



睾酮对人单核细胞雄激素受体蛋白表达的影响

多种老年性疾病和自身免疫性疾病均伴有性激素水平异常, 早期研究发现性激素可影响免疫系统的B细胞生成和胸腺T细胞的发育[1]。近来有人在外周血白细胞及滑膜积液中的巨噬细胞中均发现有雄激素受体(androge ne receptor, AR)存在[2][3], 说明免疫系统也是性激素的靶器官。单核巨噬细胞系统(monuclearphagocyte system, MPS)的功能长期以来被认为主要是参与非特异性免疫防御及特异性免疫应答, 合成与分泌细胞因子, 调控炎症、免疫反应及凝血等过程, 并且在动脉粥样硬化(arteriosclerosis, AS)形成过程中, 局部斑块周围存在单核巨噬细胞和淋巴细胞浸润, 吞噬脂质的单核/巨噬细胞是AS泡沫细胞的重要来源。血液中的单核细胞是否存在AR? 睾酮的浓度对它的表达量有何影响? 为此, 我们通过特异性抗体检测了不同浓度睾酮对人单核细胞株THP-1中AR蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人单核细胞株THP-1由中科院上海细胞所提供。睾酮和氟他胺为美国Sigma公司产品, 无酚红1640培养基(Hyclone公司), 胎牛血清(杭州四季青公司产品), 兔抗大鼠及人的AR多克隆抗体、ECL显色试剂盒(sants crus公司), 辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗(武汉博士德公司), PVDF膜(Boehringer Mannheim公司)。

1.2 THP-1细胞的培养及条件培养液的制备

THP-1细胞用含10%胎牛血清的1640培养液, 于37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养。每日传代1~2瓶, 实验前改换为无血清的1640培养基静置12 h后, 倒掉培养基, 加入含有睾酮(T)或氟他胺(F)的无血清1640培养基, 据文献报道[4]调整其终浓度(单位: mol/L)为T₅(10⁻⁵)、T₆(10⁻⁶)、T₇(10⁻⁷)、T₈(10⁻⁸)、T₉(10⁻⁹)、F₅(10⁻⁵)、T₇+ F₅和空白对照组(只加1640培养基)刺激, 分别观察12、24 h AR的蛋白表达量。

1.3 Western blotting

经上述处理后在相应时间搜集细胞, 冰PBS洗两遍, 加入预冷的细胞裂解液, 4 °C裂解细胞15 min, 低温离心12 000 g 10 min, 取上清, 蛋白浓度的测定采用Bradford法。取总蛋白80 μg, 加入等体积的上样缓冲液, 100 °C煮沸3~5 min, 7% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白(上胶电压60 V, 下胶电压120 V)。电泳结束后, 将蛋白转印到PVDF膜上(100 V, 3 h), 再用含5%脱脂奶粉的T-TBS室温下封闭60 min, 加入用T-TBS稀释好的AR I 抗(1:500)室温振荡2 h, T-TBS 200 ml洗膜3次×15 min, 结合辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗(1:15 000)孵育1 h, T-TBS 200 ml洗15 min, 3~5次。此后按ECL显色试剂盒说明书操作, 曝光后X光片用光密度图像扫描系统进行光密度分析。

1.4 统计学处理

经光密度分析, 用面积×光密度代表表达量, 以对照组表达量值为100%, 其它各组值与对照组表达量的值进行比较, 得出相对光密度值(OD), 数据处理采用SPSS10.0统计软件, 组间比较用单因素方差分析(One way ANOVA), 多重比较采用LSD(由于组间方差不齐采用Tamhane T₂)方法。

2 结果

免疫印迹结果(图1、2)显示,人的单核/巨噬细胞中存在AR。统计软件分析组间AR表达量具有显著性差异($F=13.23, P<0.001$)。在刺激12 h后,睾酮浓度为 $10^{-9}\sim 10^{-8}$ mol/L的2组之间存在显著差异($P<0.05$),刺激24 h后睾酮浓度为 $10^{-9}\sim 10^{-7}$ mol/L的3组之间均存在显著差异($P<0.05$),AR表达量随睾酮浓度的增加而减少,而睾酮浓度增至 10^{-7} mol/L至 10^{-5} mol/L之间AR的表达量无明显差异($P>0.05$)。单纯给予雄激素拮抗剂氟他胺(10^{-5} mol/L)和同时给予 10^{-7} mol/L睾酮组与对照组比较,AR的表达量均无明显差异($P>0.05$),而明显高于单纯用睾酮刺激的各组($P<0.05$)。24 h 10^{-7} mol/L的睾酮刺激AR蛋白的表达量较12 h减少明显($P=0.034$),可能有一定的时间依赖性。其余各浓度刺激两时间点之间无明显变化($P>0.05$) (表1)。

