DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.028
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
550 2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)05-0550-03

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

刘都户,粟永萍,楼淑芬,张 渭,高京生,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨烫伤所致的病理性应激时大鼠肝胞液糖皮质激素受体的变化及可能的调节机制。方法 以[^{3}H]地塞米松为配体,用放射性配基-受体结合分析法测定了正常对照组、轻度烫伤组和重度烫伤组大鼠肝胞液糖皮质激素受体的结合容量(Receptor capacity, R_0)和表观解离常数(Kd)。采用体内注射TNFα、IL-1β中和抗体和α-促黑色素细胞刺激激素(α-melanocyte-stimulating hormone, α-MSH)和合成肽KPV(Ac-D-Lys-L-Pro-D-Val)等措施调节其改变。结果 与正常组的R_0[Mass action robust:(307.86±24.22) fmol/mg; Scatchard:(306.71±27.96) fmol/mg]相比,烫伤后12 h,轻烫组的R_0[Mass Action Robust:(285.19±16.62) fmol/mg; Scatchard:(296.64±16.06) fmol/mg]差异不显著;重烫组的R_0[Mass action robust:(205.52±30.41) fmol/mg; Scatchard:(208.45±30.78) fmol/mg]则显著下降($P<0.05$)。用体内注射TNFα、IL-1β中和抗体和α-MSH和KPV均能明显改善重烫组R_0的降低。结论 TNFα、IL-1β中和抗体、α-MSH及KPV均可在一定程度上防止重度烫伤所致的病理性应激时糖皮质激素受体的减少。

关键词:烫伤;应激;糖皮质激素;受体
中图法分类号:R392.11;R644;R977.1 文献标识码:A

Changes of glucocorticoid receptor in hepatic cytoplasm in scalded rats and its regulation by α-MSH and KPV peptide

LIU Du-hu, SU Yong-ping, LOU Shu-fen, ZHANG Wei, GAO Jing-sheng, CHENG Tian-min (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of glucocorticoid receptor (GR) in hepatic cytoplasm in rats after scalding-induced pathological stress and its regulation. Methods The receptor binding capacity (R_0) and the apparent dissociation constant (Kd) of GR in hepatic cytoplasm of normal, low-degree and heavy-degree scalded rats were measured with radio-ligand binding assay, with [^{3}H] dexamethasone as ligand. The changes of R_0 and Kd of GR were regulated by injections of anti-rat TNFα, IL-1β antibodies, α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH), and KPV peptide (Ac-D-Lys-L-Pro-D-Val) respectively *in vivo*. Results The R_0 of GR in hepatic cytoplasm in rats 12 h after heavy-degree scalding [Mass action robust: (205.52±30.14) fmol/mg; Scatchard: (208.45±30.78) fmol/mg] were significantly lower than that of control group [Mass action robust: (307.86±24.22) fmol/mg; Scatchard: (306.71±27.96) fmol/mg] ($P<0.01$), but no significant difference was found in the R_0 of GR between the control and the rats 12 h after low-degree scalding [Mass action robust: (285.19±16.62) fmol/mg; Scatchard: (296.64±16.06) fmol/mg]. The injection of anti-rat TNFα, IL-1β antibodies, α-MSH and KVP all prevented the decline of R_0 of GR in hepatic cytoplasm in rats with severe scalding. Conclusion The injections of anti-rat TNFα, IL-1β antibodies, α-MSH or KPV can attenuate the reduction of GR in rat hepatic cytoplasm caused by severe scalding-induced pathological stress to some extent.

Key words: scalding; stress; glucocorticoid; receptor

应激时的一个突出变化是肾上腺糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)分泌增多,它历来受到人们的重视,但关于病理性应激时糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)变化的研究尚未引起人们足够的重视。创伤时,病人血浆皮质醇浓度虽然很高,但抢救时还要用可的松类药物治疗,达不到疗效,表明应激时靶细胞的GR可能减少,因而对GC的反应性降低。目前已有关于应激、烫伤、休克时糖皮质激素受体减少及靶细胞对GC反应性降低的报道[1,2]。有的学者提出了GR减少可使休克加重的假说[3,4],但迄今为止,尚未见有能避免应激时的GR减少的有效药物,问题在于GR下调的机制还不是很清楚。如何提高GR表达,增强GR的功能是关键问题,目前未见相关文献报道。本实验以局部烫伤作为应激源,以地塞米松(DEX)为配体,研究应激时GC的靶细胞之一肝胞液GR的变化,并对其机制进行初步探讨。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:刘都户(1966-),男,陕西省西安市人,博士,讲师,主要从事创伤应激反应及其调控和肿瘤综合治疗方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752355
收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-03-15

