论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2086-04

地塞米松给药及撤药后糖皮质激素受体的表达

杨 玲,何 威,李 颖,张 斌 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察地塞米松对体外培养人皮肤角质形成细胞——HaCaT细胞糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)α和β表达的调节以及撤药后GRα、GRβ基因表达的后续变化,并探讨其临床意义。**方法** 以含10^{-6}mol/L地塞米松的DMEM(高糖)培养基孵育细胞,48 h后换不含地塞米松的培养基继续孵育。在地塞米松给药后24、48 h以及撤药后24、48、72 h的不同时相点,采用RT-PCR和Western blot检测GRα、GRβ的表达变化,采用免疫荧光化学法观察GRα、GRβ的细胞内定位。**结果** 地塞米松给药后24、48 h,GRα的mRNA和蛋白质水平逐渐下降($P<0.05$),呈时间依赖性,GRβ的mRNA和蛋白质水平均逐渐上升($P<0.05$);撤药后24、48、72 h,GRα和GRβ的上述变化不同程度地向原有水平回复。**结论** 地塞米松下调GRα并上调GRβ,可部分解释持续外用糖皮质激素制剂后出现的激素耐受现象;下调的GRα和上调的GRβ在地塞米松撤药后呈现向其原有水平恢复的趋势,提示临床上外用激素治疗应避免长期使用。

关键词: 糖皮质激素;糖皮质激素受体;角质形成细胞;地塞米松

中图法分类号: R394.6; R965; R986 **文献标识码:** A

Expression of glucocorticoid receptor in HaCaT cells under dexamethasone treatment or after withdrawal

YANG Ling, HE Wei, LI Ying, ZHANG Bin (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of glucocorticoid receptor (GR) α and β in cultured human keratinocytes (HaCaT cells) with treatment of dexamethasone (Dex) and after withdrawal. **Methods** The mRNA and protein expressions of GRα and GRβ in HaCaT cells after the treatment of Dex (10^{-6}mol/L) for 24 and 48 h and in 24, 48 and 72 h after withdrawal of Dex were detected by real-time PCR and Western blot analysis respectively. The intracellular distribution of GRα and β was examined by immunofluorescence. **Results** In 24 or 48 h after Dex treatment, the expressions of GRα at mRNA and protein levels were reduced in a time-dependent manner ($P<0.05$), and those of GRβ were increased ($P<0.05$) as shown by real-time PCR and Western blot analysis. However, in 24, 48 and 72 h after withdrawal of Dex, the above changes gradually recovered to their previous levels. **Conclusion** Dex down-regulates GRα but up-regulates GRβ, which may partly explain that the tachyphylaxis correlated to persistent application of topical glucocorticoids. After Dex is removed, both GRα and GRβ could recover to their previous levels, suggesting long-term application of topical glucocorticoid should be avoided.

Key words: glucocorticoids; glucocorticoid receptor; keratinocyte; dexamethasone

糖皮质激素(glucocorticoids,GC)外用制剂是治疗炎症性皮肤病的常用药物,但一些患者在治疗过程中显示出对外用GC治疗的敏感性下降(激素耐受或抵抗)。作为直接介导GC作用发挥的受体,糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)与机体对GC治疗的敏感性密切相关。许多研究表明,功能性的GRα表达水平与GC的疗效密切相关[1,2],此外GRβ的显性负性作用(dominant negative effect)也使它成为GC耐受或抵抗的一个重要机制[3]。角质形成细胞(keratinocyte, KC)是表皮的主要细胞成分,在皮肤炎症反应中发挥着重要的作用,也是外用制剂局部直接作用的主要靶细胞之一,目前关于角质形成细胞中GC对GR的调节作用尚不明确。本课题组前期研究发现,地塞米

基金项目: 第三军医大学新桥医院1520人才基金(2006-188)
Supported by the 1520 Talent Foundation of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University (2006-188)

作者简介: 杨 玲,女,新疆维吾尔族自治区石河子市人,博士研究生,主治医师,主要从事炎症性皮肤病与糖皮质激素受体方面的研究。电话:(023)68755629,E-mail: kwqseb77@126.com

通信作者: 何 威,E-mail: weiheskin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-13;**修回日期:** 2009-08-29