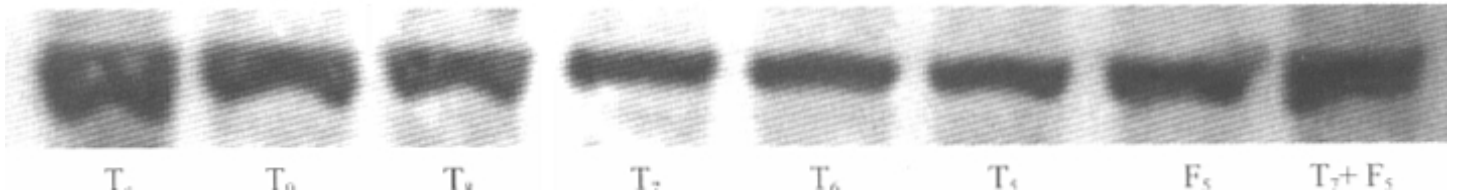


图1 Western blotting检测睾酮刺激24 h后AR的蛋白表达

Fig.1 Western blotting for AR protein in THP-1 cells 24 h after testosterone treatment

Tc: Control; T_9 - T_5 : Treatment with testosterone from 10^{-9} to 10^{-5} mol/L; F_5 : Treatment with 10^{-5} mol/L flutamide; T_7 + F_5 : Treatment with 10^{-7} mol/L testosterone and 10^{-5} mol/L flutamide

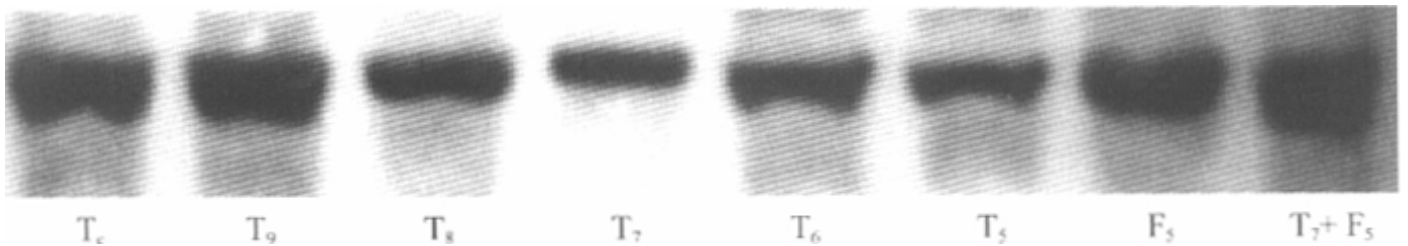


图2 Western blotting检测睾酮刺激12 h后AR的蛋白表达

Fig.2 Western blotting for AR protein in THP-1 cells 12 h after testosterone treatment

Tc: Control; T_9 - T_5 : Treatment with testosterone from 10^{-9} to 10^{-5} mol/L; F_5 : Treatment with 10^{-5} mol/L flutamide; T_7 + F_5 : Treatment with 10^{-7} mol/L testosterone and 10^{-5} mol/L flutamide

表 1 AR 的蛋白表达量($n=3, \bar{x} \pm s$)Tab.1 Expression of androgen receptor in THP-1 cells ($n=3, Mean \pm SD$)

Group	12 h	24 h
Control	100*	100
T ₉	84.73±8.27 ^{▲▲}	82.00±4.66 ^{▲▲▲}
T ₈	72.47±3.14 ^{▲▲}	72.05±7.95 ^{▲▲}
T ₇	68.43±15.42 ^{▲▲}	56.07±4.13 ^{▲▲}
T ₆	62.86±9.5 ^{▲▲}	58.38±7.25 ^{▲▲}
T ₅	64.85±12.02 ^{▲▲}	54.72±4.16 ^{▲▲}
T ₇ +F ₅	105.82±3.1 ^{**}	95.96±11.89 ^{**}
F ₅	104.33±6.5 ^{**}	106.67±5.75 ^{**}

T: Testosterone; F: Flutamide; [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.001$ vs T₇ group

3 讨论

在衰老过程中, 性激素水平与免疫功能的关系成为研究热点。许多老年疾病和自身免疫性疾病如高血压、动脉硬化、骨质疏松、类风湿、系统性红斑狼疮等的发病率存在明显性别差异。性激素作为类固醇激素的一种, 早期研究发现主要通过调节胸腺大小及T细胞的发育、骨髓B细胞生成等中枢免疫器官来影响免疫系统[5][6], 近来发现它也可影响许多非胸腺淋巴器官, 包括中枢神经系统、单核-巨噬细胞系统及骨骼肌肉系统等。