1 材料与方法

1.1 材料

[1,2,4,6,7-^{3}H]地塞米松([^{3}H]dexamethasone, [^{3}H]DEX)、地塞米松(Dexamethasone, DEX)为Amersham pharmacia biotech产品。特异性活度(Specific activity, S.A.)336.7×10^{10} Bq/mmol。用0.01 mol/L Tris缓冲液(pH 7.4)稀释成100倍备用。Rat IL-1β、TNFα中和抗体为Endogen产品。α-MSH由Sigma公司提供。KPV肽由第三军医大学免疫学研究所合成。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 第一部分:观察烫伤大鼠肝组织GR的变化。Wistar雄性大鼠18只,体重180~200 g,背部剪毛,腹腔注入1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。随机分为以下3组,每组6只:①正常对照组:大鼠不做任何处理。②轻度烫伤组:90 ℃水中5~6 s,烫伤面积为9%~10%;③重度烫伤组:

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

90 ℃水中 9～10 s，烫伤面积为 35%左右。烫伤后的动物立即予腹腔注入生理盐水（每 100 g 体重 5 ml）复苏治疗。烫伤时间为 20:30～21:00，12 h 后处死动物，按文献[5]的方法，取肝脏组织制备肝胞液；第二部分：研究 TNFα、IL-1β 中和抗体、α-MSH 和 KPV 对重度烫伤大鼠肝胞液 GR 的影响作用。Wistar 雄性大鼠 24 只，每组 6 只，致伤方法同第一部分的重度烫伤模型。随机分为以下 4 组：①Anti-TNFα 组，烫伤前 15 min 尾静脉注入 TNFα 中和抗体（3.5 mg/kg）；②Anti-IL-1β 组，烫伤前 15 min 尾静注入 IL-1β 中和抗体（3.5 mg/kg）；③α-MSH 组，烫伤前 15 min 腹腔注入 100 μg（0.2 ml）剂量 α-MSH；④KPV 组，烫伤前 15 min 腹腔注入 KPV 40 μg（0.2 ml）剂量。各组抗体克处理同重度烫伤组。

1.2.2　大鼠肝组织糖皮质激素受体的测定　　GR 测定用改进了的放射性配体结合法[6]，分别用 Mass action robust 法和 Scatchard 法分析测定 GR 的 R_0 和 Kd 值（分析软件为 Rosenthal HE 设计）[7,8]。肝胞液蛋白含量的测定用 Lowry's 法进行。

1.2.3　统计学处理　　实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 t 检验判定均数差异的显著性。

2　结果

2.1　烫伤大鼠肝胞液 GR 的变化

大鼠烫伤后 12 h，用放射性配基-受体结合分析法检测大鼠肝胞液 GR 的 R_0 和 Kd 值，结果见表 1。

表 1　大鼠肝细胞胞液 GR 的 R_0 和 Kd（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　R_0 and Kd of GR in hepatic cell cytosol in rats（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Mass action robust		Scatchard	
		R_0	Kd	R_0	Kd
		(m_B/fmol·mg)	(C_B/nmol·L^{-1})	(m_B/fmol·mg)	(C_B/nmol·L^{-1})
Control	6	307.86±24.22	34.1576±5.7968	306.71±27.95	34.0267±4.1516
Low-degree scald	6	285.19±16.62	36.8363±9.8691	296.64±16.06	39.5056±11.3314
Heavy-degree scald	6	205.52±30.41*	28.9412±2.2309	208.45±30.78*	29.8551±3.4465

*：$P<0.05$ *vs* control

2.2　应用 TNFα 和 IL-1β 中和抗体、α-MSH、KPV 对重度烫伤肝胞液 GR 的调节作用

重度烫伤前 15 min 给大鼠体内分别注射 TNFα 抗体、IL-1β 抗体、α-MSH 和 KPV，肝胞液 GR 的表观结合容量（R_0）均显著提高，见图 1，但解离常数（Kd）变化不显著，见表 2。

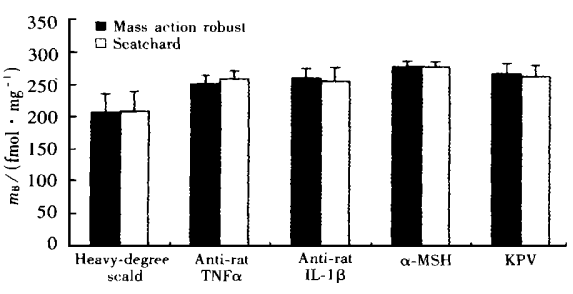


图 1　Anti-TNFα，anti-IL-1β 中和抗体，α-MSH 和 KPV 对重度烫伤大鼠肝胞液 GR 的 R_0 值的影响

Fig 1　Effect of anti-TNFα、IL-1β antibody，α-MSH and KPV on the R_0 of GR in hepatic cell cytosol in rats 12 h after heavy-degree scald

