DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.008
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0895-03

论著

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

王军平[1],粟永萍[1],刘贤华[1],赵景宏[2],刘都户[1],周艳红[1],秦 荣[3] (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 400038;[2]附属新桥医院肾内科,[3]附属新桥医院普通外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究大鼠在严重烫伤早期应激反应中肝脏糖皮质激素受体(GR)的表达变化及意义,探讨影响GR改变的分子机制。方法 通过免疫印迹分析GR在严重烫伤后早期不同时相点肝脏中的表达变化及烫伤血清、细胞因子以及高浓度地塞米松对体外培养肝细胞GR表达的影响;应用放免和ELISA方法测定烫伤大鼠血清皮质酮和细胞因子TNF-α、IL-1β的浓度变化。结果 大鼠肝脏GR的表达在严重烫伤后早期显著下调,而血清皮质酮和血清炎性细胞因子在烫伤早期均显著升高,体外实验则证实烫伤血清和TNF-α、IL-1对培养肝细胞GR的表达有明显抑制作用,高浓度地塞米松作用则不明显。结论 严重烫伤会引起大鼠肝脏GR表达显著下调,烫伤早期分泌增多的炎性细胞因子可能是引起GR下调的主要原因之一,而烫伤早期机体内部大量生成的糖皮质激素对GR的表达并无显著影响。

关键词:严重烫伤;糖皮质激素受体;肝脏;大鼠
中图法分类号:R392.13;R644;R977.11 文献标识码:A

Expression of glucocorticoid receptor in the liver of severe scalded rats during the early stage of stress

WANG Jun-ping, SU Yong-ping, LIU Xian-hua, ZHAO Jing-hong, LIU Du-hu, ZHOU Yan-hong, QIN Rong (Institute of Combined Injuries, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change and significance of glucocorticoid receptor (GR) in the liver of severe scalded rats during the early stage of stress. **Methods** Western blot was used to detect the expressions of GR in the liver of severe scalded rats and the cultured hepatocytes after challenged with the serum from scalded rats, TNF-α, IL-1 or high concentration of dexamethasone respectively. The concentrations of corticosterone, TNF-α and IL-1β in the serum of scalded rats were detected with RIA and ELISA. **Results** The expression of GR in the liver was markedly declined, while the contents of corticosterone, TNF-α and IL-1β in the serum were significantly elevated during the early stage of severe scalding. *In vitro*, the serum of scalded rats, as well as TNF-α and IL-1, suppressed the expression of GR in the cultured hepatocytes, while there was no significant effect of high concentration of dexamethasone on the expression of GR. **Conclusion** The expression of GR in the liver of rats is significantly down-regulated during the early stage of severe scalding, and one of the main reasons for this might result from the elevation of inflammatory cytokines after scalding.

Key word: glucocorticoid receptor; liver; scalding; rats

糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)是糖皮质激素效应发挥的关键环节,在机体应激和抗炎反应中起着非常重要的作用[1]。研究表明,机体受到严重创伤时多种组织与细胞GR的表达会发生显著变化,从而影响机体的应激反应状态并导致严重继发性损害。但是有关严重创伤时GR变化的时空特点和发生机制至今尚未完全阐明。本研究以严重烫伤大鼠为实验动物模型,首先分析了大鼠严重烫伤后早期不同时相点肝脏GR的表达变化特点,然后从烫伤动物血清入手,结合烫伤早期皮质酮和炎性细胞因子TNF-α、IL-1β的浓度改变情况,通过体外细胞培养进一步对GR表达改变的机制进行了深入探讨。

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:王军平(1972-),男,河北省新乐市人,博士,讲师,主要从事创伤应激方面研究,发表论文8篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-11-25;修回日期:2002-06-04

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年Wistar大鼠50只(本校实验动物中心提供),体重200~250 g,雌雄不拘,5只作为正常对照组,45只作为烫伤组,烫伤组又设置烫伤后15 min、30 min、1、2、4、12、24、48、72 h 9个时相点,每个时相点5只大鼠。

1.2 模型制作

大鼠背部、臀部剪毛,置剪毛区于沸水中10 s,造成35%~40%体表面积Ⅲ度烫伤,分别于烫伤后15 min、30 min、1、2、4、12、24、48、72 h处死取材。

1.3 血清皮质酮和血清TNF-α、IL-1β浓度测定

活杀大鼠,收集外周血并分离血清。应用英国放化中心的大鼠皮质酮RIA试剂盒和Endogen公司的ELISA试剂盒,分别测定烫伤大鼠血清皮质酮和TNF-α、IL-1β浓度,操作方法按试剂盒说明。

