

· 论 著 ·

糖皮质激素对大鼠腹腔肥大细胞分泌组胺的快速抑制作用

刘 冲¹, 周 建¹, 崔瑞耀², 康志敏¹, 彭兆云¹, 蒋春雷^{1*}

(1. 第二军医大学海军医学系航海医学教研室, 上海 200433; 2. 青岛大学医学院病理生理学教研室, 青岛 266012)

[摘要] 目的: 分析糖皮质激素对大鼠腹腔肥大细胞分泌组胺的快速抑制作用。方法: 采用荧光分光光度法测定邻苯二甲醛与组胺在碱性条件下生成的荧光物质, 检测不同条件下大鼠腹腔肥大细胞分泌的组胺。结果: (1) 用 10^{-7} mol/L 皮质酮预处理细胞 7 min 后, 肥大细胞分泌组胺即受到抑制 ($P < 0.05$); (2) 牛血清白蛋白偶联的皮质酮 (B-BSA) 可以模拟皮质酮的快速抑制作用; (3) 糖皮质激素细胞内受体拮抗剂 RU₃₈₄₈₆ 对皮质酮的快速抑制作用无阻断效应; (4) 蛋白质合成抑制剂放线菌酮预处理细胞 3 h 后, 皮质酮仍可快速抑制肥大细胞分泌组胺。结论: 皮质酮对大鼠腹腔肥大细胞分泌组胺具有快速抑制作用, 这一作用不直接依赖于细胞内蛋白质合成, 也不依赖于细胞内的糖皮质激素受体。此种快速抑制作用属非基因组机制。

[关键词] 糖皮质激素; 皮质醇; 肥大细胞; 组胺; 非基因组机制

[中图分类号] R 562.25; R 977.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004) 09-0974-03

Rapid inhibitory effects of glucocorticoids on histamine secretion from rat peritoneal mast cells

L U Chong¹, ZHOU Jian¹, CU IRui-Yao², KANG Zhi-M in¹, PEN G Zhao-Yun¹, J IAN G Chun-Lei¹ (1. Department of Nautical Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology and Physiology, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266012)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the rapid inhibitory effect of glucocorticoids on histamine secretion induced by ovalbumin from rat peritoneal mast cells (RPMCs). **Methods:** Fluorometric assay was used to measure histamine secretion from RPMC under various conditions. **Results:** When the cells were preincubated at 37 °C, 5% CO₂ for 7 min in the presence of various concentrations of corticosterone and stimulated with ovalbumin, an inhibitory effect on histamine secretion was observed at 10^{-7} mol/L corticosterone. Bovine serum albumin-conjugated corticosterone (B-BSA) imitated the rapid inhibitory effect of corticosterone on histamine secretion. The rapid inhibitory effect of corticosterone and B-BSA was not antagonized by RU₃₈₄₈₆. Actidione, a protein synthesis inhibitor, had no influence on the rapid inhibitory effect of corticosterone. **Conclusion:** Corticosterone has rapid inhibitory effect on histamine secretion in RPMC, and the effect neither directly depend on the synthesis of protein nor on the receptor of corticosterone within RPMC. It is suggested that corticosterone inhibits the histamine secretion from the RPMC through a nongenomic mechanism.

[KEY WORDS] glucocorticoids; corticosterone; mast cells; histamine; nongenomic mechanism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 974-976]

* 1942年, Selye等^[1]在研究中发现某些类固醇激素在应用后几分钟即可产生非基因组作用。此后, 研究者注意到类固醇激素的这种快速作用存在于机体的多种组织与细胞, 并提出了膜受体假说。我们曾报道吸入糖皮质激素可以快速抑制卵蛋白诱发的豚鼠速发性哮喘反应^[2,3], 但其快速抑制效应的机制还不清楚。本研究以大鼠腹腔肥大细胞为实验模型, 观察糖皮质激素可以通过非基因组机制快速抑制组胺分泌, 为糖皮质激素快速抑制哮喘症状提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂 皮质酮 (corticosterone 21-sulfate, Cort)、牛血清白蛋白耦联的皮质酮 (corticosterone 21-hemissuccinate, B-BSA)、RU₃₈₄₈₆ (RU)、卵蛋白

