DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.025
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2239-03

论著

Calpain inhibitor Ⅰ对糖皮质激素受体表达和转录激活作用的影响

程晓刚,粟永萍,罗成基,刘晓宏,王明海,艾国平,王军平,蒋建新,黄跃生 (第三军医大学预防医学院: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 探讨Calpain inhibitor Ⅰ对糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达和转录激活作用的影响。方法 Raw-264.7细胞经地塞米松、Calpain inhibitor Ⅰ或两者共同处理12 h,观察糖皮质激素受体表达水平的变化。质粒PRsh-GRα和报告质粒pMAMneo-CAT转入COS-7细胞,观察Calpain inhibitor Ⅰ对糖皮质激素受体转录激活作用的影响。结果 Raw-264.7细胞经地塞米松处理12 h后GR蛋白条带减弱,提示地塞米松可诱导GR表达下调,而Calpain inhibitor Ⅰ可以部分抑制此作用。共转染实验表明Calpain inhibitor Ⅰ可增强地塞米松对GR的转录激活作用。结论 Calpain inhibitor Ⅰ可抑制糖皮质激素受体(激素依赖性受体)下调,并可增强GR的转录激活作用。

关键词:Calpain inhibitor Ⅰ;糖皮质激素受体;地塞米松;转录激活
中图法分类号:R392.11;R394-33;R977.3 文献标识码:A

Effects of Calpain inhibitor Ⅰ on glucocorticoid receptor expression and its transcript activation ability

CHENG Xiao-gang, SU Yong-ping, LUO Cheng-ji, LIU Xiao-hong, WANG Ming-hai, AI Guo-ping, WANG Jun-ping, JIANG Jian-xin, HUANG Xue-sheng (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 investigate the effects of Calpain inhibitor Ⅰ on glucocorticoid receptor and its transcript activation ability. **Methods** Raw-264.7 cells were treated respectively with Calpain inhibitor Ⅰ and dexamethasone or both for 24 h. The changes of glucocorticoid receptor were observed. COS-7 cells were co-transfected with PRsh-GRα and pMAMneo-CAT vectors, and then the effects of Calpain inhibitor Ⅰ on glucocorticoid receptor and its transcript activation ability were detected. **Results** The glucocorticoid receptors was decreased after Raw-264.7 cells were treated with dexamethasone for 24 h. Calpain inhibitor Ⅰ could inhibit this effect to some extent. Co-transfection experiment revealed that Calpain inhibitor Ⅰ could also promote glucocorticoid receptor transcript activation ability. **Conclusion** Calpain inhibitor Ⅰ can inhibit the down-regulation of dexamethasone on glucocorticoid receptor, but promote glucocorticoid receptor transcript activation ability.

Key words: calpain inhibitor Ⅰ; glucocorticoid receptor; transcript activation

糖皮质激素(glucocorticoids, GC)是机体重要的应激激素和临床常用的抗炎、抗免疫反应药物,GC受体(glucocorticoid receptor, GR)是GC效应发挥的关键环节。我们以往的研究发现,在应激状态下,机体分泌大量糖皮质激素,但糖皮质激素受体(GR)的表达存在有下调与功能抑制,GR的功能抑制必然会使其抗炎调控作用减弱,影响机体的全身炎症反应状态。当炎症反应失控后,就会导致机体继发性全身损害发生。最近国外的研究表明应用糖皮质激素可引起配基介导的糖皮质激素受体下调,此作用是通过泛素-蛋白酶体降解系统所实现的[1,2]。Calpain inhibitor Ⅰ为一种蛋白酶体抑制剂,关于Calpain inhibitor Ⅰ对GR的表达与功能的研究少见文献报道,因此本实验观察了Calpain inhibitor Ⅰ对GR的表达与转录功能的影响,探讨应用蛋白酶体抑制剂是否可有效抑制糖皮质激素介导的受体下调和功能抑制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 PRsh-GRα质粒(美国R. Evans博士惠赠)和报告质粒pMAMneo-CAT(法国Renoir博士惠赠),小鼠单核-巨噬细胞系Raw-264.7购自中科院上海生化研究所,非洲绿

