmol/mg 蛋白质, 注射 F-PVA 后 R_0 有减少的趋势, 低于对照组的均值; 注射后 24h 最低, R_0 为 502.95 ± 20.44 fmol/mg 蛋白

表 1 血浆 GC 升高引起大鼠肝胞液和脾细胞 GR 的变化

	肝胞液 [^3H] Dex 特异结合			脾细胞 [^3H] Dex 特异结合	
	R_0		Kd $\times 10^{-8}\text{mol/L}$	R_s	
	fmol/mg 蛋白质	均数的%		fmol/ 10^6 个细胞	均数的%
对照组	722.18 $\pm$ 112.35(12)	100	1.83 $\pm$ 1.68	7.55 $\pm$ 0.88(10)	100
注射 40mg F-PVA 后					
1h	331.43 $\pm$ 69.73(7)***	45.9	1.60 $\pm$ 0.59	4.83 $\pm$ 1.26(3)*	64.0
6h	277.73 $\pm$ 94.17(3)***	38.5	1.53 $\pm$ 0.55	6.37 $\pm$ 0.76(3)	84.4
24h	249.93 $\pm$ 76.08(3)***	34.6	1.50 $\pm$ 0.10	2.44 $\pm$ 0.43(3)***	32.3
补充注射 20mg F-PVA					
48h	297.20 $\pm$ 104.16(3)***	41.2	2.55 $\pm$ 0.92	3.37 $\pm$ 1.99(3)***	44.6
72h	256.70 $\pm$ 100.67(5)***	35.6	2.12 $\pm$ 0.89	4.25 $\pm$ 1.06(2)***	56.3
7天	473.47 $\pm$ 232.59(3)**	65.6	2.26 $\pm$ 1.37		
11天	876.57 $\pm$ 188.17(3)	121.4	2.50 $\pm$ 0.99	3.90 $\pm$ 1.60(3)***	51.7
注射 PVA0.5ml 后					
1h	920.6 $\pm$ 138.0(2)	127.5	2.50 $\pm$ 0		
补充注射 PVA0.5ml					
48h	694.5 $\pm$ 42.5(2)	96.2	0.90 $\pm$ 0.14	7.50 $\pm$ 1.60(2)	99.3

注: 数值为 $\bar{x} \pm SD$ 括弧内的数字为动物数。

和对照组比较: * 为 $p < 0.05$, ** 为 $p < 0.001$, *** 为 $p < 0.001$ 。

质,但统计学上不显著(图 1)。Kd 的变化也不显著。

4. 脾细胞 GR 的变化

对照组脾细胞的 [^3H] Dex 特异结合的 R_s 为 $7.55 \pm 0.88 \text{fmol}/10^6$ 个细胞,注射 40mg F-PVA 后 1h 减少约 40%,以后维持在低水平,补充注射后 10 天,血浆 GC 恢复到正常水平至少已 4 天,但 R_s 仍未完全恢复到对照组的水平。

三、讨 论

本研究表明,血浆 GC 升高可以引起肝、脾 GR 减少, Kd 不变,这和培养细胞所观察到的结果相同,说明在整体动物 GC 对 GR 也存在着负调节。因为我们所设计的是应激浓度的 GC,因此这实验结果应当是有生理和病理意义的。

血浆 GC 上升到 $40 \mu\text{g}/\text{dl}$ 左右时,1h 即可出现肝、脾 GR 的减少,尔后一直维持在低水平;当血浆 GC 下降到正常水平后数日,GR 才上升到对照组的结合量。这结果是明显的,可以重复,因此可以作为研究 GC 对 GR 负调节的比较好的动物模型。

在此动物模型中,脑胞液 GR 的变化却不明显,这和 Sapolsky 所报道的结果似乎是矛盾的。但我们和他的实验条件有两点不同:第一, Sapolsky 用的标记配体是 B 而不是 F;第二,我们所用的样品是整个大脑半球的胞液,而不是海马、杏仁等不同的脑区,因此有可能掩盖了少数脑区 GR 的变化。不论如何,这实验结果提示我们,GC 对不同靶器官 GR 的调节可能具有不同的特点。