(ovalbumin, OVA, Grade V)、组胺二磷酸盐均购自 Sigma 公司; 放线菌酮 (actidione, ATD)、邻苯二甲醛 (phthalaldehyde) 购自 Fluka 公司; Percoll 分离液购自 Pharmacia 公司; Ham F10 购自 Gibco 公司; 氢氧化铝凝胶和百日咳杆菌疫苗购自上海生化制品研究所, 其余试剂均为国产分析纯级。

1.2 动物致敏 雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 由上海西普尔必凯公司提供。大鼠颈背部皮下注射卵蛋白氢氧化铝凝胶溶液 1 ml/只, 其中卵蛋白 5 mg 和氢氧化铝 3.975 mg, 同时腹腔注射灭活百

* [基金项目] 国家重点基础研究规划 (“973 计划”) 课题 (G1999054003)。

[作者简介] 刘 冲 (1975-), 女 (汉族), 硕士生
E-mail: liuchongk919@sohu.com

* Corresponding author. E-mail: jiangck@online.sh.cn

日咳杆菌 2×10^{10} 个, 10 d 后加强 1 次。致敏 25 d 后动物乙醚麻醉, 无菌操作进行股动脉取血, 收集血液, 室温放置 4 h, 移入 4 ℃ 冰箱过夜, 待血清充分析出后吸取上清, 4 000 r/min, 离心 10 min, 收集上清, 过滤除菌后立即使用或 -70 ℃ 冰箱保存备用。

1.3 大鼠腹腔肥大细胞 (rat peritoneal mast cells, RPMC) 的收集与分离 采用 Anna 等^[4]的方法略加修改, 正常动物断头放血处死, 用预冷的 PBS (含 1% FCS) 15 ml 腹腔注射, 轻轻按摩腹部 2 min, 打开腹腔, 吸取腹腔冲洗液入 8 孔细胞培养板, 置于 37 ℃ 温箱静置 30 min, 待巨噬细胞附壁后轻轻吸取细胞悬液, 4 ℃, 1 500 r/min 离心 10 min, 调节细胞悬液约 0.5 ml, 7 ml P-F10 (Percoll-HamF10) 在 4 ℃, 17 000 × g, 离心 20 min 形成梯度, 将浓缩的细胞悬液轻轻铺入梯度之上, 4 ℃, 450 × g 水平转头离心 15 min 分离细胞, 收集界面下 1/3 细胞, 用 PBS 洗涤 2 次 (1 000 r/min, 离心 10 min) 后重悬, 锥虫蓝染色细胞活力大于 90%, 甲苯胺蓝染色细胞纯度 95% 以上, 调节细胞密度约 10^6 /ml, 置于含 1% FCS 的 PBS 中待用。

1.4 RPMC 的体外致敏与激发 将肥大细胞与含 IgE 的抗血清混合 (1:1), 置于 37 ℃, 5% CO₂ 孵箱中孵育 3 h, 每管约含 RPMCs 5×10^4 个, 用含 1% FCS 的 PBS 轻轻洗涤 2 次, 去除未结合的血清。PBS 重悬后反应组加入各种浓度的 Cort 或 B-BSA, 置入 37 ℃ 温箱孵育 7 min, 取出后立即加入卵蛋白 (0.2 mg/ml) 反应 8 min, 置入冰水浴中 5 min 终止反应, 对照组以 PBS 取代药物, 将各管以 4 ℃, 400 × g 离心 10 min, 分别测定上清和细胞内的组胺。

1.5 组胺分泌率的测定 采用 Shore 等的荧光法略加修改^[5], 将上清与细胞内分别加入 25% 三氯乙酸, 离心取上清 1 ml 加入 0.5 ml NaOH (0.4 mol/L), 立即加入 0.1% 邻苯二甲醛 0.1 ml, 混匀, 25 ℃ 反应 9 min, 加入 0.5 ml HCl (0.1 mol/L) 终止反应。在荧光分光光度计比色 (激发波长 λ_{ex} 360 nm, 发射波长 λ_{em} 460 nm), 细胞用 1 ml PBS 重悬, 加热煮沸 1 min, 测定细胞裂解液的组胺含量 [组胺释放率 = 上清内组胺 / (细胞内组胺 + 上清内组胺) × 100%]。配制组胺标准溶液, 做出标准曲线。组胺自发释放率不到 3%, 计算时均减去。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 *t* 检验。

