

对废用性肌萎缩及其康复过程中肝细胞雄激素受体表达的研究

刘颖 华桂茹

【摘要】目的 研究在废用性肌萎缩及其康复过程中大鼠肝细胞雄激素受体 (androgen receptor, AR) 阳性率的变化,探讨 AR 在肝细胞中的定位及运动对肝组织 AR 表达的影响。**方法** 将大鼠随机分为对照组、即刻处死组、自然康复组、跑台训练组及游泳训练组,除对照组外,其余各组均行石膏固定。固定结束后,各组给予相应的康复措施。采用免疫组织化学分析法测定肝细胞中 AR 的定位及阳性率。**结果** AR 阳性细胞主要为核着色,即刻处死组的 AR 阳性率显著下降,其它各组间差异均无显著性意义。**结论** AR 主要是一种核受体,通过核机制发挥作用,运动对肝组织 AR 表达的影响不大,而制动可减少肝组织中 AR 的含量,推测雄激素对肝组织的 AR 具有正相调节作用。

【关键词】 雄激素受体; 肝脏; 免疫组织化学分析法; 雄激素; 萎缩

Expression of androgen receptor in hepatic cells during disuse of skeletal muscle and rehabilitative exercise

LIU Ying, HUA Guiru. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Peking Union Hospital, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes of positive ratio of androgen receptor (AR) in hepatic cells during the disuse of skeletal muscle and rehabilitative exercise in rats and to discuss the location of AR in hepatic cells and the effect of exercise on expression of AR in hepatic tissues. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomized into 5 groups; normal control, immobilization, immobilization plus natural recovery, immobilization plus treadmill exercise, immobilization plus swimming exercise. Immobilization was exerted on the hindlimb of the animals and lasted for 3 weeks. Then 3 weeks of natural recovery or exercise was followed before the sacrifice of the rats for AR test. The location and the positive ratio of AR was determined by immunohistochemical assay. **Results** It was observed that the positive cells were mostly nucleus-stained; and the positive ratio of AR in hepatic cells in rats after immobilization decreased significantly, but there was no significant difference between other groups. **Conclusion** The findings of this study suggested AR was largely a kind of nucleus receptor. The effect of exercise on expression of AR in hepatic tissues seemed insignificant and immobilization could reduce the content of AR in hepatic tissues, indicating that androgen had a positive regulation effect on the AR in hepatic tissues.

【Key words】 Androgen receptor; Liver; Immunohistochemical assay; Androgen; Atrophy

骨骼肌的废用性萎缩是康复医学临床工作中经常遇到的问题^[1,2]。它以肌肉蛋白合成代谢减弱,分解代谢增强为主要特征^[3],而肌肉蛋白的同化作用与机体雄激素及其受体水平密切相关^[4]。运用组织学、组织化学、生物化学及分子生物学等手段,观察细胞内的雄激素受体 (androgen receptor, AR) 变化,尤其是在运动训练后的变化,具有重要价值。但有关肌萎缩及经不同方法治疗后,AR 在组织细胞内的定位目前鲜有报道。本文拟通过应用雄激素受体蛋白单克隆抗体免疫组化法观察 AR 在肝细胞中的分布情况,探讨 AR 在细胞内的作用机制,为废用性肌萎缩的康复提供更多的临床理论依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

6 月龄雄性 SD 大鼠 30 只,体重 (241.67 ± 11.89) g,将其随机分为 5 组,每组各 6 只。除正常对照组 (A 组) 继续饲养 6 周后处死外,其余大鼠均按每公斤体重 40 mg 2% 戊巴比妥钠麻醉成功后,行右后肢管型石膏固定 3 周。整个固定过程中,使膝关节屈曲 120 ~ 135°,髋关节置于伸展位。固定结束后,将大鼠分为以下几组:即刻处死组 (B 组),自然康复组 (C 组)、跑台训练组 (D 组) 和游泳训练组 (E 组)。B 组大鼠立即处死, C 组大鼠自然恢复 3 周, D、E 组大鼠则经过 3 周康复训练后全部处死。

二、康复训练方法

D 组、E 组解除固定后休息 5 d,再分别进行为期 3

周的跑台和游泳训练,以 7 d 为一训练周期,每周训练 5 次,每天 1 次。跑台训练组每次训练时间为 60 min,跑速及跑台坡度缓慢递增,第 1 周跑速为 11 m/min,坡度为 0%;第 2 周为 11 m/min,坡度为 5%;第 3 周为 15 m/min,坡度为 5%。游泳训练组每次训练时间依周递增,第 1 周为每次 30 min,第 2 周为每次 60 min,第 3 周为每次 90 min。游泳池水深 0.75 m,水温保持在 32~36℃。

