文章编号:1000-5404(2006)17-1735-03

论著

严重烧伤早期SRC-3基因敲除小鼠肝脏糖皮质激素受体表达变化的实验研究

杜智勇,粟永萍,徐建明,廖 岚,冉新泽,李 军,王峰超,唐 棠 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究严重烧伤早期SRC-3基因敲除小鼠肝脏糖皮质激素受体表达及核转位的变化。**方法** 以SRC-3基因敲除小鼠为实验组,以野生型小鼠为对照组,以小鼠15% ~20% TBSAⅢ度烧伤为实验模型,观察两组在严重烧伤前、烧伤后1、6、12 h肝脏GR表达及核转位的变化,同时提取致伤前、致伤后1 h以及6 h血清标本,观察炎性细胞因子TNF-α及抗炎细胞因子IL-10的变化。**结果** 野生型小鼠致伤后肝脏总蛋白中GR 1 h即显著下降,6 h仍明显低于正常,12 h有所恢复。而SRC-3基因敲除小鼠致伤后肝脏总蛋白中GR无明显变化,野生型小鼠和SRC-3基因敲除小鼠致伤后肝脏GR核转位均增加,但SRC-3基因敲除小鼠GR核转位增加更为显著;两组致伤后炎性细胞因子TNF-α均升高,但野生型小鼠升高更为显著,而实验组抗炎细胞因子IL-10的升幅大于对照组。**结论** 严重烧伤对野生型小鼠和SRC-3基因敲除小鼠肝脏GR的影响具有明显的差异,SRC-3的缺失可能减轻了严重创伤早期对GR功能的抑制作用。

关键词: 类固醇受体辅活化子-3;糖皮质激素受体;基因敲除
中图法分类号: R322.47; R392.13; R644.02 **文献标识码:** A

Effect of burn injury on glucocorticoid receptor in SRC-3 knock out mice

DU Zhi-yong, SU Yong-ping, XU Jian-ming, LIAO Lan, RAN Xin-ze, LI Jun, WANG Feng-chao, TANG Tang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of burn injury on the expression of glucocorticoid receptor (GR) and its nuclear translocation in SRC-3 knock out mice. **Methods** SRC-3 knock out mice were used as experiment group and wild mice as control group. The expression of glucocorticoid receptor in total hepatic protein extract was investigated before burn, 1 h, 6 h, 12 h after burn. The ability of GR translocation into nuclear was also measured in hepatic nuclear extract. Simultaneously, the serum samples were acquired before burn, 1 h, 6 h after burn. The levels of cytokines TNF-α and IL-10 in serum were measured. **Results** The level of GR expression in total hepatic protein extract declined dramatically 1 h and 6 h after burn, and recovered at 12 h after burn in wild mice, whereas the level of GR expression did not decline after burn in SRC-3 knock out mice. Although the nuclear translocation of GR were all increased in two groups after burn, but the quantity of GR in nuclear extract was more higher in SRC-3 knock out mice than that in wild mice. The level of serum TNF-α and IL-10 all increased in two groups, but much higher level of proinflammatory cytokine TNF-α and lower level of antiinflammatory cytokine IL-10 was observed in wild mice than SRC-3 knock out mice. **Conclusion** There exist significant differences of GR expression and nuclear translocation after burn injury between wild mice and SRC-3 knock out mice. Deficiency of SRC-3 may attenuate repressive effect of burn injury on GR function.

Key words: steroid receptor coactivator-3; GR; gene knock out

严重创伤使机体产生应激反应。这种应激反应的突出表现之一为下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴)的异常亢进,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)分泌大量增加。而GC通过与其受体(glucocorticoid receptor, GR)作用是机体发挥抗炎、抗应激的最重要的分子机制。GC通过与GR结合抑制炎症介质和细胞因子的释放对调控机体早期急性反应和炎症反应起着至关重要的作用。GC以及其他应激激素一起不仅与炎性细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8等相互作用,同时还刺激抗炎细胞因子IL-10、IL-4以及TGF-β的释放,发挥其强大的抗炎活性[1]。GC与GR结合后使GR活化,GR由细胞质进入核内后直接或间接地与靶基因结合

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201);海外青年学者合作研究基金资助项目(30328025)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054201) and the China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30328025)

作者简介:杜智勇(1971-),男,河南省开封市人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究,现在新桥医院麻醉科工作。电话:(023)68774682
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009