和 GC 对人体肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞 GR 的负调节^[7]比较,大鼠肝胞液 GR 的负调节具有出现快、恢复慢的特点。Svec^[14]曾提出,在 GC 作用下,GR 减少得慢是 GR 负

调节的一个特征;现在看来这只是培养细胞 GR 负调节的特征,而不是整体动物 GR 负调节的特征。对于这种差别的机理,目前还只能作一些很初步的推测。首先可以考虑的是 GR 半衰期 ($T_{1/2}$) 的不同。SMMC-7721 和 GH₁ 细胞 GR 的 $T_{1/2}$ 分别为 $3.5 \pm 0.3\text{h}^{[15]}$ 和 $9.5 \pm 0.3\text{h}^{[16]}$, 而正常小鼠脾细胞 GR 的 $T_{1/2}$ 仅为 $1.6 \pm 0.5\text{h}^{[17]}$, 似乎正常细胞 GR 蛋白的更新率比培养的肿瘤细胞的要快一些,这可能是在正常大鼠肝 GR 负调节出现得比较快的一个原因。其次,在整体动物还要考虑 GC 通过神经、内分泌、代谢等的间接作用影响 GR 的可能性,在这方面,目前尚无可供讨论的文献资料。

GC 对 GR 的调节是解释 GR 的某些生理波动和病理变化的理论基础。以大鼠的烫伤性应激为例,烫伤后血浆 GC 升高,与此同时肝胞液 GR 减少^[10];虽然其减少的速度和幅度以及变化的时间过程和本实验结果十分相似,但烫伤后大鼠脑胞液的 [³H] Dex 特异结合也明显减少^[11],这就提示应激后 GR 的减少不完全是由于 GC 分泌增多对 GR 的负调节,还有其他机制的参与。

我们的实验结果强烈地提示,GR 结合量随着机体内、外环境的变化而不断地变动。经典的概念认为受体的功能有二:接受信息和转换信息。GR (可能其他受体也是如此) 在这两个基本的功能的基础上,可能和 GC 或其他激素一样,在维持机体自稳中,它本身也起到调节因子的作用。

GC 对 GR 的调节是基础和临床内分泌学中的一个重要问题。由于对它的研究起步不久,尚有许多有待解决的问题。随着研究的深入,今后人们必然更多地要用整体动物进行受体调节的研究,以阐明受体调节在机体自稳中的作用并对临床治疗中合理使用激素提出建议,在这意义上,本工作为今后的研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Shipman, G. F. et al., *Blood*, **58**(1981), 1198.
- [2] Shipman, G. F. et al., *ibid.*, **61** (1983), 1086.
- [3] Sapolsky, R. M. et al., *Endocrinology*, **114**(1984), 287.
- [4] Murakami, T. et al., *J. Steroid Biochem.*, **13**(1980), 1125.
- [5] Kontula, K. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**(1980), 654.
- [6] Brentani, M. M. et al., *Hormone Res.*, **24**(1986), 9.
- [7] 孙尔维等,第二军医大学学报,待发表.
- [8] 谭金兴等,生物化学与生物物理进展,1987,4: 56.
- [9] 谭金兴等,应用生理学杂志,待发表.
- [10] 徐仁宝等,生理学报,34(1982),460.
- [11] 徐仁宝等,科学通报,28(1983),178.
- [12] 徐仁宝等,动物学报,32(1986),201.
- [13] 李 峰等,第二军医大学学报,9(1988),213.
- [14] Svec, F., *Life Science*, **36**(1985), 2359.
- [15] 郭 佐等,实验生物学报,18(1985),471.
- [16] McIntyre, W. R. et al., *J. Biol. Chem.*, **260**(1985),418.
- [17] 郭 佐等,实验生物学报,19(1986),321.