2 结果

2.1 皮质酮和 B-BSA 对 OVA 激发大鼠 RPMCs 分泌组胺的影响 使用皮质酮处理细胞 7 min, 然

后给予 OVA 激发, 在皮质酮与 OVA 共同作用 8 min 后测定组胺分泌率, 结果在 10^{-7} mol/L 时皮质酮即可抑制组胺分泌 [(23.01 ± 1.11) vs (25.38 ± 1.15), $P < 0.05$], 抑制率为 9.34%; 当浓度为 10^{-6} mol/L 时 [(22.00 ± 1.02) vs (25.38 ± 1.15), $P < 0.01$], 抑制率为 13.32%; 浓度 10^{-8} mol/L 时, 皮质酮则不抑制 RPMCs 分泌组胺。

用 B-BSA 处理细胞 7 min 后给予 OVA 激发, B-BSA 可以模拟皮质酮对组胺分泌的快速抑制作用。 10^{-7} mol/L 时抑制率为 9.37% [(22.53 ± 1.01) vs (24.86 ± 1.02), $P < 0.05$], 当浓度为 10^{-6} mol/L 时抑制率为 13.52% [(21.50 ± 1.20) vs (24.86 ± 1.02), $P < 0.01$]; 浓度 10^{-8} mol/L 时, B-BSA 不抑制 RPMCs 分泌组胺。

2.2 RU₃₈₄₈₆ 和 ATI 对皮质酮和 B-BSA 快速抑制作用的影响 细胞先用 RU₃₈₄₈₆ (10^{-6} mol/L) 处理 5 min, 再用皮质酮或 B-BSA (10^{-7} mol/L) 处理 7 min, 然后给予 OVA 激发。RU₃₈₄₈₆ 不能阻断皮质酮和 B-BSA 对组胺分泌的快速抑制作用。用 10^{-6} mol/L ATI 预孵育细胞 3 h, 再用皮质酮或 B-BSA (10^{-7} mol/L) 处理细胞 7 min, 然后给予 OVA 激发, 使用 ATI 预处理细胞 3 h 后, 皮质酮和 B-BSA 仍可抑制组胺分泌 (表 1)。

表 1 RU₃₈₄₈₆, ATI 对皮质酮及 B-BSA 对 OVA 诱导的 RPMCs 分泌组胺的影响

Tab 1 Influence of RU₃₈₄₈₆ and ATI on inhibitory effects of Cort and B-BSA on histamine release from RPMC induced by OVA

Drug	Histamine release ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)
Control	25.38 ± 1.15
Cort (10^{-7} mol/L)	23.01 ± 1.11*
RU (10^{-6} mol/L)	24.70 ± 1.02
Cort (10^{-7} mol/L) + RU (10^{-6} mol/L)	23.53 ± 1.26*
B-BSA (10^{-7} mol/L) + RU (10^{-6} mol/L)	22.73 ± 1.02*
ATI (10^{-6} mol/L)	24.86 ± 1.01
Cort (10^{-7} mol/L) + ATI (10^{-6} mol/L)	23.59 ± 1.21*
B-BSA (10^{-7} mol/L) + ATI (10^{-6} mol/L)	22.77 ± 1.24*

* $P < 0.05$ vs control group; Cort: Corticosterone 21-sulfate; RU: RU₃₈₄₈₆; B-BSA: Corticosterone 21-hemisuccinate; ATI: Acetimidine

3 讨论

由于不同批次的细胞活性、纯度等因素可能对组胺分泌带来影响, 每批细胞在实验时都设有自发分泌组和卵蛋白激发组作对照。乙醇具有脂溶性, 当

它嵌入膜脂双分子层中时可能非特异地干扰细胞膜的结构和功能^[6]。本实验设立了乙醇溶剂对照组未见其有抑制作用,提示皮质酮的这种快速作用并不是由溶剂引起的。

传统的基因组理论在解释类固醇激素的某些快速作用时遇到了困难,研究者结合已取得的实验数据提出了糖皮质激素膜受体假说,并引入了非基因组机制这一术语^[7,8]。判断类固醇激素引起的生物效应是否通过非基因组机制,一般有如下几个方面:

(1) 起效时间短,激素应用后数秒至数分钟出现效应; (2) 作用不能被转录和蛋白合成抑制剂阻断(如放线菌素D和放线菌酮),也不能被糖皮质激素胞内受体拮抗剂阻断; (3) 激素与大分子物质(如BSA)偶联后不能进入细胞,但仍能发挥其快速作用。