表 2　大鼠肝细胞胞液 GR 的 Kd 变化（C_B/nmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Kd of GR in hepatic cell cytosol in rats（C_B/nmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Mass action robust	Scatchard
Control	6	34.1576±5.7968	34.0267±4.1516
Anti-TNFα	6	28.3975±0.6027	30.2329±0.8151
Anti-TNF-β	6	33.8633±6.6435	32.9991±5.3640
αMSH	6	33.2228±6.2255	33.1976±4.4098
KPV	6	38.5027±13.6927	36.9327±10.6032

3　讨论

创伤应激导致机体多种环境内稳态轴[容量与压力感受调节系统，交感神经兴奋而副交感神经抑制调节，下丘脑-垂体-肾上腺轴（Hypothalamic-pitutitary-adrenal axis，HPA）反应，肝脏急性期反应（Acute phase response，APR），免疫反应调节及长效的精神行为改变等]的适应性改变，具有普遍意义和最重要的 3 个反应轴是：包括 HPA 轴的内分泌系统，交感神经系统和肝脏的急性期反应。这些调节系统的同时兴奋产生协同、整合效应以提高机体的创伤后存活机率。中枢神经系统兴奋后产生的 CRH 进入垂体门脉系统，刺激垂体前叶释放促肾上腺皮质激素（Adrenocorticotropic hormone，ACTH），ACTH 通过体循环进入肾上腺皮质，促进 GC 的合成与释放，GC 以弥散方式进入细胞胞浆，与位于其中的 GR、热休克蛋白（Heat shock protein，HSPs），免疫亲和素（Immunophilin）复合物结合，GR 复合物结合 GC 后 GR 构象发生改变，HSPs Immunophilin 解离，使结合 GC 的 GR 进入核内，GR 可以作为转录因子调节靶基因的表达[5,9]。所有的有核细胞均表达 GR，GC 可以通过调节代谢通路、细胞因子和激素受体水平，及包括儿茶酚胺在内的激素的合成与活性而对机体的内稳态产生广泛的效应。已知糖皮质激素分泌增多，是机体应激反应的一个重要方面。但应激时靶细胞激素反应性的变化近年来才引起人们的注意，靶细胞对激素反应性变化的机制十分复杂，但受体是决定靶细胞反应性的关键性大分子，GR 在应激反应中具有与 GC 同等重要的地位。文献[3]认为，GR 减少可使休克加重，促进多器官衰竭的发生。机体在应激反应时，保持 GC 于高水平并提高 GR 的量有非常重要的意义，要解决好此问题，应首先对 GC 效应抵制的机制有一个清楚的认识。在多种创伤等因素所造成的应激反应中，GC 效应出现了失敏，关于其机制可能涉及到：①激素受体复合物转移到核内；②应激时蛋白分解加强，受体蛋白分解也加强；③应激时血中多种激素的浓度发生变化，通过这些激素对 GR 调节，使 GR 减少，但具体机制还未清楚。GR 是应激反应重要的核转录调控因子，创伤后 GR 功能下调，并于休克加重、SIRS、MODS 发生、发展相关，因此调节 GR 有重要意义。

严重败血症、失血性休克、烧伤等可造成程度不同的脑细胞、外周血单核细胞、肝细胞等的 GC 效应抵制，表现为糖皮质激素受体的表达量、亲和力下降[1～3]。局部创伤组织发生血管通透性升高，中性粒

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

细胞、单核细胞渗出，血管内皮损伤，加上细菌感染所释放的LPS，导致创伤组织局部依次产生TNFα、IL-1β及IL-6等细胞因子。这3种细胞因子以自分泌和旁分泌的形式产生级联放大作用。大量产生的TNFα、IL-1β及IL-6进入血液循环，可单独也可联合协同在下丘脑、垂体和肾上腺3个不同水平起兴奋HPA轴的作用[10~12]。GR的表达量和功能状态是糖皮质激素发挥生理效应的基础，检测GR结合容量可反映GR的数量和与GC的结合活性。我们的研究发现，重度烫伤使大鼠肝胞液GR的R_0值下降，而用TNFα、IL-1β中和抗体可明显减低其下降。根据这个结果我们提出以下假设，病理性应激时，合适的TNFα、IL-1β等细胞因子增强可以启动应激反应轴HPA的兴奋，提高机体的抗损伤能力，但持续过高水平和炎性因子可以在效应分子GR水平降低应激反应的保护作用。

