DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.024
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1427-03

论著

烧伤后小鼠血清皮质酮及肝组织糖皮质激素受体水平的变化

李 军[1],史 忠[2],栗永萍[1],楼淑芬[1],刘都户[1],刘晓宏[1],王军平[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 40038;[2]附属新桥医院麻醉科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨烧伤小鼠24 h内肝组织糖皮质激素受体时相变化特点。方法 将60只BALB/c小鼠随机分为正常对照组和实验组,实验组造成背部Ⅲ度15%~20%烧伤。分别于伤后2、4、6、12、24 h测定血清皮质酮浓度,采用Western blotting、RT-PCR在蛋白质和mRNA水平测定肝组织糖皮质激素受体。结果 烧伤小鼠血清皮质酮浓度4 h达到高峰,24 h仍未恢复正常;肝组织糖皮质激素受体在蛋白质水平明显降低,4~6 h降至最低;而mRNA水平仅仅在伤后2 h有短暂降低。结论 烧伤应激引起小鼠血清皮质酮水平明显升高,其受体在蛋白及mRNA水平均可降低,但蛋白降低不主要发生在mRNA水平。

关键词:烧伤;皮质酮;糖皮质激素受体;糖皮质激素受体mRNA
中图法分类号:R322.47;R392.11;R644 文献标识码:A

Changes of serum corticosterone and hepatic glucocorticoid receptor in burned mice

LI Jun, SHI Zhong, SU Yong-ping, LOU Shu-fen, LIU Du-hu, LIU Xiao-hong, WANG Jun-ping (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of glucocorticoid receptor (GR) in liver in mice after burn. Methods A total of 60 BALB/c mice were divided randomly into control (n=10) and burn groups (n=10, respectively), sacrificed in 2, 4, 6, 12, and 24 h after burn respectively. After shaving, the mice in burn groups were inflicted with 15%~20% TBSA Ⅲ° burn on the back. Serum corticosterone concentration was determined, and total cytosolic GR and GR mRNA in the liver tissues were detected with Western blotting and RT-PCR at the time points mentioned above. Results Serum corticosterone level was markedly elevated in 4 h group, while hepatic GR in this group was markedly down-regulated. The reduced GR mRNA was only observed in 2 h group. Conclusion Serum corticosterone level is markedly elevated and hepatic GR is markedly down-regulated at both protein and mRNA levels in burned mice, but the decrease at mRNA level is not principal.

Key words: burn; corticosterone; glucocorticoid receptor; glucocorticoid receptor mRNA

糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)通过与其受体的作用参与调控细胞的生长和代谢。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。本实验以烧伤模型研究了小鼠烧伤后24 h内血清皮质酮及肝组织GR在蛋白与mRNA水平的时相变化,初步探讨烧伤后机体应激不良的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

Heraeus超速低温离心机;Beckman DU640分光光度仪;PTC-2000 PCR仪;Bio-RAD Gel Doc 2000凝胶成像分析系统。

1.2 试剂

兔抗小鼠GR多克隆抗体IgG(Santa Cruz);生物素化山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记抗体(博士德);一步法RT-PCR试剂盒(TaKaRa);皮质醇放免试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:李 军(1971—),男,四川省绵阳市人,硕士,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究 电话:(023)68752283
收稿日期:2002-01-24;修回日期:2002-03-14

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及烧伤处理 BALB/c小鼠60只,20~25 g,雄性,均背部去毛,随机分为A、B两组。A组(正常对照组)10只,脱臼处死,取股动脉血和肝脏。B组(实验组)使用凝固汽油烧伤,面积约15%~20%,Ⅲ度,烧伤后分别于2、4、6、12、24 h各脱臼处死10只,取股动脉血和肝脏。

1.3.2 血清皮质酮浓度测定 采用皮质醇放免试剂盒,按操作说明检测。

1.3.3 肝组织总蛋白提取 取肝组织100 mg加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、0.02% NaN_3、0.1% SDS、100 μg/ml PMSF、1 μg/ml Aprotinin、1% NP40)1 ml匀浆,冰上裂解30 min,4 ℃ 12 000× g离心20 min,吸上清,-70 ℃保存。

