

重组基因酵母报道系统筛检 GR 效应物质

黄崇^{1,2}, 胡建英^{1*}, 常红¹, 王乐征¹, 顾炜旻¹ (1. 北京大学环境学院, 北京 100871; 2. 山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 用糖皮质激素受体重组基因酵母报道系统对 3 种天然与 4 种合成的糖皮质激素的糖皮质激素受体(GR)效应进行测定. 结果表明, 天然糖皮质激素中, 肾上腺酮的活性最高; 而合成激素中甲基强的松的活性最强. 这些物质的 GR 效应与物质的化学结构密切相关. 天然和合成糖皮质激素的 GR 效应随各自的辛醇水分配系数的增加而增强.

关键词: 重组基因酵母报道系统; 糖皮质激素; 糖皮质激素受体效应

中图分类号: X18 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2006)03-0368-04

Screening glucocorticoid receptor-ligand activity of glucocorticoids with yeast two-hybrid system. HUANG Chong^{1,2}, HU Jian-ying^{1*}, CHANG Hong¹, WANG Le-zheng¹, GU Wei-min¹ (1. College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China; 2. College of Animal Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China). *China Environmental Science*, 2006,26(3): 368~371

Abstract: Glucocorticoid receptor (GR)-ligand activity of three natural (hydrocortisone, corticosterone, and cortisone) and four man-made (6α -methylprednisolone, prednisolone, dexamethasone, and prednisone) compounds used in medical treatment were detected using yeast two-hybrid system. For natural compounds, the β -galactosidase activity induced by corticosterone was highest, and for synthetical compounds, 6α -methylprednisolone had maximum activity. GR-ligand activity of glucocorticoids was largely dependant on their chemical structure, and the β -galactosidase activities were positively related to logarithm of octanol-water coefficient.

Key words: yeast two-hybrid system; glucocorticoids; ligand activity of glucocorticoid receptor

糖皮质激素类物质在哺乳动物体内主要包括可的松(皮质素)和氢化可的松(皮质醇), 它们在哺乳动物的生长、发育、分化、免疫及许多其他的生理过程中具有重要作用, 这些不同的生理作用主要是通过糖皮质激素受体(GR)介导产生的^[1]. 其中皮质醇和肾上腺酮这 2 种糖皮质激素是脊椎动物尤其鱼类发生应激反应时分泌的主要激素^[2], 在应激过程中糖皮质激素水平的升高将引起鱼类的免疫抑制^[3], 通过脑的基因和非基因作用而介导鱼类的行为学变化^[4], 皮质醇会引起一些鱼类发生生物学变化^[5]. 糖皮质激素还是临床上运用最广泛的激素之一, 人工合成和生产的许多糖皮质激素药物, 如强的松、强的松龙、甲基强的松龙、地塞米松、去炎松、倍他米松等, 都具备更强的糖皮质激素活性^[6]. 由内源性和外源性糖皮质激素过多使用而引起的库辛氏症已

有广泛报道^[7]. 皮质激素类药物在生产和使用过程中会通过城市污水处理厂和生产工艺废水排放进入环境, 可能造成有害的生态影响, 其环境污染不可忽视.

关于糖皮质激素存在于环境中的研究和调查还未见报道, 但是这类物质在环境中潜在的危害性已经引起了关注^[8]. 目前, 环境中出现糖皮质激素类物质对生态影响方面的研究还很少. 本研究采用 GR 重组基因酵母报道系统检测 7 种糖皮质激素的糖皮质激素受体效应, 并对其结构效应关系进行初步的探讨, 旨在为水域环境中的糖皮质激素及其类似物的监测和效应评价提供基础数据.

收稿日期: 2005-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40471116)

* 责任作者, 教授, huji@urban.pku.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

重组基因酵母工程菌株 Y190 由日本大坂大学西川淳一教授惠赠,其基本原理与广泛使用的克隆有雌激素受体的重组基因酵母工程菌株 Y190 类似^[9],有很好的遗传稳定性(本实验室已经传代 3 次以上);二甲基亚砷(DMSO,ACS 级,美国 AMRESCO 公司);显色剂邻硝基酚β-D-半乳糖苷(ONPG)(东京化成公司,日本);菌酶 Zymolyase 20T(化学工业株式会社,日本);实验用培养基为去除了色氨酸和亮氨酸的 SD 培养基;7 种糖皮质激素标准样品均购买于 Sigma 公司。

BIO-RAD550 酶标仪; Nunc 96 孔 2 条可拆酶标板; Sigma 1-15 冷冻超速离心机; easypure 超纯水仪; 恒温培养箱; minishaker 震荡器。