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(30328025)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) G1999054201), and the Cooperative Research Foundation for Oversea Scholars (30328025)
作者简介:程晓刚(1973-),男,山西省太原市人,博士,讲师,主要从事急性应激分子生物学方面的研究,现在成都医学院病原学教研室。电话:(028)86579146
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752009,Email:suyongping@yahoo.com
收稿日期:2004-03-09;修回日期:2004-05-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

猴肾细胞系 COS-7 细胞本室保存。

1.1.2 主要试剂 地塞米松购自 Sigma 公司，兔抗小鼠糖皮质激素受体抗体购自 Santa cruz 公司，羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶标抗体购自北京中山公司，IMDM 培养基购自 Gibco BRL 公司，PVDF 膜，苯甲基磺酰氟(PMSF)，抑蛋白酶肽(Aprotinin)，亮抑制肽(Leupeptin)均为 Sigma 产品，细胞总蛋白裂解液购自 Pierce 公司，DOTAP 脂质体转染试剂购自 Roche 公司，CAT 检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 方法

Raw-264.7 细胞置于 IMDM 培养基培养，取对数生长期细胞，调整浓度为 1×10^6/ml，细胞分为 4 组，每组 1×10^7，对照组(不作任何处理)、Calpain inhibitor Ⅰ 处理组(培养体系加 Calpain inhibitor Ⅰ 至终浓度 25 μmol/L 处理 13 h)、DEX 处理组(加地塞米松至终浓度 100 nmol/L 处理 12 h)、DEX 与 Calpain inhibitor Ⅰ 共处理组(加 Calpain inhibitor Ⅰ 至终浓度 25 μmol/L 处理 1 h 后加地塞米松至终浓度 100 nmol/L 处理 12 h)。细胞经上述处理后总蛋白裂解液裂解提取细胞总蛋白，Western-blotting 检测细胞糖皮质激素受体表达水平的变化。

PRsh-GRα 质粒和报告质粒 pMAMneo-CAT 转化大肠杆菌 DH5α 细菌培养扩增后提取质粒，做酶切鉴定。

COS-7 细胞在 IMDM 培养体系中培养，对数生长期的 COS-7 细胞分 4 组，每组 1×10^6，更换培养液后，应用 DOTAP 脂质体转染试剂介导共转染 PRsh-GRα 质粒 0.5 μg 和报告质粒 pMAMneo-CAT 0.5 μg，37 ℃培养 24 h 后，未处理组不作任何处理、Calpain inhibitorⅠ处理组(培养体系加 Calpain inhibitorⅠ 至终浓度 100 μmol/L 处理 17 h)、DEX 处理组(加地塞米松至终浓度 100 nmol/L 处理 16 h)、DEX 与 Calpain inhibitorⅠ共处理组(加 Calpain inhibitor Ⅰ至终浓度 100 μmol/L处理 1 h 后加地塞米松至终浓度 100 nmol/L 处理 16 h)，裂解细胞，CAT 试剂盒检测报告基因 CAT 活性。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析，EXCEL 软件作图。

2 结果

2.1 糖皮质激素受体表达水平检测

Raw-264.7 细胞经地塞米松处理 12 h 后糖皮质激素受体蛋白条带明显减弱，Calpain inhibitor Ⅰ 处理 13 h 对糖皮质激素受体蛋白表达没有明显改变，Calpain inhibitor Ⅰ 预处理 1 h 与地塞米松联合使用对糖皮质激素受体蛋白下调有抑制作用($P<0.05$)，见图 1。



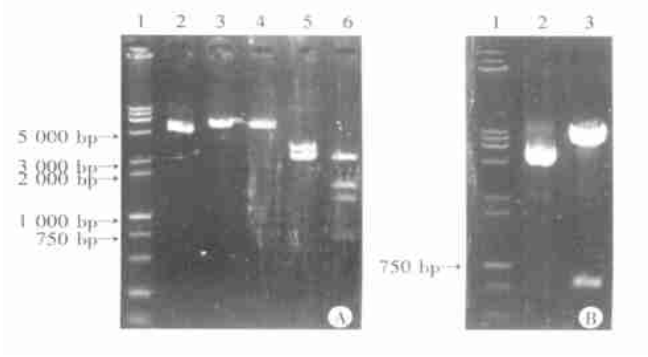
1: Control; 2: Calpain inhibitor Ⅰ; 3: DEX; 4: Calpain inhibitor Ⅰ + DEX