1.3.4 肝组织总蛋白SDS-PAGE及GR的Western blotting 采用Bradford法测定总蛋白浓度。各取总蛋白40 μg行SDS-PAGE,电泳结束后电转印4 h至PVDF膜。PVDF膜封闭液(1% BSA、0.02 mol/L PBS)内封闭,4 ℃过夜。加入兔抗小鼠GR多克隆抗体(一抗,1∶500),37 ℃孵育1 h,PBST(0.02 mol/L PBS、0.02% 吐温)洗膜5 min× 3,再加入山羊抗兔IgG(二抗,1∶500),37 ℃孵育1 h,PBST洗膜5 min× 3,然后加入辣根过氧化物酶标记抗体(三抗,1∶500),同样37 ℃孵育1 h及PBST洗膜。最后硫酸镍铵增强法(0.06% DAB、2.5% 硫酸镍铵、0.1 mol/L 乙酸钠、0.1% 30% H_2O_2)显色。

1.3.5 肝组织GR mRNA RT-PCR 取肝组织100 mg,按Turpure说明提取总RNA,并使用分光光度仪定量,吸光度 $A_{260/280}$ 比值均在1.80左右。设计引物:GR上游5′-ACAGCAACGGGAC-

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

CACC-3′，下游 5′TTCACTGCGGCAATCAC-3′，PCR 产物片段为 491 bp；内参照 GAPDH 上游 5′-GTGACTTCAACAGCAACTCCCATT-3′，下游 5′-GTTATGGGGTCTGGGATGGAATTGTG-3′，PCR 产物片段为 246 bp。取 1 μg RNA 按一步法 RT-PCR 试剂盒操作说明进行。RT-PCR 程序设定：50 ℃ 30 min→94 ℃ 2 min→94 ℃ 1 min、52 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min 30s，33 个循环→72 ℃ 7 min。RT-PCR 结束后 1.2% 琼脂糖凝胶（含 0.5 mg/L 溴化乙锭）电泳。

1.3.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 t 检验。

2 结果

2.1 小鼠血清皮质酮浓度结果

烧伤后血清皮质酮浓度明显升高，4 h 达到高峰，以后逐渐下降，烧伤后 24 h 还未完全恢复正常，见表 1。

表 1 烧伤小鼠血清皮质酮浓度变化（$\bar{x}\pm s$）

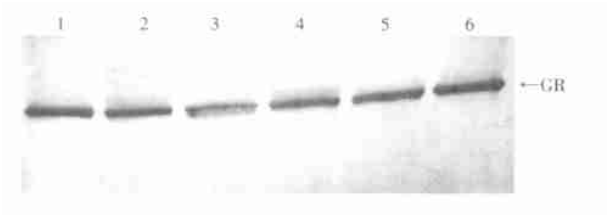
Tab 1 Alteration of serum corticosterone concentration in mice after burn ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	GC(nmol/L)
Control	10	50.40±4.09
2 h	10	86.81±5.87**
4 h	10	133.10±8.11**
6 h	10	84.97±5.99**
12 h	10	72.29±6.09**
24 h	10	59.47±4.19*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* Control

2.2 小鼠肝组织 GR Western blotting 结果

凝胶成像分析系统扫描测定各条带 A 值×面积，结果，见表 2。结果表明肝组织 GR 水平在烧伤后 2 h 已经降低，以 4 h 最明显，以后逐渐恢复，烧伤后 24 h 仍显著低于正常，见图 1。



1：Control；2：2 h；3：4 h；4：6 h；5：12 h；6：24 h

图 1 **Western blotting** 分析结果

Fig 1 Analysis of GR protein by Western blot

表 2 烧伤小鼠肝组织 **GR**、**GR mRNA** 表达水平（$\bar{x}\pm s$）

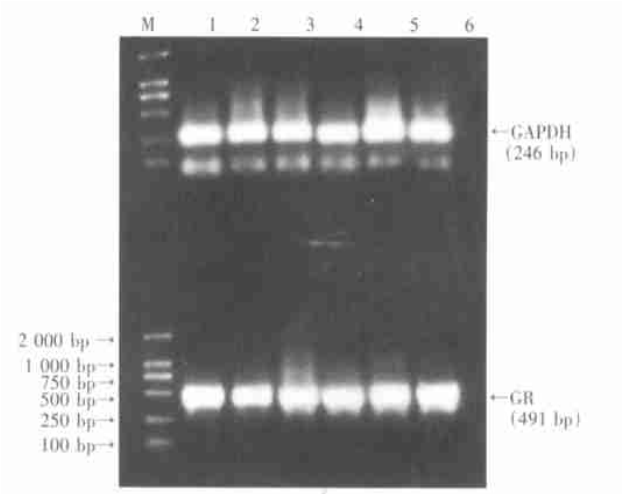
Tab 2 Expression of hepatic GR and GR mRNA in liver tissue of burned mice ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	GR(Int×mm²)	GR mRNA(A¹)
Control	6	5 678 268±63 271	1.189±0.017
2 h	6	5 423 591±25 230*	0.845±0.004**
4 h	6	3 956 488±36 003**	1.162±0.009
6 h	6	4 767 854±44 638**	1.118±0.015
12 h	6	5 256 211±26 052**	1.130±0.022
24 h	6	5 502 166±21 559*	1.202±0.022