1.4 GR Western blot分析

迅速分离取血后大鼠的肝脏组织,按文献[2]提取组织总

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

蛋白，以 Bradford 法测定蛋白质浓度，并将其置于－70 ℃待用。每个样品取 40 μg 蛋白质加入等体积 2× SDS 凝胶加样缓冲液，100 ℃煮沸 5 min，经 7%聚丙烯酰胺凝胶电泳后，80 mA 电转移至 PVDF 膜 4 h，1%BSA 4 ℃封闭过夜，加入 1∶500 稀释 GR 一抗（Santa cruz 美国）37 ℃孵育 1 h，PBST 洗膜，加 1∶300 稀释生物素标记二抗（武汉博士德公司）37 ℃孵育 1 h，PBST 洗膜，加 1∶300 稀释链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物 37 ℃孵育 1 h，PBST 洗膜，DAB 显色，照相。对 PVDF 膜照相后采用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统（Bio-Rad 公司 美国）分析处理，蛋白含量以 ODu×面积表示。

1.5 烫伤血清、TNF-α、IL-1 和地塞米松对培养肝细胞 GR 表达的影响

体外培养大鼠肝细胞株 BRL-3A，生长传代稳定后，分别加入烫伤后 15 min 和 2 h 血清（终浓度为 10%）、1 μmol/L 地塞米松、1× 10^6U/L TNF-α 和 IL-1（Promega 公司），刺激培养 12 h 后，收集细胞提取总蛋白，Western blot 分析 GR 表达变化。

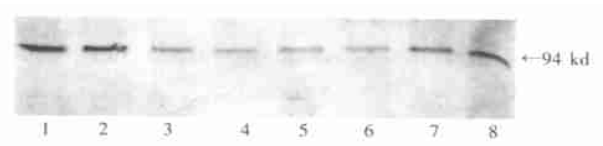
1.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS10.0 统计处理软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠严重烫伤后肝脏 GR Western blot 分析结果

肝脏组织总蛋白 Western blot 结果显示，烫伤 0.5 h GR 表达水平即开始显著降低，4 h 左右达最低值，之后逐渐上升，但至烫伤后 72 h 仍未完全恢复到正常水平。见图 1，表 1。



1: Normal; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 4 h; 5: 12 h; 6: 24 h; 7: 48 h; 8: 72 h after scalding

图 1 Western blot 分析严重烫伤大鼠肝组织总蛋白 GR 表达变化

Fig 1 Western blot of total glucocorticoid receptor protein in the liver of severe scalded rats

表 1 大鼠严重烫伤后早期肝脏组织 GR 蛋白表达变化（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Expression of GR in the liver of rats at early stage after severe scalding（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Group	ODu× mm^2
Normal	3.33±0.28
15 min	3.15±0.31
0.5 h	1.65±0.16 **
4 h	1.47±0.18 **
12 h	1.62±0.14 **
24 h	1.71±0.18 **
48 h	2.42±.027 *
72 h	2.57±0.29 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* normal group

2.2 大鼠严重烫伤后血清皮质酮和血清炎性细胞因子浓度测定结果

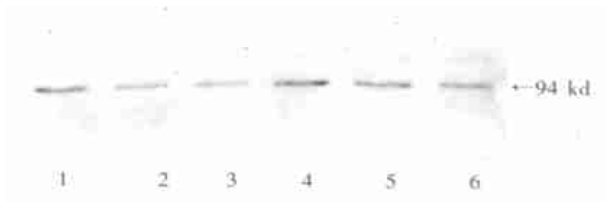
大鼠严重烫伤后 15 min 起血清皮质酮就有显著升高，2～4 h 达最高值，高出正常对照几十倍，之后逐渐下降，但仍显著高于正常，见表 2。血清 TNF-α、IL-1β 在烫伤后 15 min 也显著升高，之后逐渐下降并再度升高，在所检测 72 h 内均出现双峰现象，除 15 min 这一共同峰值外，TNF-α 的另一峰值在烫伤后 4 h 左右，IL-1β 的另一峰值在烫伤后 12 h 左右，见表 2。

