DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.038
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0585-03

论著

TNF-α和IL-1对大鼠肝细胞糖皮质激素受体表达及功能的影响

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

提 要:目的 研究TNF-α和IL-1对大鼠肝细胞糖皮质激素受体(GR)的表达和转录激活能力的影响,探讨炎性细胞因子诱发糖皮质激素抵抗的内在机制。方法 免疫细胞化学染色分析经TNF-α和IL-1刺激培养后BRL-3A大鼠肝细胞株GR的表达和核转位变化,应用糖皮质激素反应元件报告质粒pMAMneo-CAT分析系统观察GR的转录激活能力改变。结果 BRL-3A细胞经TNF-α和IL-1刺激培养12 h后,其胞浆和胞核GR蛋白水平的表达明显降低,尤以核内GR降低更加显著;转染pMAMneo-CAT质粒的肝细胞在地塞米松存在情况下,经TNF-α和IL-1刺激后CAT含量显著下降,两者协同效果更加明显。结论 TNF-α和IL-1可以通过降低BRL-3细胞GR的表达和核转位而抑制GR的转录激活能力,这可能是炎性细胞因子诱发糖皮质激素抵抗的主要机制。

关键词:肿瘤坏死因子-α;白介素-1;肝细胞;糖皮质激素受体
中图法分类号:R322.47;R392.11 文献标识码:A

Effects of TNF-α and IL-1 on expression and function of glucocorticoid receptor in rat hepatocytes *in vitro*

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

Abstract: **Objective** To study the effects of TNF-α and IL-1 on the expression and function of glucocorticoid receptor(GR) in rat hepatocytes in order to investigate the mechanism of glucocoticoid resistance induced by inflammatory cytokines. **Methods** Immunohistochemical methods were used to detect the expression and translocation of GR from the cytoplasm to nucleuses of liver epithelial cell strain BRL-3A. After BRL-3A cells were transfected with pMAMneo-chloramphenicol acetyltransferase (pMAMneo-CAT) reporter gene, the ability of GR-mediated gene transcription was measured by using glucocorticoid response element (GRE) reporter plasmid pMAMneo-CAT analysis system. **Results** After the stimulation of TNF-α and IL-1 respectively, the expression of GR in the cytoplasm and nucleuses of BRL-3A cells were both down-regulated, with more notable in the latter than in the former. The production of CAT controlled by GR in BRL-3A cells with pMAMneo-CAT transfection was significantly decreased after the stimulation of TNF-α and IL-1 in present of dexamethasone, and decreased further when TNF-α and IL-1 were combined. **Conclusion** Both of TNF-α and IL-1 can decrease the expression and translocation of GR from the cytoplasm to the nucleuses of rat hepatocytes, and then inhibit the transcription activation of GR, which may be one of the main reasons of glucocorticoid resistance induced by inflammatory cytokines.

Key words: tumor necrosis factor alpha; interleukin-1; hepatocyte; glucocorticoid receptor

糖皮质激素受体(GR)是机体内部主要的抗炎分子之一,是糖皮质激素(GC)效应发挥的关键环节。大量研究表明,GR能够直接或间接抑制多种炎性化学介质和细胞因子的生成与释放[1,2]。近年来有研究表明TNF-α、IL-1等炎性细胞因子可以诱发GC抵抗,提示炎症因子有可能会反过来对GR产生影响,但其机制有待深入探讨[3]。为此,本实验就以大鼠肝细胞作为研究对象,通过体外刺激培养深入探讨了TNF-α和IL-1对GR的表达、核转位以及转录激活能力的影响,以期阐明炎性细胞因子诱发GC抵抗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BRL-3A大鼠肝细胞株引自中科院上海细胞所,细胞因子TNF-α和IL-1为Promega公司产品,生物素化二抗及链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物购自武汉博士德公司,大鼠GR多抗购自美国Santa cruz公司,GRE体外转录激活报告质粒pMAMneo-CAT由法国巴黎大学的Renoir教授惠赠,DOTAP脂质体转染试剂和CAT ELISA试剂盒均为Roche公司产品。

1.2 方法

1.2.1 TNF-α和IL-1对BRL-3A细胞的体外刺激培养 取生长良好、传代稳定的BRL-3A细胞,细胞计数后分4组培养,1组作为正常对照,另3组作为实验组。细胞在置有消毒载玻片的培养皿中进行培养,在更换培养液后的次日,分别向三实验组培养瓶中加入TNF-α、IL-1、TNF-α+IL-1,TNF-α和IL-1的终浓度均为1×10^6 U/L。继续培养12 h后,取出载玻片,75%酒精固定后,进行GR免疫细胞化学染色。