三、免疫组织化学染色法

按常规 ABC 染色方法进行。将各组大鼠以每公斤体重 40 mg 2% 戊巴比妥钠麻醉后取其肝组织,将标本置于 10% 中性福尔马林(pH 7.4)固定液中固定 6~8 h,于 20% 蔗糖缓冲液内过夜,次日以熔点为 51~52℃ 的石蜡包埋,制成 5 μm 厚的连续切片,将切片裱于经 APES 防脱片剂处理过的载玻片上。石蜡切片经脱水后入 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中浸洗,再经 0.3% 甲醇 H₂O₂ 孵育 30 min,除去内源性过氧化物酶。第一抗体采用北京市肿瘤研究所自制的小鼠抗人 AR 的单克隆抗体,第二抗体采用生物素标记的马抗小鼠 IgG 抗体,购自美国 Vector 公司。小鼠抗人 AR 的单克隆抗体的稀释度为 1:100,在 4℃ 冰箱内孵育 24 h。生物素标记的马抗小鼠 IgG 抗体的稀释度为 1:500,ABC 复合物的稀释度为 1:1 000,在 37℃ 下孵育时间分别为 1 h 和 30 min,以上各步骤之间均用 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,最后用 DAB 显色 10 min,苏木精复染核,脱水透明,中性树胶封片。用 PBS 替代一抗作阴性对照。标本用 Olympus BHS 显微镜观察并摄片。

四、评定方法

如肝细胞中的胞核或胞浆中出现棕黄色颗粒沉着,则视为 AR 阳性细胞。每只大鼠计数 5 张肝组织切片,每张切片均在显微镜下随机选取 5 个独立高倍镜视野(×200),计数其中阳性细胞数,取其平均值。

五、统计学处理

所得结果采用($\bar{x} \pm s$)表示,率的比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、AR 在肝细胞的表达

实验结果显示:AR 阳性信号主要位于肝细胞的细胞核内,颗粒较密集,着色较深。AR 阳性细胞的胞浆中也有少量散在的生物素标记颗粒存在,但分布不均匀,着色较淡,表明 AR 主要为细胞核表达。

二、各组肝细胞的 AR 阳性率

A~E 5 组大鼠肝细胞的 AR 表达阳性率分别为 51%、28%、42%、54% 和 52%。经统计学分析表明:

即刻处死组与正常对照组、跑台训练组及游泳训练组比较,差异均有极显著性意义(P 均 < 0.01);其余各组间比较,差异均无显著性意义。各组肝细胞的 AR 表达形态及分布分别见图 1~图 5。

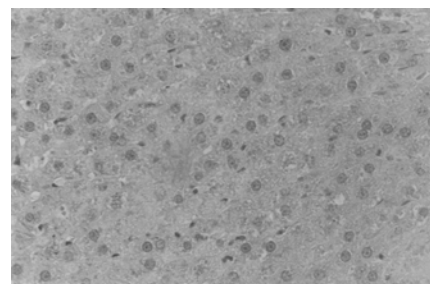


图 1 正常对照组:AR 在胞核和胞浆中呈阳性表达,胞核中颗粒密集,着色较深(ABC 染色, ×200)

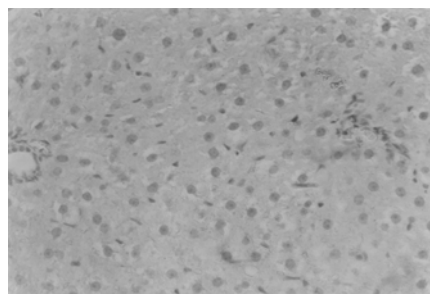


图 2 即刻处死组:AR 阳性信号少,且着色较浅(ABC 染色, ×200)

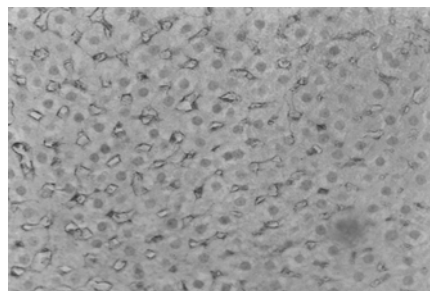


图 3 自然康复组:AR 在胞核和胞浆中呈阳性表达,以核表达为主(ABC 染色, ×200)

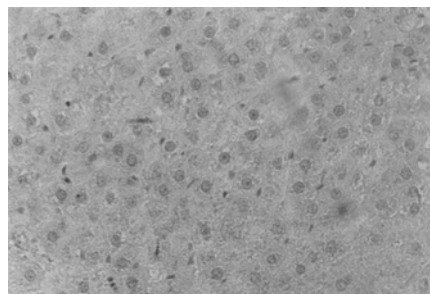


图 4 跑台训练组:AR 在胞核和胞浆中呈阳性表达,以核表达为主(ABC 染色, ×200)

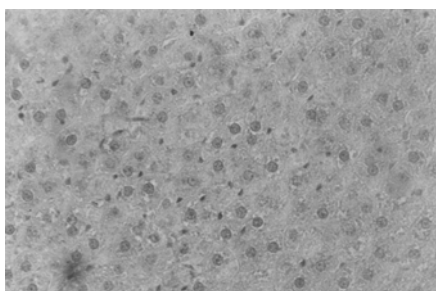


图5 游泳训练组:AR 在胞核和胞浆中呈阳性表达,以核表达为主(ABC 染色,×200)