表 2 大鼠严重烫伤后血清皮质酮、TNF-α 及 IL-1β 含量变化（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of serum concentration of corticosterone, TNF-α and IL-1β of rats after severe scalding（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Corticosterone (ng/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)
Normal	6.1±1.2	47.35±4.04	65.84.±7.14
15 min	53.4±13.2 **	101.88±13.12 **	144.41±21.42 **
30 min	98.9±19.5 **	85.11±6.57 *	108.69±17.14 **
1 h	135.9±21.3 **	93.49±8.13 *	94.43±8.24 *
2 h	185.5±24.2 **	101.88±12.52 **	94.41±18.57 *
4 h	149.6±16.8 **	114.47±11.41 **	94.41±14.28 *
12 h	108.5±11.4 **	89.29±9.01 *	137.27±22.34 **
24 h	93.4±14.5 **	62.32±10.07	108.71±14.28 **
48 h	74.7±13.7 **	47.35±7.25	87.27±11.45 *
72 h	59.5±10.2 **	59.94±5.24	80.13±7.14 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* normal group



1: Normal serum; 2 and 3: 15 min and 2 h serum from scalded rats; 4: Dex (1 μmol/L); 5 and 6: IL-1; TNF-α (1× 10^6U/L)

图 2 烫伤血清、地塞米松以及 IL-1、TNF-α 刺激培养后肝细胞 GR 表达变化

Fig 2 Expression of GR of BRL-3A hepatocytes after cocultured with the serum from scalded rats Dex, IL-1 and TNF-α

2.3 烫伤血清、地塞米松和炎性细胞因子对培养肝细胞 GR 表达的影响

由于严重烫伤后 GR 表达下降的过程中，血液中内源性糖皮质激素和炎性细胞因子均有显著升高。为分析它们之间的关系，我们又观察了烫伤血清、地塞米松以及 TNF-α、IL-1 对培养肝细胞 GR 表达的影响。Western blot 结果显示 15 min 和 2 h 烫伤血清以及细胞因子 TNF-α、IL-1 对 GR 的表达都具有显著抑制作用，而地塞米松则影响不明显。见图 2，表 3。

表 3 烫伤血清、地塞米松以及 IL-1、TNF-α 对培养肝细胞 GR 表达的影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Effects of serum of scalding rats Dex, IL-1, and TNF-α on the expression of GR in cultured BRL-3A hepatocytes（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Groups	ODu× mm^2
Normal serum	2.03±0.24
15 min scalded serum	1.33±0.21 **
2 h scalded serum	1.38±0.17 *
Dex (1 μmol/L)	2.11±0.22
IL-1 (1× 10^6U/L)	1.64±0.13 *
TNF-α (1× 10^6U/L)	1.59±0.21 *

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* normal serum group

3 讨论

应激是机体适应代偿的必然反应，它使机体抵抗力增强、内稳态紊乱尽快恢复。一旦应激反应失常，机

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

体便处于失代偿状态, 从而导致继发性损害。在应激反应中糖皮质激素效应起着至关重要的作用, 机体在应激反应时糖皮质激素(Glucocorticoids, GC)分泌增多, 其意义在于对抗应激激活的以炎症反应为主的防御反应, 使防御反应不至于过强而破坏机体的内环境稳态[3]。然而, 当机体受到严重创伤时, 虽然 GC 分泌显著增多, 但是临床上仍需应用大剂量外源性 GC 进行救治, 提示严重创伤时机体在糖皮质激素效应的某一环节上发生了失调。

本研究从蛋白水平深入探讨了严重烫伤大鼠早期不同时相点肝脏 GR 的表达改变, 结果显示烫伤后早期肝脏 GR 表达显著下调。GR 的表达下调必然会导致其转录激活能力下降和功能受抑。徐仁宝等[4,5]运用放射受体配基分析技术曾发现烫伤以及失血性休克大鼠肝胞液 GR 数目会减少, 烫伤及失血的程度越重, GR 减少幅度越大, 动物的生命状况越差, 死亡率越高。说明严重创伤后糖皮质激素效应的失常与 GR 表达下调密切相关。

是什么原因引起严重创伤后 GR 表达的下调呢? 本实验结果发现, 严重烫伤大鼠肝脏 GR 下调的过程中外周血皮质酮和 TNF-α、IL-1 等炎性细胞因子显著升高。为了深入分析它们与 GR 变化之间的关系, 我们通过体外细胞培养观察了烫伤血清和地塞米松刺激后对 GR 表达的影响, 结果显示烫伤血清对 GR 表达有显著的下调作用, 而地塞米松作用不明显, 说明烫伤动物血液中有对 GR 起下调作用的物质, 但是这种物质不是 GC。设想, 如果高浓度 GC 能够引起 GR 的表达显著降低, 那么再给严重创伤患者应用大剂量 GC 就失去了其治疗意义, 事实上, 在严重创伤等危重病人的急救时常常应用大剂量外源性 GC, 因此, 从临床实际用药来看大剂量 GC 应该不会引起 GR 的表达下调。