松作用于 HaCaT 细胞后可呈时间依赖性地下调 GRα 表达并上调 GRβ 表达[4,5]。进一步了解已改变表达水平的 GR 在地塞米松撤药后的恢复情况,对于指导临床上激素制剂的合理外用和尽可能减少激素耐受或抵抗的发生具有实际意义。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及器材

1.1.1　试剂　　DMEM 高糖培养基(美国 Invitrogen);小牛血清(天津 TBD);地塞米松粉(美国 Sigma);RNAiso 试剂盒(日本 TaKaRa);BioRT cDNA 第一链合成试剂盒和 BioEasy SYBR Green Real Time PCR 试剂盒(日本 BioFlux);兔抗人 GRα 多克隆抗体(美国 Santa Cruz)、兔抗人 GRβ 多克隆抗体(英国 Abcam);小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG、BeyoECL Plus 试剂盒和 DAPI 染色液(江苏碧云天);FITC 标记山羊抗兔 IgG 和罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。

1.1.2　仪器　　低温高速离心机(德国 Heraeus);DU800 紫外分光光度计(美国 BeckMan);DYY-11 型电脑三恒电泳仪(北京六一);ABI 7500 型实时定量 PCR 仪(美国 AB);半干转印仪(美国 Bio-Rad);Chemi Imager™5500 型凝胶成像分析仪(美国 Alpha Innotech);激光共聚焦显微镜(德国 Leica)。

1.2　培养细胞及实验分组

人皮肤角质形成细胞——HaCaT 细胞由第四军医大学西京医院全军皮肤病研究所惠赠。将 HaCaT 细胞以 1×10^6/ml 接种于 125 ml 培养瓶中,在 37 ℃、含 5% CO_2 及饱和湿度的孵箱中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养,待细胞生长至 60% ~80% 融合时更换含 10^{-6} mol/L 地塞米松的无血清 DMEM 用于实验(前期实验证明地塞米松对 GR 的影响与药物浓度无明显相关性[4,5],故本实验仅选择 1 个平均浓度 10^{-6} mol/L)。根据临床上外用激素软膏治疗炎症性皮肤病通常以 24 h 为间隔,本实验设置每 24 h 为 1 个观察时相点,共分设 6 组:对照组(未处理组)、地塞米松作用 24 h 组、地塞米松作用 48 h 组、地塞米松撤药 24 h 组、地塞米松撤药 48 h 组、地塞米松撤药 72 h 组。其中后 3 组分别指以含 10^{-6} mol/L 地塞米松的无血清 DMEM 培养细胞 48 h 后,更换无血清 DMEM 分别培养 24、48、72 h。每组均设 4 个平行样本。

1.3　实验方法

1.3.1　反转录-实时定量 PCR

1.3.1.1　引物序列　　人 GRα:(正义链)5′-CCATTGTCAAGAGGGAAGGAAAC-3′,(反义链)5′-ATGATTTCAGCTAACATCTCGGG-3′,扩增片段为 172 bp;人 GRβ:(正义链)5′-CTGTCGCTTCTCAATCAGACTC-3′,(反义链)5′-CCCAGGTCATTTCCCATCACTT-3′,扩增片段为 163 bp;内参照 GAPDH:(正义链)5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,(反义链)5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3′,扩增片段为 142 bp。引物序列由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.3.1.2　细胞总 RNA 提取和反转录合成 cDNA　　按 RNAiso 试剂盒说明书要求从细胞中抽提总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 样本的纯度和浓度。反转录反应体系为:5 × RT Buffer 2 μl,dNTP Mixture(10 mmol/L) 1 μl,Oligo-dT 0.5 μl,AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl,RNA 所加入的体积由 RNA 浓度决定,使加入的总 RNA 质量约为 1 μg,RNase free H_2O (5.5 – RNA 所加入的体积) μl,总体积为 10 μl。反应条件:50 ℃ 45 min,95 ℃ 5 min,冰浴 5 min。所得 cDNA 保存于 –20 ℃待用。