讨 论

一、外固定和运动对大鼠肝组织 AR 表达的影响

由管型石膏固定肢体获得的肌肉萎缩能保持肌肉的正常神经支配和长度,接近于临床上肢体制动所造成的废用性肌肉萎缩,因此本实验采用石膏外固定建立废用性肌萎缩的动物模型。由于在雄激素的非靶器官组织中,AR 以在肝脏中分布较多,而在骨骼肌中甚少^[5],故本实验选用肝脏作为 AR 研究对象。实验表明,固定 3 周后,大鼠肝脏的 AR 阳性细胞率显著低于正常对照组及各训练组,但各训练组与自然康复组之间并无显著性差异。说明固定可以造成肝脏中 AR 表达的减少,而小强度的有氧运动对肝细胞 AR 表达的影响不大。故认为,雄激素的合成与代谢要与机体的功能状态相适应。固定过程使机体处于一种消耗状态,导致雄激素的代谢清除加速而合成减少,故激素水平下降。因推测雄激素对肝组织的 AR 有正相调节作用,故 AR 表达水平亦随之下降,这可能与骨骼肌中的情况相似^[6],而与雄激素的靶器官中雄激素抑制 AR 的现象相反^[7]。运动训练可能会通过刺激雄激素的合成与分泌来增加肝细胞 AR 的表达。但由于本实验所采用的康复训练强度不大,其调节过程比较缓慢,也许需较长时间才能观察到运动引起的激素水平的升高,以及随之出现的肝组织 AR 阳性细胞率的增加。总之,本实验提示,制动可造成肝组织 AR 表达下降,间接反映出机体的 AR 水平降低,肌肉的同化作用减弱;短期小强度的康复训练对肝细胞 AR 表达的增加作用不显著,提示运动强度和训练时间是影响肌肉萎缩恢复的重要因素之一。

二、AR 的作用机制

传统观念认为,AR 是一种胞浆内的可溶性受体,激素进入靶细胞首先与受体结合形成复合物,然后再进入细胞核内,与染色质结合而发挥作用^[8]。近年来,有学者根据对雌激素受体的研究又提出了新学说^[9]:激素通过胞浆进入胞核时无需受体帮助,而是在核内直接与受体结合,形成激素-受体复合物而发挥作用,我们不妨称

之为类固醇激素作用的核机制。本研究发现,肝细胞核及细胞浆内均有生物素标记的 AR 阳性颗粒出现,但以核内分布为主,胞浆中颗粒少,着色淡,提示 AR 主要是一种核表达受体,这与 Takeda 的研究结果一致^[5],进一步支持类固醇激素作用机理的新学说。雄激素直接作用于核的可能机制是激素直接扩散进入核内,与核膜或基质甚至染色质上的相应受体结合,使 90 k 热休克蛋白脱离受体分子,导致受体构象改变,并使之活化以促进特异基因转录。由于 AR 作用的某些环节还缺少直接证据,那么在电镜水平上受体的亚细胞定位、受体的基因表达等诸多问题将是今后我们研究的重点。至于生化法测得肌肉胞浆中也含有 AR,可能是因为该法测得的 AR 为胞浆内的可溶性受体;另外,也可能有少部分 AR 系因组织匀浆或离心过程中胞核内部分受体脱落至胞浆中所致。总之,AR 可能是一种核受体,通过核机制来发挥作用;小部分胞浆内的可溶性受体则可依照传统的两步机制起作用。

综上所述,AR 阳性信号主要分布于细胞核内,胞浆中着色较淡,提示 AR 可能主要是一种核受体,核机制是其发挥作用的主要形式。运动对肝组织 AR 表达的影响似乎不大;而外固定可减少肝组织中 AR 的表达,这可能是由于雄激素对肝组织中的 AR 有正相调节作用的缘故。

参 考 文 献

- 1 Booth FW, Gollnick PD. Effect of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exer*, 1983, 15: 415-420.
- 2 Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH, et al. Effect of hindlimb immobilization on the fatigability of skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 1983, 54: 1242-1248.
- 3 Appell HJ. Muscle atrophy following immobilization. *Sports Med*, 1990, 10: 42-58.
- 4 陆一帆, 佟启良, 何洛文, 等. 运动对大鼠骨骼肌雄激素分布水平及雄激素受体结合容量的影响. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13: 198-201.
- 5 Takeda G, Chodak S, Mutchik T, et al. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinology*, 1990, 126: 17-25.
- 6 Tchaikovsky VS, Astratenkova JV, Basharina OB. The effect of exercise on the content and reception of the steroid hormones in rat skeletal muscles. *J Steroid Biochem*, 1986, 24: 251-253.
- 7 Max SR, Mufli S, Carlson BM. Cytosolic androgen receptor in regenerating rat levator ani muscle. *Biochem J*, 1981, 200: 77-82.
- 8 曹泽毅, 主编. 激素受体及其临床应用. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 21.
- 9 沈红玲. 黄体功能不足不孕者子宫内膜雌孕激素受体的单克隆抗体免疫组织化学研究. *生殖医学杂志*, 1998, 7: 33-37.

(收稿日期: 2002-04-03)

(本文编辑: 易 浩)