α-MSH是一种内源性神经肽，来源于其前体激素-阿片促黑激素皮质素原(Propiomelanocortin, POMC)。POMC和α-MSH最先在垂体中检出，近年来发现在非垂体组织如脑、皮肤、性腺、胃肠道和免疫活性细胞上也存在。α-MSH和黑皮素受体(Melanocortin receptor, MCR)结合，活化腺苷酸环化酶，提高细胞内cAMP浓度，增强酪氨酸酶活性，刺激黑色素细胞分化、增殖，促进黑色素形成。另外α-MSH抑制发热及各种实验性炎症，如动物模型中由炎症介质引起的急性炎症、慢性炎症、迟发性过敏反应和内毒素引起的系统性炎症反应综合症以及再灌注损伤所致的脑内炎症等[13]。在人类，α-MSH浓度在炎症部位、炎症性紊乱患者血浆及注射内毒素后增高。α-MSH抑制促炎因子的产生，抑制巨噬细胞一氧化氮的合成和新喋呤(Neopterin)产生[14]及人成纤维细胞前列腺素E_2生成，以剂量依赖方式抑制中性粒细胞的趋化作用，增强IL-10生成，发挥外周抗炎作用[13]。我们的研究发现，TNFα、IL-1β在创伤后早期明显升高，并早与GR下降的发生时间，因此我们用中和抗体来抑制细胞因子“瀑布效应”，以阐明GR下降的机制，进一步应用α-MSH及其C-端短肽KPV对GR进行调节。本研究发现，α-MSH及其C-端短肽KPV均可减缓重度烫伤所致病理性应激时GR下降水平。这可能与其可降低促炎症细胞因子的持续过度升高作用有关，关于其具体机制，我们正在做进一步的研究，旨在指导临床应用。

参考文献：

[1] Golier J. Neuroendocrine activity and memory-related impairments in post-traumatic stress disorder[J]. Dev Psychopathol, 1998, 10(4): 857—869.

[2] Cole M A. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies[J]. Psychoneuroenocrinology, 2000, 25(2): 151—167.

[3] Fan J, Gong X Q, Wu J, *et al*. Effect of glucocorticoid receptor (GR) blockade on endotoxemia in rats[J]. Circ Shock, 1994, 42(2): 76—82.

[4] Marinelli M, Aouizerate B, Barrot M, *et al*. Dopamine-dependent responses to morphine depend on glucocorticoid receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(13): 7 742—7 747.

[5] Rtynolds P D, Ruan Y, Smith D F, *et al*. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP 51[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(2): 663—669.

[6] 谭金兴，徐仁宝. 糖皮质激素受体交换测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1987, 4(1): 56—58.

[7] Scatchard G. The attractions of proteins for the small molecules and ions [J]. Ann N Y Acad Sci, 1949, 51: 660—672.

[8] Rosenthal H E. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system[J]. Anal Biochem, 1967, 20(3): 525—532.

[9] Savory J G, Hsu b, Laquian I R, *et al*. Discrimination between NL1-and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(2): 1 025—1 037.

[10] Costa L A, Fornari M C, Berardi V E, *et al*. *In vivo* effect of snake phospholipase(2) (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1 alpha, TNF-alpha, IL-1ra level in human[J]. Immunol Lett, 2001, 75(1): 137—141.

[11] Shimokawa T, Yamamoto K, Kojima T, *et al*. Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha *in vitro* and *in vivo*[J]. Thromb Res, 2000, 100(3): 211—221.

[12] Bondeson J, Browne K A, Brennal F M, *et al*. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IκBα into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-KB independent[J]. J Immunol, 1999, 162(5): 2 939—2 945.

[13] Lipton J M, Catania A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH[J]. Immunol Today, 1997, 18(3): 140—145.

[14] Catania A, Delgado R, Airaghi L, *et al*. α-MSH in systemic inflammation, central and peripheral action[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 885(3): 183—187.

（编辑 潘式文）

消息

本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化，推进科技信息交流的网络化进程，我刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”，所以，向本刊投稿并录用的稿件文章，将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”，进入因特网提供信息服务。凡有不同意者，请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬，不再另付。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作，读者可上网查询浏览本刊内容，并征订本刊。

《第三军医大学学报》编辑部

2001年4月

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