图 1 免疫印记结果显示 **Calpain inhibitor** Ⅰ 对糖皮质激素受体表达水平的影响

Fig 1 Western blot analysis of the effects of Calpain inhibitor Ⅰ on glucocorticoid receptor expression

2.2 PRsh-GRα 质粒和报告质粒 pMAMneo-CAT 酶切鉴定

PRsh-GRα 质粒经 *Kpn* Ⅰ 与 *Sal* Ⅰ 单酶切切出 1 条大小约 6.7 kb 的 DNA 条带，*Kpn* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切切出 2 条大小约 3.0 kb 和 3.7 kb 的 DNA 条带，其中 3.0 kb 的目的带含有 hGRcDNA 序列，经 *EcoR* Ⅰ 酶切切出大小为 3 0、1.7、1.35、0.74 kb 的目的带。pMAMneo-CAT 经 *Sal* Ⅰ 酶切切出大小为 0.8 kb 的目的带，其中含有 CAT 报告基因。鉴定结果与背景资料相符，显示质粒准确可信，见图 2。



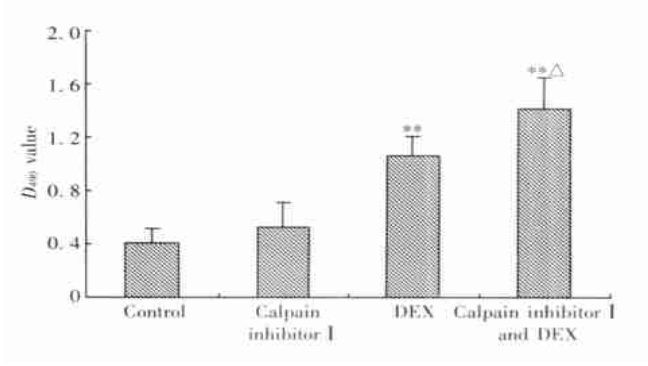
A: Restriction analysis of PRsh-GRα; B: Restriction enzyme analysis of pMAMneo-CAT; 1: Marker; 2: Plasmid; 3: *Kpn* Ⅰ; 4: *Sal* Ⅰ; 5: *Kpn* Ⅰ /*Xho* Ⅰ; 6: *EcoR* Ⅰ

图 2 **PRsh-GRα** 与 **pMAMneo-CAT** 酶切电泳图

Fig 2 Electrophoretic analysis of PRsh-GRα and pMAMneo-CAT plasmid after restriction analysis

2.3 CAT 活性检测

COS-7 细胞共转染实验 PRsh-GRα 和 pMAMneo-CAT 质粒活性检测表明，Calpain inhibitor Ⅰ 单独处理与对照组相比 CAT 活性没有显著差异，地塞米松处理组 CAT 活性明显增强，Calpain inhibitor Ⅰ 与地塞米松联用组与地塞米松处理组相比 CAT 活性明显增强($P<0.05$)，见图 3。



**: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.05$, *vs* DEX

图 3 **Calpain inhibitor** Ⅰ 与 **DEX** 对糖皮质激素受体转录激活能力的影响(报告基因 **CAT** 活性检测)

Fig 3 Effects of Calpain inhibitor Ⅰ and dexamethasone on glucocorticoid receptor transcript activation ability (CAT reporter gene activity assay)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