1.3.1.3　RT-PCR　　反应体系为:2 × SYBR 反应液 25 μl,上游引物 (10 μmol/L) 1 μl,下游引物 (10 μmol/L) 1 μl,*Taq* DNA 聚合酶 0.3 μl,ddH_2O 18.7 μl,cDNA 4 μl,总体积为 50 μl。反应程序:94 ℃ 2 min;94 ℃ 10 s,60.5 ℃ 15 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。荧光信号采集设在 72 ℃(每循环第 3 步反应时),PCR 结束采用融解曲线(59 ~95 ℃)确定产物特异性。由 PCR 反应曲线得到 Ct 值,采用 ΔΔCt 方法进行相对定量,使用单一的样品来比较未知样品的目的基因的表达。校正公式为:差别倍数 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$;$\Delta\Delta Ct=[Ct_{目的基因(未知样品)}-Ct_{GAPDH(未知样品)}]-[Ct_{目的基因(校正样品)}-Ct_{GAPDH(校正样品)}]$。将未处理组的基因表达作为对照值 1(校正样品),各组细胞中的基因表达表现为未处理组基因表达的倍数。另将反应产物行 3% 琼脂糖凝胶电泳以确认扩增片段的特异性。

1.3.2　Western blot　　将不同时相点的培养细胞吸去培养基,用冰预冷 PBS 洗涤 3 遍,加 400 μl 裂解液于冰上裂解 30 min,收集细胞碎片和裂解液,14 000 r/min 离心 30 min,转移上清。测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳及转膜、封闭。膜置于一抗溶液中(工作浓度 GRα 1∶100,GRβ 1∶500,β-actin 1∶1 000),4 ℃过夜(≥18 h),TBST 洗膜 3 次,放入二抗溶液中(工作浓度均为1∶1 000),37 ℃摇床反应 2 h,TBST 洗膜 5 次。滴加适量 BeyoECL Plus 工作液(等体积混合适量 BeyoECL Plus A 液和 B 液)到膜上,凝胶成像仪上观察,光密度分析,目的基因条带与相应的内对照 β-actin 条带的灰度值比值(GRα 或 GRβ/β-actin)作为其蛋白水平的半定量指标。

1.3.3　免疫荧光、激光共聚焦显微镜观察　　6 孔培养板内放置无菌盖玻片(0.8 cm × 0.8 cm),孔内种植细胞行爬片培养及相应的分组处理,在不同的时相点取出盖玻片,PBS 漂洗,4% 多聚甲醛 4 ℃固定 20 min,0.3% Triton X-100 室温作用 10 min,加入一抗(工作浓度:兔抗人 GRα 多克隆抗体 1∶50;兔抗人 GRβ 多克隆抗体 1∶500),4 ℃孵育过夜,另设 PBS 代替一抗为阴性对照;PBS 漂洗 3 次后,加二抗(分别为 FITC 标记山羊抗兔 IgG 和罗丹明标记山羊抗兔 IgG,工作浓度均为 1∶100)37 ℃孵育 30 min,DAPI 复染 5 min,用激光共聚焦显微镜对培养细胞进行观察。

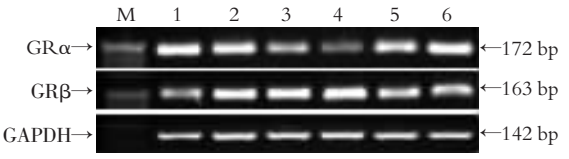
1.4　统计学处理

对 Western blot 计量资料采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析和组间多重比较。

2　结果

2.1　地塞米松给药及撤药不同时相点的 HaCaT 细胞 GRα、GRβ mRNA 的表达

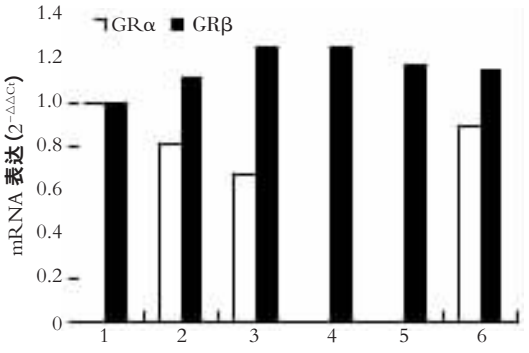
融解曲线显示出扩增产物的单一性,3% 琼脂糖凝胶电泳图显示扩增片段与预设计片段一致(图 1)。



