DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.025
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2042 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-2042-03

脂多糖作用大鼠肺泡巨噬细胞糖皮质激素受体表达及活性变化

钱 频,张 芳,钱桂生,陈维中 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨脂多糖作用大鼠肺泡巨噬细胞24 h内,糖皮质激素受体表达及活性变化特点。方法 将原代培养的大鼠肺泡巨噬细胞分为脂多糖致伤组和地塞米松治疗组,采用RT-PCR和Western Blot在mRNA水平和蛋白质水平测定肺泡巨噬细胞糖皮质激素受体;EMSA测定肺泡巨噬细胞核蛋白中糖皮质激素受体活性。结果 脂多糖作用后,糖皮质激素受体mRNA表达下调,24 h恢复正常水平;糖皮质激素受体蛋白质表达降低,4 h降至最低,24 h维持在低水平表达;糖皮质激素受体活性在1 h降到最低,24 h未恢复至正常水平。地塞米松治疗组在治疗后期不能有效维持糖皮质激素受体活性。结论 脂多糖(100 ng/ml)作用大鼠肺泡巨噬细胞后,糖皮质激素受体蛋白表达降低,可能与mRNA表达降低及蛋白降解加速有关;糖皮质激素受体活性被显著抑制,出现糖皮质激素抵抗。

关键词:肺泡巨噬细胞;脂多糖;糖皮质激素受体;地塞米松;糖皮质激素抵抗
中图法分类号:Q539;R392.11;R394-33 文献标识码:A

Changes of glucocorticoid receptor expression and activity in rat alveolar macrophages induced by lipopolysaccharide

QIAN Pin, ZHANG Fang, QIAN Gui-sheng, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical Univisity, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate changes of glucocorticoid receptor (GR) expression and activity in rat alveolar macrophages (AMs) induced by lipopolysaccharide (LPS) within 24 h. Methods Primary cultured AMs were divided randomly into LPS treatment group and LPS+Dex treatment group. The expressions of GR mRNA and GR protein in AMs at different time points were detected by RT-PCR and Western blot. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to measure the GR activity in AMs. Results The expression level of GR mRNA decreased after LPS treatment, but returned to the normal level at 24 h after LPS treatment. The expression level of GR also decreased and reached the lowest level at 4 h after LPS treatment. GR activity also decreased, reached the lowest level at 1 h after LPS treatment, but was still lower than that in the normal control group at 24 h after treatment. Dexamethasone treatment had no obvious effect on GR activity during the late period of treatment. Conclusion LPS treatment (100 ng/ml) down-regulates the protein expression of GR, which maybe associated with the decreased expression of mRNA and accelerate degradation of GR protein. The activity of GR is inhibited sharply, resulting in glucocorticoid resistance.

Key words: alveolar macrophage; lipopolysaccharide; glucocorticoid receptor; dexamethasone; glucocorticoid resistance

糖皮质激素(glucocorticiod, GC)通过与其受体的作用来发挥其生物活性。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是激素核受体家族中的一个主要成员,同时也是一种重要的核转录因子。它与配基结合后,由胞浆进入胞核,从而发挥它的转录调控作用。GR与机体创伤后的应激和炎症反应密切相关。本实验以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用大鼠肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)为模型,揭示炎症反应时肺泡巨噬细胞GR表达及其活性的变化规律,阐明地塞米松(dexamethasone, Dex)对GR活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM培养基,胎牛血清(GIBCO);RT-PCR Kit(TaKaRa);Tripure试剂、蛋白裂解液(Roche);ECL化学发光试剂盒(Promega);γ-32P-ATP(北京亚辉);兔抗大鼠GR多克隆IgG抗体(Santa Cruz);Gel shift assay Kit试剂盒(Promega);PCR扩增仪(基因公司,USA);电转印槽(LKB, Sweden);垂直电泳槽、凝胶图像

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970329)
作者简介:钱 频(1976-),女,上海市人,主治医师,主要从事肺心病等临床疾病的超声诊断和发病机制方面的研究,现在超声诊断科。电话:(023)68755320
通信作者:张 芳,电话:(023)65230729
收稿日期:2004-04-05;修回日期:2004-09-07