1.2.2 GR免疫组化染色 采用S-P法。载玻片经0.3% H_2O_2甲醇灭活内源性过氧化物酶,10%山羊血清封闭后,加1∶100稀释的大鼠GR多抗,37 ℃ 1 h,再与1∶200稀释的生物素化二抗及链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物(武汉博士德公司)37 ℃孵育30 min,DAB显色。阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗,其余步骤不变。

1.2.3 脂质体介导pMAMneo-CAT转染培养BRL-3A细胞

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
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的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-09-30;修回日期:2002-01-05

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

制备 DOTAP/ pMAMneo-CAT 混合液，取对数生长期的 BRL-3A 细胞（约 60%～80%融合），更换培养液后，加入上述混合液，同时加入 0.01 μmol/L 地塞米松，37 ℃培养 8 h。分别向转染质粒的培养瓶中加入 TNF-α、IL-1、TNF-α＋IL-1，TNF-α 和 IL-1 的终浓度均为 1×10^6U/L。继续培养 12 h 后，收集细胞，进行 ELISA 检测 CAT 活性。

1.2.4 ELISA 检测 CAT 活性 操作参照 Roche 公司 CAT ELISA KIT 说明书进行。

1.3 统计学处理

所有数据结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计处理软件进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 TNF-α、IL-1 对体外培养 BRL-3A 细胞 GR 表达的影响

细胞免疫组化染色结果显示，正常培养的 BRL-3A 肝细胞的胞浆和胞核中均有较强的 GR 阳性着色，而分别加入 TNF-α 和 IL-1 刺激培养 12 h 后，细胞中的阳性着色明显减弱，其中尤以核内着色减弱更加显著，TNF-α 和 IL-1 共同刺激后 GR 阳性着色减弱的程度更加严重，见图 1～4。

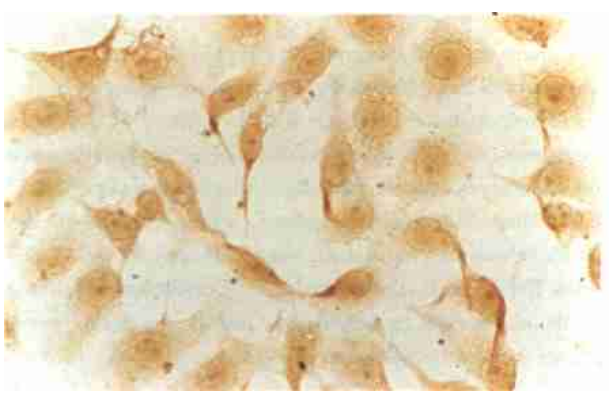


图 1 正常培养 **BRL-3A** 细胞 **GR** 免疫组化染色结果，胞浆与胞核中均有较强的阳性着色 （S-P× 400）

Fig 1 Intensive positive staining of GR protein in the cytoplasm and nucleus of BRL-3A cells （S-P× 400）

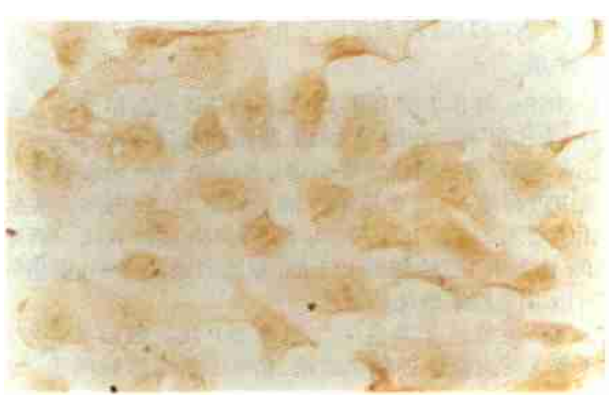


图 2 **TNF-α** 刺激后 **BRL-3A** 细胞 **GR** 免疫组化染色结果，胞浆与胞核中的阳着色均显著减弱 （S-P× 400）

Fig 2 Weak positive staining of GR protein in the cytoplasm and nucleus of BRL-3A cells cultured with TNF-α （S-P× 400）

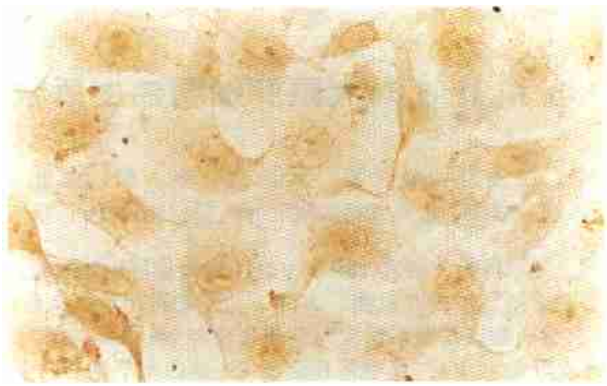


图 3 **IL-1** 刺激后 **BRL-3A** 细胞 **GR** 免疫组化染色结果，胞浆与胞核中的阳着色均显著减弱 （S-P× 400）

Fig 3 Weak positive staining of GR protein in the cytoplasm and nucleus of BRL-3A cells after IL-1 coculture （S-P× 400）

