

糖皮质激素的低亲和力结合部位

乐颖影、钱国正¹、隋黎明²、宫钦志³、徐仁宝

(第二军医大学病理生理学教研室、¹生物医学工程教研室, 上海 200433, 中国)

Low-affinity binding sites of glucocorticoid

LE Ying-Ying, QIAN Guo-Zheng¹, SUI Li-Ming², GONG Qin-Zhi³, XU Ren-Bao
(Departments of Pathophysiology and ¹Biomedical Engineering, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The low-affinity glucocorticoid binding sites (LAGS) with steroid specificity were demonstrated in hepatic cytosol, cerebral cytosol, and thymocytes of rat. The K_d of LAGS was 1-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ as estimated by Scatchard, pseudoscat- chard, and competitive analysis. The specific binding of dexamethasone 1-100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ was roughly parallel with its inhibition of [³H]UdR incorporation in thymocytes of rat, and both were blocked by mifepristone (RU-486), the competitive antagonist of glucocorticoids. These results suggest that the pharmacological activity of glucocorticoid might be mediated at least partially by LAGS.

KEY WORDS glucocorticoids; binding sites; liver; brain; thymus gland

提要 大鼠肝胞液、脑胞液、胸腺细胞存在糖皮质激素特异的低亲和力结合部位(LAGS)。Scatchard, Pseudoscat- chard 和置换曲线分析得 LAGS 解离常数 K_d 为 1-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。地塞米松 1-100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和大鼠胸腺细胞的特异结合与其对 [³H]尿嘧啶核苷参入的抑制效应平行, 两者均可被糖皮质激素受体拮抗剂 mifepristone 所阻断, 提示药理浓度糖皮质激素的效应至少部分地由 LAGS 介导。

关键词 糖皮质激素类; 结合位点; 肝; 脑; 胸腺

Received 1989 Oct 4

Accepted 1990 Sep 6

² Now in Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

³ Now in Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China

糖皮质激素(glucocorticoids, GC)不仅是维持生命所必需的重要甾体激素, 而且是临床上广泛应用的药物。生理浓度的 GC 通过与靶细胞上糖皮质激素受体结合而产生生物效应, 但对于药理浓度 GC 的作用一般认为不通过 GC 受体介导^(1,2), 只有几篇报告讨论到此问题⁽³⁻⁵⁾。本实验室曾发现, 药理浓度氢可的松对人体外周血白细胞化学趋化移动的抑制可部分地被 mifepristone (RU-486)所逆转, 提示这作用通过 GC 受体介导(未发表资料)。本文的目的在于探讨 GC 靶细胞上是否存在糖皮质激素低亲和力结合部位(low-affinity glucocorticoid binding sites, LAGS)以及 LAGS 与 GC 效应的关系。

MATERIALS AND METHODS

[³H]曲安缩酮(triamcinolone acetonide, TA), 0.74 和 1.11 $\text{PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$; [³H]地塞米松(dexamethasone, Dex), 1.48 和 1.74 $\text{PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$; [³H]皮质酮(corticosterone), 3.22 $\text{PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$, 皆为英国放化中心产品, 放化纯度 >97%, 放化浓度 37 $\text{MBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。 [³H]UdR 0.89 $\text{PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$, 为中科院上海原子核研究所产品。mifepristone, RU26988 为法国 RUSSEL UCIAF 惠赠, 其他非标记甾体激素均为 Sigma 产品, 其余为国产 AR 或 CP 级试剂。

Wistar 大鼠, 体重 $187 \pm \text{SD } 24\text{g}$, ♂♀不拘, 由本校动物所提供。

大鼠肝、脑胞液制备 采用匀浆后超速离心法⁽⁶⁾。

大鼠胸腺细胞的分离 大鼠断头处死, 迅速取出胸腺, 置于 150 目钢网中研磨, 用

Hanks 液过滤成细胞悬液，将悬液用 4 号针头过滤以制成单细胞悬液，并调至 $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ 细胞 / ml，台盼蓝染色，细胞活力在 95% 以上。

GC 结合实验

1 Scatchard 分析 肝胞液 GC 特异结合采用活性炭吸附法⁽⁶⁾。胸腺细胞 GC 特异结合的测定：取细胞悬液 0.45 ml，加 0.05 ml $[^3\text{H}]\text{Dex } 2-50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，非特异结合管加 $[^3\text{H}]\text{Dex } 2000$ 倍浓度的 Dex，21℃ 温育 2 h 后取出，用冷磷酸缓冲液洗去游离配基，消化细胞，液闪计数。