M:DNA 标准(20 bp);1:未处理组;2:地塞米松作用 24 h 组;3:地塞米松作用48 h 组;4:地塞米松撤药 24 h 组;5:地塞米松撤药48 h 组;6:地塞米松撤药 72 h 组

图 1 GRα 和 GRβ mRNA 的扩增片段电泳结果

将未处理组 HaCaT 细胞中的基因表达作为对照值 1,从图 2 可见:①地塞米松作用 24 h 后,GRα mRNA 表达部分下调(约 19%),48 h 后明显下调(>30%),已下调的 GRα mRNA 在撤去地塞米松作用后 24 h 无显著变化,48 h 后部分回升,72 h 后明显回升;②地塞米松作用 24 h 后,GRβ mRNA 表达上调(约 11%),上调幅度低于 GRα 的下调幅度,48 h 后进一步上调(约 26%),撤去地塞米松作用后 24 h 无显著变化,48 h 后出现少许回落,72 h 后进一步回落。



1:未处理组;2:地塞米松作用 24 h 组;3:地塞米松作用 48 h 组;4:地塞米松撤药 24 h 组;5:地塞米松撤药 48 h 组;6:地塞米松撤药 72 h 组

图 2 RT-PCR 检测各组 GRα、GRβ mRNA 的表达

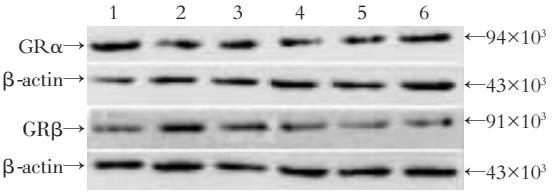
组间比较所得 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值见表 1,各组间均将前一组的基因表达作为对照值 1。从表 1 也可以看出:①地塞米松作用 24 h 和 48 h 后,GRα mRNA 表达呈下调趋势,撤去地塞米松作用 24 h 后无显著变化,48、72 h 后已下调的 GRα mRNA 呈回升趋势;②地塞米松作用 24、48 h 后,GRβ mRNA 表达呈上调趋势,撤去地塞米松作用 24 h 后无显著变化,48、72 h 后已上调的 GRβ mRNA 呈回落趋势,但恢复的程度要小于 GRα。

表 1 RT-PCR 检测 GRα、GRβ mRNA 组间比较所得 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值

组间	GRα	GRβ
未处理组 - 地塞米松作用 24 h 组	0.81	1.11
地塞米松作用 24 h 组 - 地塞米松作用 48 h 组	0.83	1.14
地塞米松作用 48 h 组 - 撤地塞米松作用 24 h 组	1.04	0.99
撤地塞米松作用 24 h 组 - 撤地塞米松作用 48 h 组	1.10	0.94
撤地塞米松作用 48 h 组 - 撤地塞米松作用 72 h 组	1.16	0.75

2.2 地塞米松给药及撤药不同时相点的 HaCaT 细胞 GRα、GRβ 蛋白质的表达

Western blot 检测的各组 GRα 和 GRβ 的蛋白质表达见图 3。GRα 或 GRβ 与相应内参照 β-actin 蛋白条带的光密度值的比值代表 GRα 或 GRβ 蛋白质的相对表达量,结果见表 2:①地塞米松作用后 24、48 h 对 GRα 的下调具有时间依赖性($P<0.05$),撤去地塞米松作用 24、48 h 已下调的 GRα 有所回升,但差异无统计学意义($P>0.05$),72 h 后则有显著的回升($P<0.05$);②地塞米松作用 48 h 后,GRβ 表达显著增高($P<0.05$),撤去地塞米松作用 72 h 后已上调的 GRβ 呈回落趋势($P<0.05$)。



1:未处理组;2:地塞米松作用 24 h 组;3:地塞米松作用 48 h 组;4:地塞米松撤药 24 h 组;5:地塞米松撤药 48 h 组;6:地塞米松撤药 72 h 组