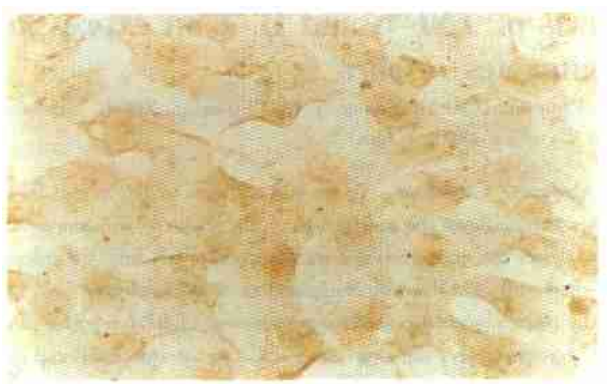


图 4 **TNF-α** 与 **IL-1** 共同刺激后 **BRL-3A** 细胞 **GR** 免疫组化染色结果，阳性着色减弱更加显著 （S-P× 400）

Fig 4 More light positive staining of GR protein in the cytoplasm and nucleus of BRL-3A cells after the co-stimulation of TNF-α and IL-1 （S-P× 400）

2.2 TNF-α、IL-1 对 BRL-3A 细胞 GR 转录激活能力的影响

转染 pMAMneo-CAT 后的 BRL-3A 细胞裂解液经 CAT ELISA 分析结果显示，正常情况下在地塞米松存在时细胞中有较高的 CAT 生成，当细胞因子 TNF-α 和 IL-1 刺激后，BRL-3A 细胞中 CAT 的含量显著下降（$P<0.01$），且两者共同刺激抑制作用更强，见表 1。

表 1 转染 **pMAMneo-CAT** 的 **BRL-3A** 细胞受 **TNF-α** 及 **IL-1** 刺激后 **CAT** 含量改变（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 CAT amounts in pMAMneo-CAT-transfected BRL-3A cells cultured with TNF-α, IL-1 or their combination（$n=5$, $\bar{x}\pm s$）

Group	CAT（A_{405}）
Dex	0.49±0.01
TNFα＋Dex	0.33±0.02**
IL-1＋Dex	0.37±0.01**
TNFα＋IL-1＋Dex	0.25±0.02**

**: means $P<0.01$ *vs* normal group

3 讨论

GC 效应在机体的生命活动中起着非常重要的作

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

用, 而其作用的发挥又与 GR 的表达和功能状态密切相关。GR 是激素核受体家族的一个主要成员, 同时也是一种重要的核转录调控因子, 它能够调控多种基因的转录激活和抑制。大量研究表明 GC-GR 可以直接或间接抑制 IL-1、IL-6、TNF-α 等炎性细胞因子的生成与释放, 从而发挥其显著的抗炎和抗免疫作用。然而, 近年来有研究发现一些炎性细胞因子反过来又能够诱发 GC 抵制现象, 原因尚不完全清楚, GR 改变可能在其中起重要作用[3,4]。为此, 本实验首先分析了 TNF-α 和 IL-1 对培养 BRL-3A 细胞 GR 表达的影响。结果发现, TNF-α 和 IL-1 可以引起 GR 表达明显下调, 同时, 比较胞浆和胞核中 GR 的阳性染色改变发现, 胞核内 GR 的降低更加显著, 提示炎性细胞因子对 GR 由胞浆向胞核的转位过程也有显著的抑制作用。已知生理状态下, GR 与热休克蛋白等分子伴侣结合而存在于胞浆中, GC 进入细胞后与 GR 的 C 端结合并使其活化, 活化后的 GR 与 GC 一起移向核内, 然后再与细胞核靶基因中特定的糖皮质激素反应元件(Glucocorticoid response element, GRE)结合, 诱导生产特异性 mRNA, 指导蛋白质合成, 发挥其生物效应[5,6]。因此, GR 表达和核转位发生改变必然会影响到其功能的发挥。