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

分析仪(BIO-RAD)。

1.2　大鼠肺泡巨噬细胞分离、培养及分组

Wistar 大鼠(体质量 150～180 g)购自第三军医大学实验动物中心, 大鼠肺泡巨噬细胞(AM)的分离和培养参阅文献[1]。将 AM 分为 LPS 组和 LPS＋Dex 组, 各组分别设: 1、2、4、8、12、24 h 6 个时相点(n＝5)。LPS 组加入含 LPS (100 ng/ml)的无血清培养基作用细胞, 设生理盐水对照组; LPS＋Dex 组加入含 LPS (100 ng/ml)和 Dex(10^{-5} mol/L)的无血清培养基作用细胞, 设生理盐水对照组。于各时相点收集细胞。

1.3　半定量 RT-PCR 法检测 GR mRNA 的表达

按 Tripure 试剂说明书提取 AM 总 RNA, 使用分光光度仪定量。取 2 μg RNA, 用 AMV 逆转录酶制备 20 μl 体系的 cDNA, 取 3 μl cDNA 进行 PCR 扩增。GR 的引物自行设计, G3PDH 作为内源性对照。引物序列分别为 GR: 5′-ATCCCACAGACCAAAGCACCTT-3′和 5′-TCCAGTTTTCAGAACCAACAGG-3′, 扩增产物长度为 540 bp; G3PDH: 5′-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3′和 5′-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAT-3′, 扩增产物长度为 983 bp。PCR 反应体系(50 μl)为: 0.2 mmol/L dNTP、0.1 U/μl *Taq* DNA 聚合酶、1 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲液、上下游引物各 0.3 mmol/L、10× PCR 缓冲液 5 μl、cDNA 模板 3 μl。PCR 扩增条件为:

95 ℃, 4 min→94 ℃, 1 min→55 ℃, 1 min→72 ℃, 2 min; 35 个循环→72 ℃, 8 min。扩增结束后取 5 μl 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并拍照。用光密度扫描仪检测电泳带的积分光密度, 计算 GR mRNA/G3PDH 的比值, 以表示 GR mRNA 的相对值。

1.4　Western Blot 检测 GR 蛋白表达

每个 35 mm 培养皿中加入蛋白裂解液 100 μl, 冰上刮拭 AM, 将细胞裂解液于 4 ℃ 12 000× g 离心 20 min, 取上清。采用考马斯亮蓝定量总蛋白, 各取 20 μg/孔, 行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后电转印 0.5 h 至硝酸纤维素膜, 在室温下封闭 3 h。加入兔抗大鼠 GR 多克隆 IgG 抗体(1∶500稀释), 4 ℃过夜。二抗为 HRP 偶联的抗兔 IgG(1∶1 000 稀释), 室温反应 2 h, 增强化学发光法显色, X 光底片曝光显影。

1.5　EMSA 检测 GR 活性

GR 探针序列参考文献[2](P1: 5′-GTACAGGATGTTCT-3′; P2: 5′-AGAACATCCTGTAC-3′), 由上海生工合成。探针标记和核蛋白的抽提按 Gel shift assay Kit 试剂盒说明书进行。取 3 μg 核蛋白, DNA 结合缓冲液 10 μl、标记探针 1 μl, 加 H_2O 至总反应体积 21 μl, 置 37 ℃孵育 30 min, 加上样缓冲液 4 μl。同时设不加核蛋白的阴性对照组。反应产物经 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕, 凝胶置－70 ℃放射自显影。电泳滞后带用凝胶图像分析仪进行密度扫描, 以其结合带光密度值(INT/mm^2)表示 GR 的活性。

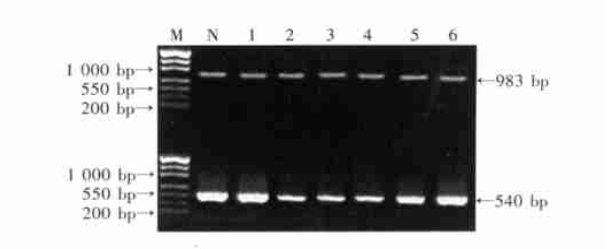
1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 行方差分析及均数间的多重比较。

2　结果

2.1　半定量 RT-PCR 结果

GR mRNA 表达在 LPS 作用后 2 h 明显降低, 8 h 仍维持较低水平, 12 h 开始恢复, 24 h 基本恢复至正常水平(图 1)。



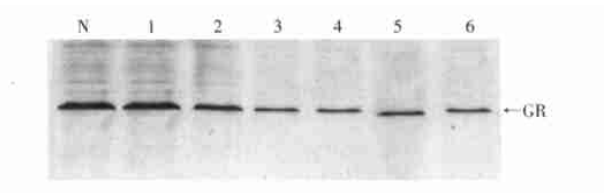
M: PCR marker; N: Normal control; 1－6: At 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after LPS treatment