研究发现,皮质酮在15 min内可以抑制肥大细胞分泌组胺,在这么短时间内引起的生物应用基因组机制是无法解释的,因而可能是通过非基因组机制实现的。此外,B-BSA可以模拟皮质酮的抑制效应,将BSA用荧光物质标记后孵育细胞,30 min后在细胞内检测不到荧光,表明BSA没有进入细胞而被阻在细胞膜外面^[9]。利用这一现象,在进行类固醇激素快速效应的研究时一般都认为与BSA结合后在几分钟内仍能发挥作用的类固醇激素,是通过细胞膜介导产生的生物效应^[6,10]。因此,B-BSA可以在15 min内抑制肥大细胞分泌组胺,提示皮质酮的快速作用是由细胞膜介导,也表明皮质酮的快速抑制效应为非基因组机制。

RU₃₈₄₈₆为糖皮质激素的细胞内受体拮抗剂,单独用RU₃₈₄₈₆处理细胞5 min后给予卵蛋白激发,并不影响组胺的分泌;当加入皮质酮或B-BSA,然后给予卵蛋白激发,15 min内组胺分泌和不使用RU₃₈₄₈₆无统计学差异,说明RU₃₈₄₈₆对皮质酮快速抑制组胺分泌的作用没有阻断效应。

类固醇激素基因组机制的主要特征之一是通过调节基因表达影响蛋白质合成进而发挥生理效应。当单独使用蛋白质合成抑制剂ATI处理细胞3 h后给予卵蛋白激发,组胺分泌与不给ATI时相比并无差别;在加入皮质酮或B-BSA后给予卵蛋白激发,皮质酮仍能产生快速抑制作用,说明此过程不直

接依赖蛋白质的合成,从另一个角度说明皮质酮快速抑制大鼠腹腔肥大细胞分泌组胺的生物效应属非基因组机制。

综上所述,本实验从不同侧面提示糖皮质激素快速抑制组胺分泌的生物效应属非基因组机制,可以解释糖皮质激素为何能够快速抑制哮喘反应的症状。此外,大鼠在应激状态下血浆游离皮质酮浓度可达 $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ^[11],在本实验中当皮质酮浓度在 10^{-7} mol/L 时,即可对大鼠腹腔肥大细胞分泌组胺产生抑制作用,所以本实验结果是具有生理意义的。

[参考文献]

- [1] Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(1): 46-55.
- [2] Zhou J, Kang ZM, Xie QM, et al. Rapid nongenomic effects of glucocorticoids on allergic asthma reaction in the guinea pig [J]. *J Endocrinol*, 2003, 177(1): R1-R7.
- [3] Zhou J, Kang ZM, Xie QM, et al. Rapid effect of inhaled glucocorticoids on immediate asthma reaction in guinea pigs [J]. *Difer Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2003, 24(3): 291-294.
- [4] Nemeth A, Rohlich P. Rapid separation of rat peritoneal mast cells with Percoll [J]. *Eur J Cell Biol*, 1980, 20(3): 272-275.
- [5] 向军俭, 陈华粹. 组胺的荧光测定法的研究 [J]. *中国医学科学院学报*, 1981, 3(3): 183-187.
- [6] Duval D, Durant S, Homo-Delarche F. Nongenomic effects of steroid: interactions of steroid molecules with membrane structures and functions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 737(3-4): 409-442.
- [7] Hua SY, Chen YZ. Membrane-receptor mediated electrophysiological effects glucocorticoid on mammalian neurons [J]. *Endocrinology*, 1989, 124(2): 687-691.
- [8] Chen YZ, Hua SY. Effects of glucocorticoids on electrical activities of mammalian sympathetic ganglion cells *in vitro* [J]. *Neuroscience*, 1987(Supp122): 1008.
- [9] Blackmore P, Lattanzio F. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 1991, 181(1): 743-760.
- [10] Gorczyńska E, Handelsman DJ. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in the sertoli cells [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(5): 2052-2059.
- [11] Yeh KY. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats parallel changes after induced stress [J]. *Endocrinology*, 1984, 115(4): 1364-1370.

[收稿日期] 2004-01-08

[修回日期] 2004-06-02

[本文编辑] 尹 茶