2 Pseudoscatthard 分析 在各管加入定量的标记配基($[^3\text{H}]\text{TA}$ 或 $[^3\text{H}]\text{Dex}$)，再分别加入不同量的非标记配基(TA 或 Dex)，非特异结合管加标记配基 1000 或 2000 倍浓度的非标记配基，0-4℃ 放置一定时间(TA 10 h, Dex 3 h)，加 DCC 5% 吸附游离配基，离心后取上清液闪计数。

3 置换曲线分析 在各管中加入 $[^3\text{H}]\text{TA } 50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 TA 或其他甾体激素 $2.88 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} - 0.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，测定 $[^3\text{H}]\text{TA}$ 结合量。

GC 抑制大鼠胸腺细胞 $[^3\text{H}]\text{UdR}$ 参入量以及 mifepristone 对其影响的检测法 取细胞悬液 ($1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ 细胞 / ml) 0.4 ml，加 Dex 0.05 ml，加或不加 mifepristone 至所需浓度，加蒸馏水至终容量 0.5 ml，在 37℃，5% CO_2 ，饱和湿度的培养箱中反应 4 h 加入 $[^3\text{H}]\text{UdR } 18.5 \text{ kBq}$ ，继续反应 1 h 后取出， $1300 \times g$ 离心 5 min，去上清，用 0-4℃ 磷酸缓冲液重复洗两次，沉淀细胞加 0.1 ml 无水甲酸消化，液闪计数。

数据处理 Scatchard 分析、pseudo-scatchard 分析及置换曲线分析均用美国 Dr Munson 惠赠的 LIGAND 程序⁽⁷⁾处理数据。

RESULTS

GC 结合实验

1 大鼠肝胞液 $[^3\text{H}]\text{TA}$ 结合实验

Scatchard 分析 由 Fig 1 可见， $[^3\text{H}]\text{TA} < 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，结合曲线为双曲线型，Scatchard 作图呈一直线； $[^3\text{H}]\text{TA} > 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，特异结合又有显著增加，结合曲线呈 S 型，Scatchard 作图呈上凹曲线，可分解为高、低亲和力两类结合部位。

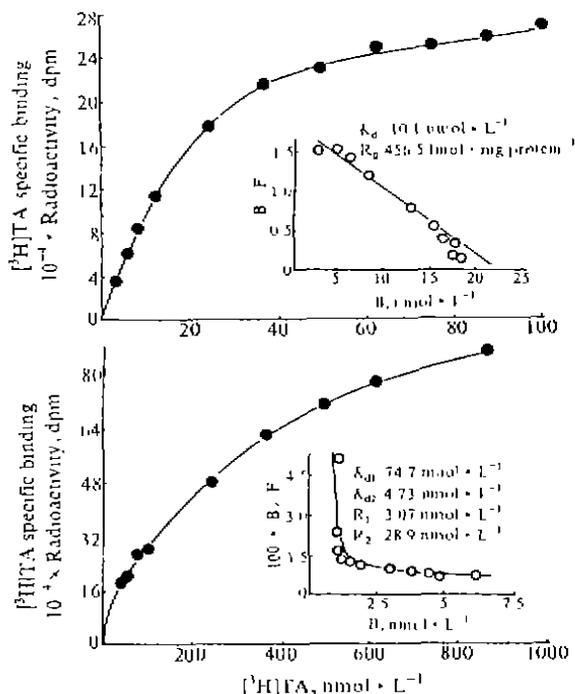


Fig 1. Scatchard plot (○) and binding curve (●) of $[^3\text{H}]\text{triamcinolone acetonide (TA)}$ of rat liver cytosol.

Tab 1. Specific binding of triamcinolone acetonide (TA) with rat liver cytosol. $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

	Pseudoscatthard analysis	Displacement analysis
K_{d1} , $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	22.8 ± 11.2	20.9 ± 7.8
K_{d2} , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4.1 ± 1.4	2.5 ± 2.2
R_1 , $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.3 ± 1.0	2.1 ± 1.7
R_2 , $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	32.3 ± 5.6	12 ± 12

Pseudoscatard 分析 结果(Tab 1)与 Scatchard 分析近似. 用 [³H]Dex-Dex 或 [³H]B-Dex 作配基, 同样测得大鼠肝胞液存在两类结合部位(Tab 2). 可见, LAGS 既可与人工合成的 GC 结合, 也可和天然 GC 结合.