收稿日期:2005-09-28;修回日期:2006-01-05

并调控这些基因的转录。目前已经知道每个细胞内GC直接调控的基因约有10～100个，更多的则是GC通过与其他转录因子或辅因子结合发挥间接调节作用[2]。所以GC的抗炎机制具有广泛性和复杂性。

我所以往的研究发现严重创伤后组织细胞糖皮质激素受体(GR)表达明显下调与功能抑制[3]，而类固醇受体辅活化子(steroid receptor co-activator, SRC)是近期发现的与GR关系密切的辅调节蛋白。鉴于GR在创伤应激及炎症中的重要作用，因此我们以SRC-3基因敲除小鼠为模型，观察SRC-3蛋白的缺失对GR抗炎作用的发挥有何影响并探讨其意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SRC-3杂合子小鼠(SRC-3$^{+/-}$)，体质量10～15 g，由美国贝勒医学院引进，在我所层流动物房内进行饲养和繁殖以获得SRC-3基因敲除纯合子。

1.2 小鼠的基因型鉴定

亲代杂合子小鼠的子代可能出现以下3种基因型：野生型(SRC-3$^{+/+}$)、杂合型(SRC-3$^{+/-}$)以及纯合型(SRC-3$^{-/-}$)。通过采集小鼠尾部基因组DNA，以引物1(5′-GATGAGTGGAC-TAGGCGAAAGCTCT，位于SRC-3基因的上游区域，作为通用引物)、引物2(5′-GCTGAGATTTGCAGAGATGAGCTC，位于SRC-3基因敲除区域，用于检测野生型)和引物3(5′-GGCGATTAAGT-TGGGTAACGCCAG，位于LacZ indicator，用于检测突变型)进行PCR扩增后电泳，由引物1和2检测出的约450 bp条带为野生型小鼠，由引物1和3检测出的约230 bp条带为基因敲除纯合子小鼠，两带均出现为杂合子小鼠，具体操作见文献[4]。野生型小鼠用作对照组，SRC-3基因敲除小鼠用作实验组。

1.3 动物模型的建立及标本的提取

1.3.1 15%～20% TBSAⅢ度烧伤模型　小鼠5只，体质量(20±5)g，雌雄不拘，背部剪毛并确定致伤面积，以凝固汽油涂抹拟致伤部位，点燃汽油后致伤7～8 s，背部以碘氟涂抹抗感染，腹腔补液(生理盐水1 ml/10 g)后放入笼中自由摄食。

1.3.2 标本采集及处理　分别于伤前、伤后1、6、12 h将小鼠处死后提取肝脏组织标本，放入液氮中保存，待总蛋白和核蛋白提取。于伤前、伤后1、6 h提取股动脉血，分离血清，-70 ℃保存，待测细胞因子。

1.3.3 肝脏总蛋白提取　取约100 mg肝脏组织，加入PIERCE公司的T-PER总蛋白提取液1～2 ml后于玻璃匀浆器中匀浆，10 000 r/min离心5 min后收集上清，Bradford法测定蛋白含量后，分装并于-70℃保存备用。

1.3.4 肝脏核蛋白提取　取肝组织100 mg，加入1 ml裂解缓冲液A(10 mmol/L Hepes pH 7.9，10 mmol/L KCl，0.1 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L EGTA，1% NP-40，1 mmol/L DTT，0.5 mmol/L+PMSF)冰浴中匀浆，4 ℃ 12 000×g离心10 min，弃上清，再加入不含NP-40的裂解液A1.5 ml，混匀后冰浴中放置10 min，4 ℃ 12 000×g离心10 min，弃上清，再加入100 μl裂解液B(20 mmol/L Hepes pH 7.9，0.4 mol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L EGTA，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF)，冰浴中放置30 min，4 ℃ 12 000×g离心10 min，提取上清，Bradford法测定蛋白含量后，分装并于-70 ℃保存备用。

1.4 Western blot分析

按常规方法行SDS-PAGE电泳，将已测浓度的每组样本等量混合，每个加样孔上40 μg蛋白量(加样前蛋白需变性)，电泳完毕后采用半干转印法将蛋白转入PVDF膜上，封闭后加入一抗(1∶500)、二抗[1∶(2 000～3 000)]行Western blot分析。

1.5 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析，两组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 小鼠致伤后细胞因子TNF-α及IL-10的变化