为了进一步证实 TNF-α 和 IL-1 对 GR 功能的影响, 我们又运用体外转录激活报告质粒分析系统对 GR 的转录激活能力进行了分析。在此系统中质粒 pMAM-neo-CAT 的启动子为某一特定的 GRE, CAT(氯霉素乙酰转移酶)为报告基因, 当细胞转染了此质粒后, 只要体系中有 GC-GR 的存在细胞中就会有 CAT 生成, 因此, 通过检测 CAT 的含量变化就能准确地反映出 GR 的转录激活能力[6]。本实验结果显示, 转染了 pMAM-neo-CAT 的 BRL-3A 细胞, 在一定浓度地塞米松存在的情况下有较多的 CAT 生成, 而经 TNF-α 和 IL-1 刺激后, CAT 的生成则显著减少, 提示 TNF-α 和 IL-1 能够对 GR 介导的基因转录生成具有显著的抑制作用。GR 的转录激活能力受到抑制, 必然会影响 GC 效应的发挥, 从而导致 GC 抵抗。

由于 GC-GR 可以抑制 TNF-α 和 IL-1 等炎性细胞因子的生成与释放, 如果这些细胞因子反过来又能通过影响 GR 而诱发 GC 效应抵抗, 则会使炎性细胞因子的生成失去控制, 这可能是某些失控性炎症反应发生的机制之一。因此, 当机体在受到某些损伤和疾病打击而造成炎性细胞因子大量释放时, 应及早进行抗炎治疗包括使用细胞因子阻断剂和中和性抗体等, 防止炎性细胞因子长时间刺激 GR 而诱发 GC 抵抗。同时, 本实验结果也进一步提示人们可以通过调节 GR 的表达和核转位来逆转 GC 抵抗。

参考文献:

[1] Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, *et al*. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids[J]. Mol Endocrinol, 1995, 9(4): 401—412.

[2] 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.

[3] De Kloet E R, Oitzl M S, Schobitz B, *et al*. Cytokines and the brain corticosteroid receptor balance: relevance to pathophysiology of neuroendocrine-immune communication[J]. Psychoneuroendocrinology, 1994, 19(2): 121—134.

[4] Miller A H, Pariante C M, Pearce B D. Effects of cytokines on glucocorticoid reeptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression[J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 461: 107—116.

[5] Wright A P, Zilliacus J, McEwan I J, *et al*. Structure and function of the glucocorticoid receptor[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993, 47(1—6): 11—19.

[6] Eriksson M A, Nilsson L. Structure, thermodynamics and cooperativity of the glucocorticoid receptor DNA—binding domain in complex with different response elements. Molecular dynamics simulation and free energy perturbation studies[J]. J Mol Biol, 1995, 253(3): 453—472.

[7] Boronat S, Richard-Foy H, Pina B. Specific deactivation of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter upon continuous hormone treatment[J]. J Biol Chem, 1997, 272(35): 21 803—21 810.

(编辑　薛国文)

(上接 584 页)

贴撕去, 以免造成移植皮片松脱。

3.3.2　受皮区应尽量避免活动, 尤其是口周、下颌、颈部等活动范围较大的部位, 应尽量减少活动度; 同时注意预防上呼吸道感染, 以免咳嗽、打喷嚏使受皮区活动加大。洗脸、洗澡时应尽量保护好受皮区, 不要浸湿及触碰。

3.3.3　出汗过多不利于移植皮片成活, 因此应尽量避免剧烈运动, 尤其夏季尽量减少出汗, 注意休息, 衣着适度, 适当晒太阳有利于黑色素生成, 但应避免暴晒。

3.3.4　饮食护理　　移植后饮食无特殊禁忌, 嘱患者多食豆类食品有利于黑色素生成。

3.3.5　移植后 7 d 左右, 受皮区有瘙痒感, 嘱患者切勿搔抓, 以免拉脱皮片造成移植失败。必要时口服少量镇静止痒药物。

4　讨论

白癜风是一种常见病, 病程慢性, 顽固难治, 自体表皮移植为治疗白癜风开辟了新的治疗途径, 对于已采用多种治疗方法无效的病例, 可选用此方法治疗。自体表皮移植方法虽然比较简单, 但移植后的成活率受多种因素影响, 涂彩霞等[2]报道自体表皮移植治疗白癜风时, 其移植失败的原因可能为: 受皮区为活动较大的部位, 使移植皮片不易固定而脱落, 根据此经验, 我们加强了移植前、移植中及移植后的护理, 尽量避免各种不利因素, 治疗白癜风 129 例, 移植皮片 512 处, 移植成活率达 94.5%, 为顽固难治的白癜风患者带来新的曙光。但如何缩短吸疱取皮时间及改进负压吸头的多种形状有待进一步研究。

关键词: 负压吸疱; 表皮移植; 白癜风
中图法分类号: R758.41　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Suvanprakorn P, Dee Ananlap S, Pongsomboon C, *et al*. Melanocyte autologous grafting for treatmant of leukoderma[J]. J Am Acad Dermatol, 1985, 13(6): 968—974.

[2] 涂彩霞. 吸引发疱法自体表皮移植治疗白癜风[J]. 中国皮肤性病学杂志, 1996, 10(1): 24.

(编辑　汪勤俭)

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