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* Control；1：A represents relative expression level of GR mRNA

2.3 小鼠肝组织 GR mRNA RT-PCR 结果

结果表明 GR mRNA 在烧伤早期（2 h）发生了短暂的下降，而 4 h 以后就基本上恢复正常，见图 2 和表 2。



M：Marker；1：24 h；2：12 h；3：6 h；4：4 h；5：2 h；6：Control

图 2 **RT-PCR** 分析结果

Fig 2 Analysis of hepatic GR mRNA with RT-PCR

3 讨论

GC 是应激反应的主要激素之一，其生物学效应的发挥取决于靶细胞上 GR 的介导。GR 是核受体超家族中的重要成员，是一种典型的激素依赖性转录因子，与激素结合后通过和靶基因的糖皮质激素反应元件（GRE）相互作用，调节靶基因的表达，并最终引起各种生物学效应。在各种应激过程中，GR 的减少可促使休克、多器官功能衰竭的发生[1]。

本实验通过系统地观察小鼠烧伤后早期皮质酮及 GR 的变化，表明皮质酮在烧伤后早期就明显升高，4 h 达到高峰，以后逐渐下降，GR 的变化趋势与之相似，烧伤后 2 h 就已经减少，4 h 降到最低，以后逐渐恢复，但到 24 h 仍未恢复正常。徐仁宝[2] 以[^{3}H] 地塞米松为特异性配体，用放射配体结合分析法测定大鼠烫伤后肝胞液 GR 的变化，结果显示烫伤后 GR 减少，亲和力降低，并提出应激时 GR 减少，引起受体水平上的肾上腺皮质功能不全，是休克发生发展的一个重要环节。

以往的研究表明，GC 对 GR 和 GR mRNA 都有反向调节，血浆 GC 浓度提高是使 GR 减少的一个原因。GR 被它的同源配体调节，可以保护靶细胞免受过度激素作用[3]。Rosewicz 等[4] 用培养的人淋巴瘤细胞 IM-9 和大鼠胰腺 AR42 J 细胞研究了地塞米松对 GR mRNA 的调节作用，结果表明激素处理 IM-9 细胞 6 h 后，GR mRNA 降至最低水平，只有正常的 43%，而激素处理 AR42 J 细胞 12 h 后，GR mRNA 降至正常的 50%，表明在体外培养的细胞中 GC 对 GR 的下调至少部分地发生于 mRNA 水平上。Svec[5] 给予小鼠皮质酮，肝 GR 结

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

合容量下降了25%, 48～72 h 才恢复正常, 表明在靶器官GC 下调自己的受体。Sun 等[6,7] 的研究表明, GC 可使GR、GR mRNA 下调, GR mRNA 水平在 8～10 h 下降到基础的 45%～50%, 3 d 后缓慢恢复到正常水平, GR 在给药后下降到 0, 逐渐恢复到正常水平。Kalinyak 等[8] 给大鼠一次性腹腔注射地塞米松 7 mg/kg, 观察 6 h 后各组织器官中 GR mRNA 的变化情况, 结果显示所有检测的组织中, GR mRNA 均有不同程度的减少(减少40%～60%)。

尽管生理条件下 GC 调控它自己的受体量, 但是应激性 GC 升高对 GR 调节还有争议。Svec 等[9] 认为给予外源性皮质酮 24 h 受体明显下调, 而应激并不影响受体水平, 而 Cvoro 等[10] 在高热应激研究中发现 GR 显著降低。Hu[11] 和 Mohaisen[12] 也认为在急性应激中血皮质酮水平增加了 3～4 倍, 并导致了 GR 的下降。从我们的研究结果发现烧伤后小鼠血清皮质酮和 GR 下降在时间上有一致性, 提示血清皮质酮应激性升高与 GR 的下降有一定联系。尽管小鼠烧伤后体内皮质酮 24 h 内均高于正常, GR 显著降低, 但 RT-PCR 结果表明 GR mRNA 仅仅在早期(烧伤后 2 h)有短暂降低, 而以后改变不明显。表明烧伤应激后下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴过度兴奋, 引起 GC 的升高与 GR 下调有关, 但不仅仅发生在 GR mRNA 水平上, 可能还存在其它因素。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 分析突变 GR 老鼠的多个磷酸化位点揭示尽管 GR 的磷酸化位点在激素诱导的核转位中不起重要作用, 但是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[13]。众所周知烧伤应激后早期细胞因子明显增多, 其中 TNFα 等可使 GR 发生超磷酸化, 从而增加受体的降解, 引起 GR 水平下降。

参考文献:

[1] 王迪浔 主编. 病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 96－98.