采用ELLIA双抗体夹心法，以450 nm处OD值表示，见表1。从表1中可以看出两组致伤后炎性细胞因子TNF-α均升高，但野生型小鼠升高更为显著，而实验组抗炎细胞因子IL-10的升幅大于对照组。

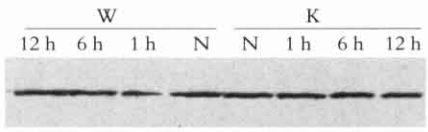
表1 烧伤早期TNF-α及IL-10的变化($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-10
对照组		
伤前	0.029 2±0.011 1	0.051 2±0.003 9
伤后1 h	0.096±0.013 3[b]	0.105±0.029[a]
伤后6 h	0.085 6±0.013 1[b]	0.096±0.045 7[a]
实验组		
伤前	0.030 4±0.008 17	0.048±0.013 2
伤后1 h	0.064 0±0.013 8[bd]	0.140±0.011 3[bc]
伤后6 h	0.064 4±0.006 23[bd]	0.097 2±0.008 9[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，组内不同时相点比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，组间相应时相点比较

2.2 小鼠致伤后肝脏总蛋白GR表达的变化

野生型小鼠致伤后肝脏总蛋白中GR 1 h即显著下降，6 h仍明显低于正常。而SRC-3基因敲除小鼠致伤后GR无明显下降(图1)。

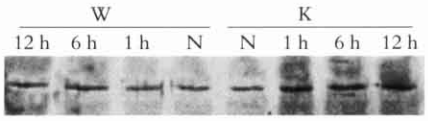


W：野生型小鼠；K：基因敲除小鼠

图1 肝脏总蛋白GR表达变化

2.3 小鼠致伤后核内GR转位情况

SRC-3基因敲除小鼠致伤后GR入核明显高于野生型小鼠(图2)。



W：野生型小鼠；K：基因敲除小鼠

图2 伤后1 h GR核转位情况

3 讨论

到目前为止，已有3个SRC家族成员获得了确

认。它们是 SRC-1、SRC-2（GRIP1、TIF2、或 NcoA-2）、SRC-3（p/CIP、PAC3、ACTR、AIB1 或 TRAM-1）[5]。它们同属于 SRC/p160 家族。每一个 SRC 家族成员都作为通用辅活化子存在，与多种核受体以及其他转录因子相互作用；每个 SRC 家族成员之间的作用具有重叠性，如在转录分析体系中，3 个 SRC 成员均能对 GR、PR 以及 ERα 发挥作用。由于 GR 是机体抵抗应激和炎症反应的关键因子，而 GR 发挥作用的关键步骤之一是在核内通过与辅活化子结合并招募其他转录因子与 DNA 结合促进或抑制相关基因转录从而发挥其强大的抗炎效应。对于 SRC 成员的缺失是否会影响 GR 的抗炎效应到目前为止少见相关文献报道。

我们以往的研究发现严重烫伤大鼠肝脏 GR 表达下调，GR 功能受抑制，而这种功能抑制与严重烫伤后高炎性细胞因子血症密切相关[3]，TNF-α 及 IL-1 能够明显降低 GR 在细胞质和细胞核的表达量[6]。在本实验中，我们也发现了严重烧伤后野生型小鼠和 SRC-3 基因敲除小鼠炎性细胞因子 TNF-α 均升高，但野生型小鼠的升高程度要大于 SRC-3 基因敲除小鼠，说明缺失 SRC-3 蛋白部分影响了创伤对炎症因子的诱发效应。在我们的实验中还发现野生型小鼠烧伤后肝脏 GR 早期（1 h）就明显降低，6 h 仍明显低于正常，12 h 有所恢复，而 SRC-3 基因敲除小鼠烧伤后早期肝脏 GR 并没有明显变化。另外从 GR 的核转录情况来看，虽然两者致伤后均表现出 GR 入核增加，但 SRC-3 基因敲除小鼠 GR 入核的量明显多于野生型小鼠，说明 SRC-3 的缺失并没有明显影响 GR 的表达和核转运甚至有所增强。