图 1　LPS 作用大鼠肺泡巨噬细胞 GR mRNA 表达变化

Fig 1　Changes of GR mRNA expression in rat AMs induced by LPS

2.2　Western Blotting 结果

GR 蛋白表达在 LPS 作用后 2 h 就已经减少, 4 h 降到最低, 但到 24 h 仍未恢复正常(图 2)。



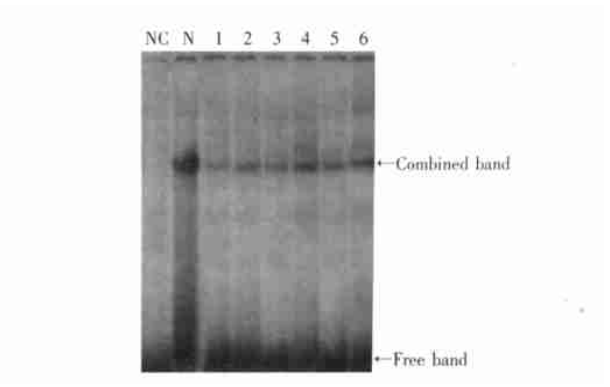
N: Normal control; 1－6: At 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after LPS treatment

图 2　LPS 作用大鼠肺泡巨噬细胞 GR 蛋白表达变化

Fig 2　Changes of GR expression in rat AMs induced by LPS

2.3　EMSA 检测

LPS 组于 1 h 时, GR 活性降至最低, 以后均维持在低水平, 各时相点与对照组相比具有显著性差异($P<0.01$)(图 3); LPS＋Dex 组于 1 h 时, GR 活性较对照组活性稍有增强, 2 h 开始逐渐下降, 24 h 降至最低水平, LPS＋Dex/12、24 h 时相点与对照组相比具有显著性差异($P<0.01$)(图 4); LPS 对照组与 LPS＋Dex 对照组相比无显著性差异($P>0.05$), LPS＋Dex/24 h 与 LPS/24 h 相比 GR 活性下调($P<0.05$), 见表 1。

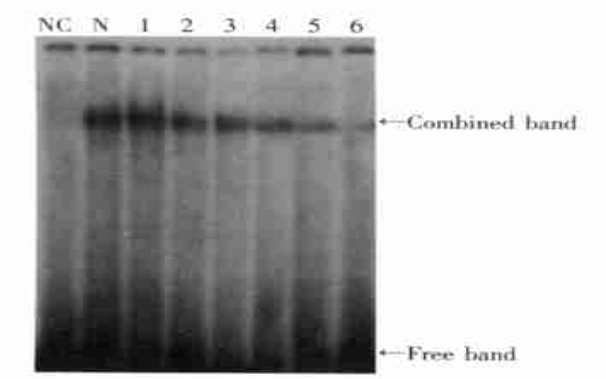


NC: Negative control; N: Normal control; 1－6: 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after LPS treatment

图 3　LPS 作用大鼠肺泡巨噬细胞 GR 活性变化

Fig 3　Changes of GR activity in rat AMs induced by LPS

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



NC: Negative control; N: Normal control; 1—6: 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after LPS+Dex treatment

图 4 LPS+Dex作用大鼠肺泡巨噬细胞GR活性变化

Fig 4 Changes of GR activity in rat AMs induced by LPS+Dex

表 1 LPS组和LPS+Dex组大鼠肺泡巨噬细胞GR活性变化(n=5, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of GR activity in rat AMs in LPS group and LPS+Dex group (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Group	LPS	LPS+Dex
Control	16.58±0.34	17.15±0.22
1 h	3.16±0.22 *	19.18±0.55
2 h	3.65±0.19 *	15.16±0.67
4 h	3.55±0.31 *	11.98±0.66
8 h	3.96±0.17 *	7.02±0.77
12 h	3.70±0.16 *	3.99±0.17 ◇
24 h	3.65±0.19 *	0.87±0.11 ◇★

*: $P<0.01$, *vs* LPS/control; ◇: $P<0.01$, *vs* LPS+Dex/control; ★: $P<0.05$, *vs* LPS/24 h