Tab 2. Specific binding of [³H] dexamethasone and [³H]corticosterone with rat liver cytosol (pseudoscatard analysis).

	[³ H]dexamethasone	[³ H]corticosterone
K_{d1} , nmol · L ⁻¹	21.1	99.9
K_{d2} , μmol · L ⁻¹	1.1	4.7
R_1 , nmol · L ⁻¹	6.9	2.2
R_2 , nmol · L ⁻¹	17.2	36.9

置换曲线分析 结果与 Scatchard 分析近似(Tab 1).

2 大鼠脑胞液 [³H]Dex 特异结合 pseudoscatard 分析表明, 大鼠脑胞液存在高、低亲和力两类 GC 结合部位. 高亲和力结合部位的结合参数与经典 GC 受体相符, 低亲和力结合部位的结合参数为 K_d (2.1 ± 1.1) μmol · L⁻¹, R (1570 ± 634) fmol/mg 蛋白, ($n=4$), 与肝胞液 LAGS 在同一数量级.

3 大鼠胸腺细胞 [³H]Dex 特异结合 由 Fig 2 可见, Dex 达 50 nmol · L⁻¹ 时, 特异结合出现饱和趋势, 但超过此浓度时, 特异结合又有显著增加, pseudoscatard 分析表明, 10 nmol · L⁻¹–10 μmol · L⁻¹ 浓度范围内存在两类 GC 结合部位, 结合参数为 K_{d1} 4.5 ± 0.8 nmol · L⁻¹, K_{d2} 47.5 ± 13.0 μmol · L⁻¹, R_1 60 ± 31 fmol/10⁷ 细胞, R_2 36 ± 15 nmol/10⁷ 细胞($n=2$), 高亲和力结合部位的结合参数与经典 GC 受体⁽⁸⁾相符.

LAGS 的甾体特异性 置换曲线分析(Tab 3)表明: 高亲和力结合部位对 GC 亲和力最高, 醛固酮、孕酮次之, 性激素最低, 这和经典 GC 受体相符⁽⁹⁾. LAGS 与 [³H]TA 的结合能被 GC 受体的纯激动剂 RU 26988 及 GC 受体

拮抗剂 mifepristone 竞争性抑制, 且其亲和力在同一数量级, 醛固酮、雌二醇、孕酮、睾酮则无抑制作用.

GC 对大鼠胸腺细胞 [³H]UdR 参与的抑制的剂量效应关系以及 mifepristone 对其逆转作用在细胞悬液内加 Dex, 终浓度为 1 nmol · L⁻¹–10 μmol · L⁻¹, 测定 Dex 对 [³H]UdR 参入

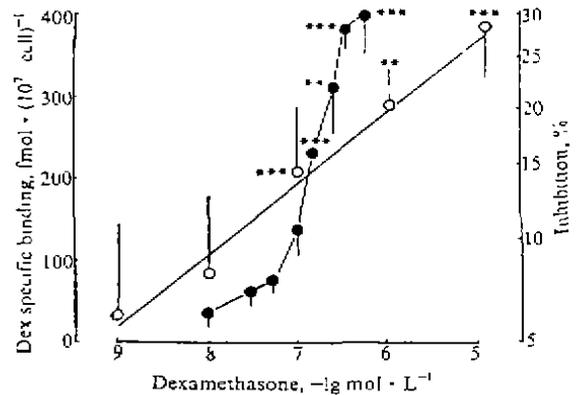


Fig 2. Specific binding of Dex (●, $n=2$) and Dex induced inhibition of [³H]UdR incorporation (○, $n=5$) of thymocytes of rat. $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs the specific binding of Dex 10 nmol · L⁻¹ or the inhibition of Dex 1 nmol · L⁻¹ on [³H]UdR incorporation.