[2] 徐仁宝. 糖皮质激素受体减少在休克发生中的作用——一个新假说[J]. 生命科学, 1997, 9(2): 78－80.

[3] Kurihara I, Shibata H, Suzuki T, *et al*. Transcriptional regulation of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in glucocorticoid action[J]. Endocr Res, 2000, 26(4): 1 033－1 038.

[4] Rosewicz S, McDonald A R, Maddux B A, *et al*. Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids[J]. J Biol Chem, 1988, 263(6): 2 581－2 584.

[5] Svec F. Corticosterone regulates the level of hepatic glucocorticoid receptors in mice[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1988, 188(4): 474－479.

[6] Sun Y N, DuBois D C, Almon R R, *et al*. Dose-dependence and repeated-dose studies for receptor/gene-mediated pharmacodynamics of methylprednisolone on glucocorticoid receptor down-regulation and tyrosine aminotransferase induction in rat liver[J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1998, 26(6): 619－648.

[7] Sun Y N, DuBois D C, Almon R R, *et al*. Fourth-generation model for corticosteroid pharmacodynamics: a model for methylprednisolone effects on receptor/gene-mediated glucocorticoid receptor down-regulation and tyrosine aminotransferase induction in rat liver[J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1998, 26(3): 289－317.

[8] Kalinyak J E, Dorin R I, Hoffman A R, *et al*. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone[J]. J Biol Chem, 1987, 262(22): 10 441－10 444.

[9] Svec F, Gordon S, Tate D. Glucocorticoid receptor regulation: the effects of adrenalectomy, exogenous glucocorticoid and stress on hepatic receptor number in male and female mice[J]. Biochem Med Metab Biol, 1989, 41(3): 224－233.

[10] Cvoro A, Dundjerski J, Trajkovic D, *et al*. Association of the rat liver glucocorticoid receptor with Hsp90 and Hsp70 upon whole body hyperthermic stress[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998, 67(4): 319－325.

[11] Hu Y, Gursoy E, Cardounel A, *et al*. Biological effects of single and repeated swimming stress in male rats: beneficial effects of glucocorticoids[J]. Endocrine, 2000, 13(1): 123－129.

[12] Al Mohaisen M, Cardounel A, Kalimi M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver[J]. Steroids, 2000, 65(1): 8－15.

[13] 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): 9 287－9 293.

(编辑　薛国文)

(上接 1426 页)

讨论

淋巴管瘤是一种先天性的良性错构瘤, 约半数在出生时即已存在, 这是胚胎发育过程中某些部位的原始淋巴囊与淋巴系统隔绝后所产生的畸形。90%的病例在 2 岁以内发现。好发于皮肤, 深部的疏松结缔组织, 多见于头颈部, 也可见躯干、纵隔、肠系膜、腹膜后、四肢等处。其病理变化为淋巴管扩张、增生和结构紊乱, 可向周围浸润性生长。如果淋巴管瘤中混杂有血管瘤组织, 则称血管淋巴管瘤[1], 又称脉管瘤。血管淋巴管瘤多在出生时就存在, 以后随年龄增长肿瘤逐渐长大, 不会突然增大。一般淋巴管瘤有自然消退趋势, 但血管淋巴管瘤不会自行消退。浅表淋巴管瘤诊断不难, 但组织深部病变常需借助 CT、B 超、X 线等辅助检查。过大或增长较快的淋巴管瘤应予手术将瘤组织完全切除, 对残存的囊壁可涂 0.5%的碘酒破坏内皮细胞以防复发。也可试用抗肿瘤药物(如博莱霉素, Bleomycin)局部注射。本例患者 1999 年曾行次全子宫及双附件切除术, 术后不到两年又发现如此巨大肠系膜血管淋巴管瘤, 说明第一次手术可能未行常规腹腔探查, 亦或对这种疾病认识不够, 对肿大的肠系膜误以为正常所致。故对此类少见病例临床上应予重视。

关键词: 血管淋巴管瘤; 肠系膜
中图法分类号: R733.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 汤钊猷 主编. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 1 135－1140.

(编辑　王　红)

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