3 讨论

肺泡巨噬细胞是肺部防御病原微生物和肺损伤的第一道防线,是目前受到重视的重要的炎性细胞。它不仅具有吞噬和抗原提呈功能,而且还能分泌近100种活性分子物质,对急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发生、发展及转归具有重要影响。体外实验表明[3]:AM受到LPS的刺激,细胞内NF-κB被迅速活化,上调TNF-α基因转录与蛋白合成,可能是引发TNF-α大量释放,导致急性肺损伤的关键环节之一。GR是激素核受体家族中的一个主要成员,同时也是一种重要的核转录因子,调控多种基因的激活和抑制,在机体的生命活动中具有重要作用。在炎症反应中,核转录因子GR抑制NF-κB活化,避免细胞因子异常产生。许多细胞因子基因的非表达调控基序(motif)中,存在GR的结合位点GRE,而GR的活性又受到许多细胞因子影响,GR是炎症反应中的重要调控因子[4]。

本研究通过LPS作用AM模拟细胞炎症反应,系统地探讨炎症反应条件下AM中GR表达及活性变化规律。结果表明GR mRNA在LPS作用后2 h降低至最低水平,8 h仍维持较低水平,12 h开始恢复,24 h基本恢复至正常水平。GR蛋白的早期变化趋势与之相似,LPS作用后2 h就已经减少,4 h降到最低,但到24 h仍未恢复正常。LPS作用早期GR mRNA与GR变化趋势表明,GR mRNA表达降低可能是导致GR表达减少的一个重要因素,但LPS作用12 h后,GR mRNA与蛋白表达出现分离现象,说明GR表达调控不仅仅发生在GR mRNA水平上,可能还存在其它调节因素。磷酸化/去磷酸化的循环在调节蛋白功能方面是通常机制。Webster等[5]通过突变GR小鼠的多个磷酸化位点揭示降低磷酸化显著增加受体半衰期,并发现在丢失3个或多个磷酸化位点时激素介导的GR基因自主调控消失。已知LPS作用AM后引起TNF-α大量释放,其中TNF-α等可使GR发生超磷酸化,从而增加GR降解。因此LPS作用12 h后,GR降解加速可能是引起GR低水平表达的一个调节因素。

我们通过EMSA观察了LPS作用AM后,GR活性的变化以及Dex对其活性的影响。研究表明:LPS作用后1 h时,GR活性降至最低,以后均维持在低水平;LPS+Dex组在1h时GR活性较对照组活性稍有增强,2 h开始逐渐下降,24 h降至最低水平。我们已证实LPS作用AM后0.5 h,NF-κB已经明显活化,并显著抑制GR活性。GR活性与NF-κB活性呈负相关(另文报告)。LPS+Dex组在LPS作用早期可以维持GR活性,但后期(>2 h)GR活性逐渐降低,出现了糖皮质激素抵抗。LPS+Dex/24 h组较LPS/24 h组GR活性下调,表明此时相点Dex不但不能有效维持GR活性,并可导致GR活性抑制。Meduri等[6]报道ARDS患者外周血淋巴细胞对外源性糖皮质激素存在抵抗:外源性糖皮质激素可以降低GR与配基亲和力并下调GR表达。目前糖皮质激素抵抗机制不明[7]。因此,进一步阐明炎症反应条件下AM中GR表达及活性的调控机制对克服糖皮质激素抵抗和防治ALI具有重要的理论和临床意义。

参考文献:

[1] 张德明, 李永旺, 毛宝龄, 等. Toll样受体4与大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(7): 411—414.

[2] Roe A L, Howard G, Blouin R A. Characterization of nuclear protein binding (AP-1, GR, and STAT) in the genetically obese (fa/fa) Zucker rat [J]. Life Sci, 1998, 63(15): 1339—1346.

[3] 黄 杨, 梁继河, 贾 斌, 等. 白介素-10和一氧化氮对内毒素诱导肺泡巨噬细胞核因子κB活化及肿瘤坏死因子释放的调节[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(5): 284—286.

[4] Saklatvala J, Dean J, Clark A. Control of the expression of inflammatory response genes[J]. Biochem Soc Symp, 2003, 72(70): 95—106.

[5] Webster J C, Jewell C M, Bodwell J E, *et al*. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein[J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9287—9293.

[6] Meduri G U, Tolley, E A, Chrousos G P, *et al*. Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(7): 983—991.

[7] Kino T, De Martino M U, Charmandari E, *et al*. Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85(2-5): 457—467.

(编辑 栾 嘉)

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