进一步分析 TNF-α、IL-1 对培养肝细胞 GR 的作用后发现, 它们可以引起 GR 表达显著下调。结合体内实验 GR 与炎性细胞因子的变化时间来看, TNF-α、IL-1β 在烫伤后早期 15 min 有一分泌高峰, 而肝脏 GR 的表达则在烫伤后 30 min 才开始发生显变化, 同时由于实验取材限制, 我们选用第一个时相点即为 15 min, 因此不怀疑在这之前这些炎性细胞因子就已经开始升高。另外, 本实验室同期的其他研究也表明, 给大鼠注射 TNF-α 和 IL-1 的中和性抗体可以显著提高肝脏 GR 的亲和力和受体数目, 并能降低外周血 TNF-α、IL-1 的含量[6]。从而间接证实本实验所发现的 TNF-α 和 IL-1 能够引起 GR 表达下调这一现象。所以, 通过对结果的综合分析, 我们认为严重创伤后早期炎性细胞因子增多可能是引起机体 GR 表达下调的一个主要原因。

已知, GR 具有抑制 TNF-α、IL-1 等炎性细胞因子生成和释放的功能[7,8]。但是, 还未见到严重创伤时 TNF-α、IL-1 可以反过来影响 GR 表达和功能的相关报道。我们的研究提示, 严重创伤时 GR 和炎性细胞因子之间存在着相互影响, 细胞因子的增多引起 GR 表达下调, GR 表达下调则进一步加重了炎性细胞因子的分泌和生成, 从而促进炎症反应的进一步加重, 造成炎症反应失控, 形成继发性全身损害。

参考文献:

[1] Barens P J, Adock I M. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechansims[J]. Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(2): 436—441.

[2] Zhou D H. Characterization of a silencer element in the human aromatase gene[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 353(2): 213—220.

[3] Munck A, Guyre P M, Holbrook N J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions[J]. Endocr Rev, 1984, 5(1): 25—44.

[4] 徐仁宝, 谭金兴. 病理性应激时大鼠肝胞液糖皮炙激素受体的变化[J]. 生理学报, 1982, 34(4): 460—465.

[5] 石汉平, 李建珍, 秦路平, 等. 失血大鼠肝、脑组织糖皮质激素受体的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(10): 577—578.

[6] 刘都户, 粟永萍, 楼淑芬 等. 烫伤大鼠肝组织糖皮质激素受体的变化及α-MSH、合成肽 KPV 的调节作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 550—552.

[7] Auphan N, DiDonato J A, Rosette C, *et al*. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis[J]. Science, 1995, 270(5 234): 286—290.

[8] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. J Neuroimmunol, 2000, 109(1): 16—22.

(编辑　陈聪连)

(上接 894 页)

麻醉下行剖腹探查术, 术中见腹膜呈紫蓝色, 腹腔内有暗红色积血约 1 200 ml, 左侧卵巢增大约 18 cm× 15 cm× 15 cm 蒂部逆行时针扭转 180°, 其右下方底部两侧均有较大破口, 其内为淡黄色质脆鱼肉样组织及陈旧性血凝块, 子宫增大如 3 月孕。术中行左卵巢肿瘤切除术, 术后病理报告为卵巢两性母细胞瘤, 术后半月行药物引产终止妊娠。

讨论

两性母细胞瘤是十分罕见的卵巢肿瘤, 由于肿瘤由颗粒-泡膜成分和支持-间质成分组成, 瘤细胞可以分泌雌激素, 亦可分泌雄激素, 因此, 临床上出现内分泌变化的多种表现, 该病例在内分泌改变下妊娠更为罕见。目前卵巢两性母细胞瘤被视为良性肿瘤, 因为肿瘤形态学上呈良性表现, 尚无临床复发及转移的报道, 但肿瘤成分中有大量颗粒细胞瘤成分时, 因颗粒细胞属低度恶性肿瘤, 所以有复发的可能。对这组病人要长期严密随访, 并争取用血浆肿瘤标记 inhibin mlc2 等监测, 对于肿瘤的预后还需深入观察研究, 才能有确切的定论。

关键词: 妊娠; 卵巢肿瘤; 扭转破裂
中图法分类号: R737.31　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郎景和, 唐敏一. 卵巢性腺间质瘤[A]. 见林巧稚 主编, 妇科肿瘤[M]. 北京: 人民出版社, 1982.185—209.

[2] Biscotticv, Hart W R. Juvenile granulosa cell tumors of the ovary[J]. Arch Pathol Lab Med, 1989, 113(6): 40.

(编辑　薛国文)

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