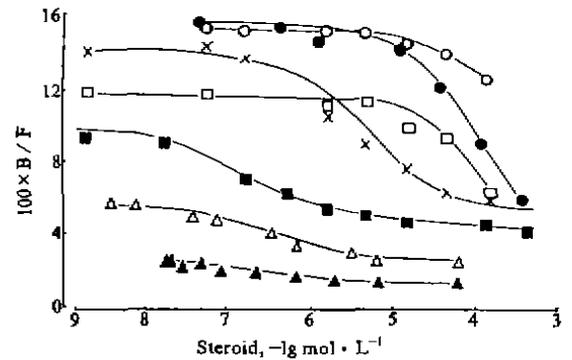


Fig 3. Displacement of [³H]TA from LAGS and glucocorticoid receptor by various steroid hormones. (○) testosterone, (●) estradiol, (×) aldosterone, (□) progesterone, (■) RU26988, (△) mifepristone, (▲) triamcinolone acetamide.

的影响, 结果(Fig 2)显示 Dex $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对参入即有抑制, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制率为 $28 \pm 5\%$ ($n=5$), 抑制作用呈 Dex 浓度依赖性, 抑制强度和 Dex 特异结合趋势一致. 以 mifepristone $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 研究其对 Dex $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 特异结合和抑制 $[^3\text{H}]\text{UdR}$ 参入作用影响 (根据 K_{d2} , R_2 值计算, Dex $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 特异结合大部分为 LAGS), 表明 (Tab 4) mifepristone 显著地抑制了 Dex 的特异结合, 拮抗了 Dex 效应.

Tab 3. Displacement of $[^3\text{H}]\text{triamcinolone acetonide}$ binding by various steroids in rat liver cytosol.

Steroids	K_{d1}	K_{d2}
Triamcinolone acetonide	$22.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Mifepristone	$26.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
RU 26988	$73.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Aldosterone	$0.27 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Undetected
Progesterone	$0.77 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Undetected
Estradiol	$81.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Undetected
Testosterone	$40.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Undetected

Tab 4. Mifepristone (RU-486) compete for specific binding with dexamethasone (Dex, $n=5$) and antagonize the inhibitory effects of Dex on $[^3\text{H}]\text{UdR}$ incorporation ($n=3$), $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs control.

Dex	RU-486	Dexamethasone specific binding ($\text{fmol} / 10^7 \text{ cell}$)	$[^3\text{H}]\text{UdR}$ incorporation ($\text{dpm} / 10^7 \text{ cell}$)
0	0		$90\ 540 \pm 10\ 284$
1	0	686 ± 193	$62\ 764 \pm 14\ 580^*$
1	10	$379 \pm 260^{**}$	$89\ 944 \pm 21\ 452^*$

DISCUSSION

有报道大鼠肝核膜及微粒体存在 LAGS^(3,10,11), 但它的甾体特异性, 与 GC 的亲合力与本文所描述的胞液 LAGS 完全不同, 并且不与曲安缩酮结合, 可见两者不是同一实体. 对 LAGS 的生理效应和病理意义, 也尚

未见进一步报道.

我们用 Scatchard 分析(包括 pseudoscat- chard 分析), 置换曲线分析首次证明大鼠肝细胞液、脑胞液、胸腺细胞都存在 GC 低亲和力结合部位. 用人工合成及天然糖皮质激素所得的结果相似, 说明 LAGS 并非只和人工合成激素的某些特殊基团结合. LAGS 的 K_d 小于白蛋白和 GC 结合的 K_d , 说明 LAGS 并非是血浆白蛋白与 GC 的非特异结合(部位).

因为 GC 与 GC 受体、LAGS、皮质类固醇结合球蛋白 (corticosteroid-binding globulin, CBG) 以及孕酮受体 (PR) 都能结合, 所以有必要搞清 LAGS 与 GC 受体、CBG 及 PR 之间的关系. LAGS 的 K_d 大于 CBG 与 GC 结合的 K_d , 且与 CBG 相反, 可与人工合成的 GC 结合. LAGS 不与孕酮结合, 且肝脏不表达 PR⁽¹²⁾, 因此, LAGS 不可能是 CBG 或 PR.

GC 高亲和力结合部位的结合参数及甾体特异性与文献报道⁽¹³⁾及本实验室⁽⁹⁾过去的结果近似, 说明是经典的 GC 受体. LAGS 与 $[^3\text{H}]\text{TA}$ 的结合能被 TA, mifepristone, RU 26988 竞争性抑制, 不能被醛固酮、雌二醇、孕酮、睾丸酮抑制, 说明 LAGS 与 GC 的亲合力最高, 它和 GC 的结合具有特异性. 推测 LAGS 和 GC 受体的激素结合中心分子结构相似, 但是否为同一分子的变构, 则有待进一步研究.