Calpain 是广泛表达的保守性蛋白，在细胞内 Ca^{2+} 浓度增加时可被活化，并降解包括 ikb 的某些蛋白，介导细胞损伤。Calpain inhibitor Ⅰ是一种蛋白酶体抑制剂，国外实验表明 Calpain inhibitor Ⅰ可抑制 LPS 诱导的 ikb 降解，并可改善缺血再灌注引起的细胞损伤[3~6]。糖皮质激素是机体抵抗过度应激反应，以调节机体自稳状态的重要激素。在应激反应时糖皮质激素会大量增多，以提高机体对刺激的抵抗力。其发挥作用主要是通过其受体而实现的，糖皮质激素受体是甾体激素受体超家族的一个成员，是由可溶性单链多肽组成的磷蛋白，分子量 94×10^3。实验表明配基介导的糖皮质激素受体下调是通过泛素-蛋白酶体降解系统所实现的[1,2]，糖皮质激素受体活化后分子结构发生改变，因此可与泛素结合，通过蛋白酶体降解系统而发生降解。由于机体在应激状态下存在有细胞代谢失衡，胞内 Ca^{2+} 浓度明显增加，因此必然存在有 Calpain 的过度活化，理论上可促进配基介导的糖皮质激素受体下调，从而对机体调节过度炎性反应不利。我们以往的研究表明，机体在过度应激状态下存在有糖皮质激素受体表达的下调，是否 Calpain 的过度活化对其有影响尚不十分清楚，本实验表明应用 Calpain inhibitor Ⅰ等蛋白酶体抑制剂可抑制配基介导的糖皮质激素受体的下调，并增强其转录激活作用，提示蛋白酶体对介导糖皮质激素受体的下调有作用，应用蛋白酶体抑制剂可以有效减轻此作用，从而促进其功能的发挥，在理论上可以减轻严重应激失衡状态，尚待深入研究。

参考文献：

[1] Wallace A D, Cidlowski J A. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids[J]. J Biol Chem, 2001, 276(46): 42714－42721.
[2] Deroo B J, Rentsch C, Sampath S, *et al*. Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(12): 4113－4123.
[3] Chatterjee P K, Brown P A, Cuzzocrea S, *et al*. Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat [J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2073－2083.
[4] McDonald M C, Mota Filipe H, Paul A, *et al*. Calpain inhibitor Ⅰ reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock[J]. FASEB J, 2001, 15(1): 171－186.
[5] Cuzzocrea S, McDonald M C, Mazzon E, *et al*. Calpain inhibitor Ⅰ reduces the development of acute and chronic inflammation[J]. Am J Pathol, 2000, 157(6): 2065－2079.
[6] Stys P K, Jiang Q. Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons[J]. Neurosci Lett, 2002, 328(2): 150－154.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)24-2241-01

个案与短篇

Merocel 在内窥镜鼻窦外科中止血的临床应用

Clinical application of Merocel in hemostasis endoscopic sinus surgery

钟 诚，张学渊 （第三军医大学西南医院耳鼻喉科，重庆 400038）

我科从 2003 年开始应用高分子材料 Merocel 用于内窥镜鼻窦手术(endoscopic sinus surgery, ESS)，止血作用确切，患者反映良好，取得满意的临床效果，报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究设计

按临床研究的 DME 原则，采用单盲随机对照试验，在患者年龄、性别、病情轻重等方面，控制偏倚，保证其病例分组均衡，有足够样本量。

按 1997 年海口标准[1]，从 2003 年 6 月到 2004 年 9 月，选择在我科住院行鼻内镜手术的慢性鼻窦炎患者 352 例，其中男性 219 例，女性 133 例，年龄 12～63 岁，平均(38.42±5.26)岁。用随机数字表法，随机分为凡士林纱条填塞组(对照组)和 Merocel (Medtronic Xomed Co Ltd.)填塞组(试验组)，每组均为 176 例。所有患者行内窥镜鼻窦手术(ESS, Messerklinger 法)。

1.2 方法

手术结束后，对照组采用凡士林纱条填塞鼻腔，试验组采用 Merocel 填塞。在鼻腔填塞过程中，常规适当予以鼻部冰敷、应用抗生素 3～5 d。填塞 48 h 将填塞物取出。以舒适指数(comfort index, CI)和抽出填塞物反应性出血量(induced hemorrhage, IH)两个指标作为主要评价参数，进行比较。同时观察填塞期间有无活动性出血、有无抽出后不良反应等。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验。

（下转 2244 页）

作者简介：钟 诚(1977－)，男，江西省万载市人，硕士，医师，主要从事耳鼻咽喉-头颈外科的临床方面的研究，发表论文 11 篇。电话：(023)68765891，E-mail：agm95zc@163.net

收稿日期：2004-11-05；修回日期：2004-11-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net