性激素发挥作用主要是通过其激素受体, 睾酮可以扩散进入靶组织和非靶组织, 但它只在雄激素受体存在的靶组织细胞中行使其生物学功能。雄激素主要通过与其受体结合这一经典的途径而发挥作用, 其受体是依赖于配基转录因子的超家族核受体。AR在胞浆中能与热休克蛋白结合, 当与雄激素结合后即被激活, 热休克蛋白解离, AR便能进入核内识别靶基因上专一的DNA序列并与之结合, 从而调控该基因的转录。雄激素受体的转录激活功能是由核受体辅助激活因子或P160介导的, 这些辅助因子通过与次级辅助因子作用催化组蛋白乙酰化和甲基化而修饰染色质的结构[7], 促进RNA聚合酶II转录起始复合物与启动子结合, 激活基因转录, 表达新的蛋白质, 最终使得细胞的功能发生改变。

生殖系统是雄激素最主要的靶器官, 但在心脏、血管、神经、肌肉、骨骼等多个系统中均发现了AR, 我们的实验结果显示在单核巨噬细胞系统中也存在雄激素受体, 而且发现其蛋白表达量在一定范围内受睾酮浓度的调节, 存在着一定的剂量、时间依赖性。随睾酮浓度的增加, AR的表达量逐渐减少, 说明单核细胞自身对其AR表达存在着一定的负反馈调节, 这也是类固醇激素非常普遍的调节方式。单纯给予雄激素受体拮抗剂氟他胺(10^{-5} mol/L)和氟他胺与睾酮同时刺激对THP-1中AR的表达均无影响, 可能是由于我们在给刺激时所用的培养基是无血清培养基, 其中不含有其它激素成份, 也说明氟他胺是通过拮抗睾酮来发挥作用, 和 10^{-7} mol/L睾酮合用时能阻断雄激素的作用。在 10^{-7} mol/L睾酮组, AR蛋白表达量在24 h较12 h减少, 说明睾酮浓度的调节在时间上也可能存在一定的依赖性。但是, 由于THP-1细胞是来源于1岁男童的外周血, 而睾酮作为一种雄性激素, 它在不同的性别、不同年龄的阶段中可能存在不同的调节方式。而且作为一种细胞株, 它在

受体调节方面同人的外周血单核细胞间可能也存在差异。

近来研究发现睾酮不单是通过细胞内受体的经典途径发挥作用,而且它还可以通过细胞膜上的受体经非基因组效应起作用[8],本实验没有对细胞膜上的受体进行检测,不能完全反应睾酮对雄激素受体的影响情况。这些问题将有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Agostino P, Milano S, Barbera C, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 87(6): 426-9.
- [2] 邹俊杰, 刘志民, 商权. 人外周血白细胞雄激素受体基因表达的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 635-7.
- Zou JJ, Liu ZM, Shang Q. Investigation of androgen receptor gene expression in human peripheral leukocytes Acad[J]. *J Sec Mil Med Univ*, 2001, 22(7): 635-7.
- [3] Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(2): 820-7.
- [4] Liu J, Wu S, Wei H, et al. Effects of sex hormones and their balance on the proliferation of rat vascular endothelial cells[J]. *Horm Res*, 2002, 58(1):16-20.
- [5] Smithson G, Couse JF, Lubahn DB, et al. The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1): 27-34.
- [6] Olsen NJ, Kovacs WJ. Effects of androgens on T and B lymphocyte development[J]. *Immunol Res*, 2001, 23(2-3): 281-8.
- [7] Chen D, Ma H, Hong H, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase[J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2174-77.
- [8] Benten WP, Becker A, Schmitt-Wrede HP, et al. Developmental regulation of intracellular and surface androgen receptors in T cells[J]. *Steroids*, 2002, 67(11): 925-31.

参考文献:

- [1] Agostino P, Milano S, Barbera C, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 87(6): 426-9.
- [2] 邹俊杰, 刘志民, 商权. 人外周血白细胞雄激素受体基因表达的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 635-7.
- Zou JJ, Liu ZM, Shang Q. Investigation of androgen receptor gene expression in human peripheral leukocytes Acad[J]. *J Sec Mil Med Univ*, 2001, 22(7): 635-7.
- [3] Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(2): 820-7.
- [4] Liu J, Wu S, Wei H, et al. Effects of sex hormones and their balance on the proliferation of rat vascular endothelial cells[J]. *Horm Res*, 2002, 58(1):16-20.
- [5] Smithson G, Couse JF, Lubahn DB, et al. The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1): 27-34.
- [6] Olsen NJ, Kovacs WJ. Effects of androgens on T and B lymphocyte development[J]. *Immunol Res*, 2001, 23(2-3): 281-8.

[7] Chen D, Ma H, Hong H, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase[J]. Science, 1999, 284(5423): 2174-77.

[8] Benten WP, Becker A, Schmitt-Wrede HP, et al. Developmental regulation of intracellular and surface androgen receptors in T cells[J]. Steroids, 2002, 67(11): 925-31.

[回结果列表](#)