已有报道, 雌激素的低亲和力结合部位具有促进子宫生长的功能, 并且存在内源性配基⁽¹⁴⁾. 孕酮的低亲和力结合部位至少在雌性生殖周期的某些阶段发挥作用⁽¹⁵⁾.

本实验发现大鼠肝、脑、胸腺细胞存在 LAGS, GC 抑制胸腺细胞 $[^3\text{H}]\text{UdR}$ 参入的剂量-效应曲线在生理浓度及药理浓度范围内均和 GC 与胸腺细胞的特异结合趋势一致, Dex $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上述效应和特异结合均能被 GC 受体阻断剂 mifepristone 阻断, 此 Dex 浓

度比经典 GC 受体的 K_d 大 100 倍, 而与 LAGS 的 K_d 在同一数量级, 提示药理浓度 GC 引起效应, 除了通过 GC 受体介导外, 还由 LAGS 介导. 另外, 用 GC 治疗大鼠外伤性脑水肿, 小剂量无效, 但 GC 血浓度达 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则有效(待发表资料), 这也提示 LAGS 可介导药理浓度 GC 的效应.

生理情况下 LACS 是否有功能, 有什么功能, 都有待研究. 由于 LAGS 有可能为药理剂量 GC 的作用机制提供分子基础, 因此很可能具有重要意义.

REFERENCES

- 1 Lundberg D. The pharmacological basis of treatment with high dose corticosteroids in circulatory shock. *Acta Chir Scand* 1985; 526 (Suppl): S 7
- 2 Hellman A, Lundberg D. Hemodynamic effects of high doses of corticosteroids. *Acta Chir Scand* 1985; 526 (Suppl): S 13
- 3 Kaufmann SH, Shaper JH. Binding of dexamethasone to rat liver nuclei *in vivo* and *in vitro*: Evidence for two distinct binding sites. *J Steroid Biochem* 1984; 20: 699
- 4 Gurr JA, Potter VR. Independent induction of tyrosine aminotransferase activity by dexamethasone and glucagon in isolated rat liver parenchymal cells in suspension and in monolayer culture in serum-free media. *Exp Cell Res* 1980; 126: 237
- 5 Hirota K, Hirota T, Sanno Y, Tanaka T. Physicochemical characterization of a new glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1985; 843: 171
- 6 Xu RB, Tan JX. A Study of the glucocorticoid receptor of the cytosol and nuclei in nonlethally and lethally scalded rats. *Scl Sin [B]* 1986; 29: 265
- 7 Munson PJ, Rodbard D. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding system. *Anal Biochem* 1980; 107: 220
- 8 Homo F, Duval D, Hatzfeld J, Evrard C. Glucocorticoid sensitive and resistant cell populations in the mouse thymus. *J Steroid Biochem* 1980; 13: 135
- 9 Yang YL, Tan JX, Xu RB. Photoaffinity labeling of glucocorticoid receptor. *Acta Physiol Sin* 1988; 40: 414
- 10 Parchman LG, Cake MH, Litwack G. Functionality of the liver glucocorticoid receptor during the life cycle and development of a low-affinity membrane binding site. *Mech Ageing Dev* 1978; 7: 227
- 11 Chirino R, López A, Navarro D, Cabrera JJ, Rivero JF, Diaz-Chico BN. Steroid induction of low-affinity glucocorticoid binding sites in rat liver microsomes. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 97
- 12 Strahle U, Boshart M, Klock G, Stewart F, Schötz G. Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. *Nature* 1989; 339: 629
- 13 Mirós ME, Harrison RW. Characteristics of glucocorticoid binding to mouse liver cytosol. *J Steroid Biochem* 1979; 11: 1129
- 14 Markaverich BM, Clark JH. Type II binding sites: cellular origin and an endogenous ligand. In: Roy AK, Clark JH, eds. *Gene regulation by steroid hormones III*. NY: Springer-Verlag 1987: 50-64
- 15 Maggi A, Schröder WT, O'Malley BW. Progesterone-binding sites of the chick oviduct receptor. Presence of a weaker ligand site which is destroyed by phosphatase treatment. *J Biol Chem* 1984; 259: 10956