图 3 Western blot 检测各组 GRα 和 GRβ 的表达

表 2 Western blot 检测不同时相点 GRα、GRβ 蛋白质的相对表达量

组别	GRα[a]	GRβ[b]
未处理组	0.921 3 ± 0.062 5	0.117 5 ± 0.015 0
地塞米松作用 24 h 组	0.842 5 ± 0.084 2	0.160 0 ± 0.046 9
地塞米松作用 48 h 组	0.687 5 ± 0.049 2[cd]	0.197 5 ± 0.017 1[c]
地塞米松撤药 24 h 组	0.707 5 ± 0.055 0[c]	0.197 5 ± 0.041 1[c]
地塞米松撤药 48 h 组	0.792 5 ± 0.037 8[c]	0.172 5 ± 0.027 5
地塞米松撤药 72 h 组	0.852 5 ± 0.037 8[e]	0.140 0 ± 0.037 4[e]

a:$P=0.000$,b:$P=0.018$,表示各组之间的差异有统计学意义;c:$P<0.05$,与未处理组比较;d:$P<0.05$,与地塞米松作用 24 h 组比较;e:$P<0.05$,与地塞米松撤药 24 h 组比较

2.3 地塞米松作用不同时相点的 HaCaT 细胞 GRα、GRβ 蛋白质的细胞内定位

GRα 标记为绿色荧光(图 4),地塞米松未处理时可见荧光主要位于胞质,地塞米松给药后出现部分胞核表达,撤去地塞米松作用后 48 h 内仍然有胞核的阳性表达,72 h 后部分胞核表达转为阴性;GRβ 标记为红色荧光(图 4),主要表达于胞核,细胞质也有阳性表达。

3 讨论

GC 因具有显著的抗炎效应,其外用制剂广泛运用于多种炎症性皮肤病的局部治疗,但"激素耐受或抵抗"现象一直困扰着皮科医师和患者。作为 GC 抗炎效应的直接介导者,GR 的表达成为影响 GC 作用的重要因素。研究发现,GRα 表达水平下调可降低患者对 GC 治疗的反应[2,6],GRβ 的显性负性效应也影响 GC 作用的发挥,高水平的 GRβ 可能预示对 GC 的抵抗,较低水平的 GRβ 可能预示对 GC 的高度敏感或超敏[3]。