以上研究结果说明，虽然敲除了 SRC-3 基因，丧失了 SRC-3 蛋白的功能，但 GR 的功能并没有受到明显的影响，SRC-3 基因敲除小鼠致伤后表现出近乎正常的 GR 表达和较强的核转运能力以及更低的炎性细胞因子（TNF-α）分泌和更高的抗炎因子（IL-10）水平，这些都提示 SRC-3 的缺失部分保护了严重创伤对 GR 功能的抑制作用，减轻了严重创伤后的炎症和应激反应，增加了动物对严重创伤的耐受性，这与我们观察到的 SRC-3 基因敲除小鼠烧伤后无论是精神状态还是活动度均优于野生型小鼠的大体情况相一致。那么为什么作为核受体辅活化子的 SRC-3 的缺失并没有明显影响 GR 的功能呢，甚至 GR 功能在应激状态下还得到了保护，我们推测这可能与 SRC 家族对核受体的不同选择性有关。根据目前的资料，SRC 家族成员虽然可以和多种核受体超家族作用，如糖皮质激素受体（GRα、GRβ、GRγ）、盐皮质激素受体（MR）、雌激素受体（ERα、ERβ）、孕酮受体（PR-A、PR-B）以及雄激素受体（AR）等，但它们对不同的核受体的辅活化作用是有选择性的。SRC-1 主要在 AR 以及 PR 功能的正常发挥上具有重要作用；SRC-2 则因其表现在与 GR 和 ER 的 LBD 相互作用而被认识，SRC-2 能够与 GR、ER、RARα 以及 PR 作用，但主要对 GR、ER 和 AR 发挥辅活化作用；SRC-3 也对多种 NR 发挥辅调节作用，包括 RAR、TR、RXR、GR、PR 以及 ER 等，另外 SRC-3 也能与其他转录因子作用，如 IFN-γ、cAMP 调节元素结合蛋白（CREB）等相互作用[7]，目前倾向于认为 SRC-2 是 GR 发挥作用的主要辅调节蛋白。我们的研究也证实 SRC-3 并不是 GR 在调控炎症和应激反应中优先选择的辅活化子。

大量的研究资料表明，NF-κB 和 AP-1 是促进机体炎症反应的两个关键的转录因子，它们促进体内多种炎症因子（如 TNF-α、IL-1β、IL-2、IL-6、IFN-γ 等）的释放。GR 抗炎作用的发挥很大程度上取决于其与转录因子 NF-κB 和 AP-1 的相互拮抗作用[2,8]。近来的研究资料认为 SRC-3 也是 NF-κB 的重要辅活化子，对后者转录活性的发挥起着至关重要的作用[9,10]，缺失 SRC-3 蛋白势必影响 NF-κB 功能的发挥。从本研究的结果看，我们认为对于 SRC-3 基因敲除小鼠来说，由于缺乏了 SRC-3 蛋白辅活化作用的作用，严重创伤后主要是 NF-κB 功能（而不是 GR 功能）受到影响，抑制了其所调控的前炎细胞因子的分泌，同时也部分解除了其对 GR 的拮抗作用，所以表现出抗炎活性的增强。对 GR 来说，SRC-3 蛋白并不是其主要的辅调节蛋白，抑制 SRC-3 的作用还可能提高机体对创伤的耐受性，这也为临床对严重创伤的救治提供新思路。

参考文献：

[1] DE-BOSSCHER K, VANDEN-BERCHE W, HAEGEMAN G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression[J]. Endor Rev, 2003, 24(4): 488-522.

[2] HAYASHI R, WADA H, ITO K, *et al*. Effects of glucocorticoids on gene transcription[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 500(1-3): 51-62.

[3] 王军平，粟永萍，刘贤华，等. 大鼠严重烫伤早期应激反应中肝脏糖皮质激素受体变化的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：895-897.

[4] 杜智勇，粟永萍. SRC-3 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2005，27(5)：373-375.

[5] TORCHIA J, ROSE D W, INOSTROZA J, *et al*. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function [J]. Nature, 1997, 387(6634): 677-684.

[6] 王军平，粟永萍，赵景宏，等. TNF-α 和 IL-1 对大鼠肝细胞糖皮质激素受体表达及功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：585-587.

[7] XU J, LI Q. Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(9): 1681-1692.

[8] SMOAK K A, CIDLOWSKI J A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation[J]. Mech Ageing Dev, 2004, 125(10-11): 697-706.

[9] WERBAJH S, NOJEK I, LANZ R, *et al*. Rac-3 is a NF-kappa B co-activator[J]. FEBS Lett, 2000, 485(2-3): 195-199.

[10] WU R C, QIN J, HASHIMOTO Y, *et al*. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B Kinase[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(10): 3549-3561.

（编辑　薛国文）