多种活体细胞或细胞系中均已证明 GC 可下调 GRα 或上调 GRβ[7-9],但外用 GC 治疗的主要靶细胞

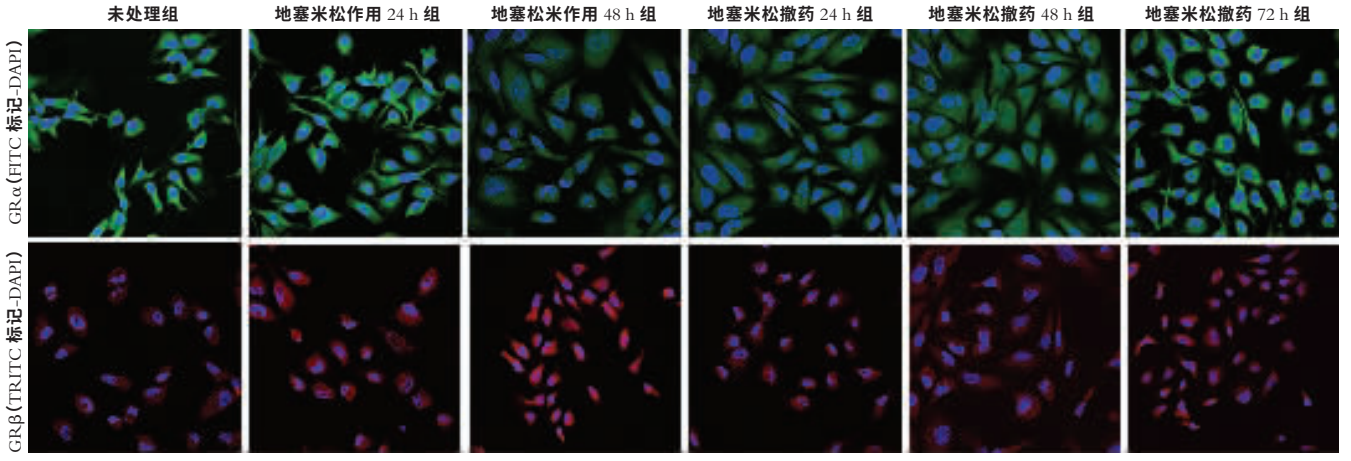


图 4　GRα 和 GRβ 蛋白质的免疫荧光染色结果　（激光共聚焦显微镜 ×400）

——角质形成细胞中 GC 对于 GR 的调节尚没有深入的研究。本实验动态观察了角质形成细胞在地塞米松（10^{-6}mol/L）给药及撤药后的不同时相点其 GRα 和 GRβ 的表达变化，研究发现，地塞米松作用后 48 h 内可引起 GRα 表达下调和 GRβ 的上调，其中 GRα 下调的程度较 GRβ 上调的程度更为明显；地塞米松撤药后的 72 h 内，GRα 和 GRβ 的前述变化均有不同程度地向原有水平恢复的趋势，其中 GR α 的恢复较早（约在地塞米松撤药 24 h 后即可能发生），恢复的程度也较明显。对于这种时间和程度上的不同，推测可能有以下几方面的原因：①GRα 作为 GC 结合蛋白，位于细胞浆中，直接受 GC 调节，GRβ 则不与 GC 结合，其表达的调节可能属于一种间接的后续效应，这种调节是否与 GRα 相关或是否还存在其他的转录因子调节机制有待进一步研究；②生理状态下，GRα 约占总 GR mRNA 的 90% 以上，GC 的生理功能主要依赖于 GRα，因此 GRα 的改变可能会更明显。

本实验结果一方面可部分解释临床上外用 GC 引起的皮肤“耐受或抵抗”现象，推测随着 GC 作用时间的延长，引起的 GRα 下调可能限制了外用 GC 的疗效，同时 GRβ 的上调又可能引起对 GC 治疗的抵抗，由此导致临床上外用激素的“皮肤耐受或抵抗”现象发生；另一方面，对于外用 GC 治疗炎症性皮肤病有一定的指导作用。首先应避免长期连续应用 GC 治疗，以防止由 GR 水平的改变引起的 GC 疗效下降，其次控制外用 GC 治疗的持续时间十分重要，临床上可采用激素与非激素类抗炎剂交替使用的原则，这可能会有利于 GR 水平的恢复，使激素能正常发挥其抗炎作用，从而有效地延缓或改善“激素耐受”或“激素抵抗”现象。

参考文献：

[1] Pujols L, Xaubet A, Ramirez J, *et al*. Expression of glucocorticoid receptors alpha and beta in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases[J]. Thorax, 2004, 59(8): 687 – 693.

[2] Raddatz D, Middel P, Bockemuhl M, *et al*. Glucocorticoid receptor expression in inflammatory bowel disease: evidence for a mucosal down-regulation in steroid-unresponsive ulcerative colitis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 19(1): 47 – 61.

[3] Yudt M R, Jewell C M, Bienstock R J, *et al*. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(12): 4319 – 4330.

[4] 郁　博，何　威，张　斌，等. 地塞米松对 HaCaT 细胞糖皮质激素受体 α 表达的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(4): 216 – 218.

[5] 郁　博，何　威，张　斌，等. 地塞米松上调 HaCaT 细胞糖皮质激素受体 β 的表达[J]. 重庆医学, 2008, 37(6): 610 – 612.

[6] Cho Y J, Lee K E. Decreased glucocorticoid binding affinity to glucocorticoid receptor is important in the poor response to steroid therapy of older-aged patients with severe bronchial asthma[J]. Allergy Asthma Proc, 2003, 24(5): 353 – 358.

[7] Xu M, Song L, Wang Z. Effects of Dexamethasone on glucocorticoid receptor expression in a human ovarian carcinoma cell line 3AO[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(3): 392 – 395.

[8] Freeman A I, Munn H L, Lyons V, *et al*. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation[J]. J Endocrinol, 2004, 183(2): 365 – 374.

[9] 李　波，白祥军，王海平. 地塞米松对人单核细胞糖皮质激素受体蛋白表达的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(6): 525 – 528.

（编辑　邓强庭）