1.2 重组基因酵母报道系统测试方法

用接种针挑取酵母菌 2~3 环于培养瓶中,在 30℃ 培养 14~16h(对数生长期)。取培养液 50μL 加入有 200μL 培养基的小管中,再添加 2.5μL 的样品溶液(DMSO 溶解液),振荡摇匀。在 30℃ 下,置于 DNA 混合器上培养 4h。设定酶标仪的各参数。移取 150μL 上述培养液于酶标板(96 孔)中,置 595nm 波长下测定菌液的吸光度值(以加入 DMSO 的培养液为空白对照)。余下的溶液以 15000r/min 离心 5min,弃去上清液后,加入 200μL 含 1mg/mL Zymolyase 的 Z buffer 缓冲溶液,振荡混匀后在 30℃ 的条件下静置反应 20min。加入含 4mg/mL ONPG 的缓冲溶液 40μL 于上述溶液中,振荡混匀,再于 30℃ 静置反应 20min(出现黄色为止),加入 100μL 的 1mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应。以 15000r/min 离心 5min,吸取上清液 150μL 于 96 孔酶标板中,分别于 415,570nm 波长下测定吸光度值(以加入菌液的培养液为参照空白)。

$$u = 1000(OD_{415} - 1.75OD_{570}) / (t \cdot v \cdot OD_{595})$$

式中:u 为 β-半乳糖苷酶诱导活性,u; t 为加入 ONPG 后的反应时间,min; v 为体积,0.05mL。

2 结果与amp;讨论

2.1 对象物质的剂量效应曲线

在其他条件不变的情况下,改变暴露时间,用重组基因酵母报道系统测试了氢化可的松的剂量效应曲线(图 1),发现随着暴露时间的延长,最高 β-半乳糖苷酶诱导活性有一定的升高,但是出现最低诱导活性的剂量范围基本没有变化。因此,兼顾到实验的快速性,本研究采用暴露时间为 4h。

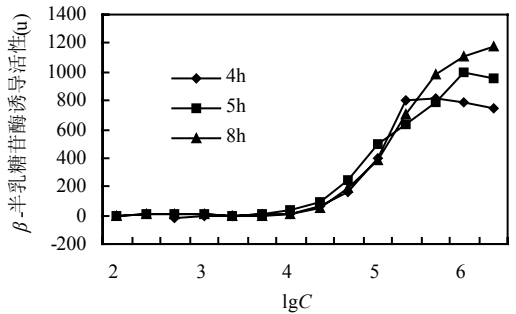


图 1 氢化可的松不同暴露时间的剂量-效应曲线
Fig.1 Effects of exposure time on the dose-response curves of hydrocortisone

图 2 为 3 种天然糖皮质激素(氢化可的松、可的松和肾上腺酮)与 4 种人工合成皮糖质激素(强的松、脱氢皮质醇、甲基强的松和地塞米松)的剂量效应曲线。

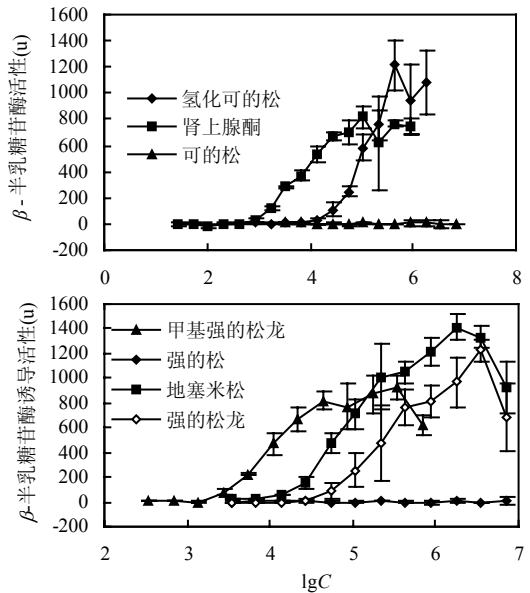


图 2 对象物质的剂量-效应关系
Fig.2 Dose-reponse curves of objective compounds

由图 2 可见,3 种天然糖皮质激素中,肾上腺酮在较低浓度(1708nmol/L)就显示出 β -半乳糖苷酶诱导活性,其次是氢化可的松.在本实验浓度范围内,可的松没有显示 GR 效应活性.在 4 种合成糖皮质激素中,甲基强的松的暴露浓度为 2734nmol/L 时,就可诱导 β -半乳糖苷酶,其活性略小于天然糖皮质激素的肾上腺酮.地塞米松、强的松龙诱导 β -半乳糖苷酶活性的浓度范围和氢化可的松相似,在实验暴露浓度范围内强的松仅诱导微弱的 β -半乳糖苷酶.

2.2 物质的结构特征与作用强度的关系

糖皮质激素的基本结构为甾核,特征结构中 C_3 的酮基、 C_{20} 的羰基和 $C_{4,5}$ 的双键是所有肾上腺皮质激素保持生理功能所必需的;糖皮质激素独有结构特征为 C_{17} 上有羟基; C_{11} 上有羰基或羟基.人工合成糖皮质激素就是基于以上糖皮质激素的基本结构衍变而来的.在本研究确定的试验条件下,利用 GR 重组基因酵母报道系统测试 7 种糖皮质激素,发现氢化可的松、肾上腺酮、强的松龙、甲基强的松龙和地塞米松 5 种物质具有较强的 β -半乳糖苷酶诱导活性,它们共同的结构特征为 C_{11} 上为羟基,而可的松和强的松 2 种物质显示出较弱的 β -半乳糖苷酶诱导活性,它们共同的结构特征为 C_{11} 上为羰基.由此可见,糖皮质激素的分子结构与 GR 效应强度之间的关系密切.

表 1 列出了重组基因酵母测试方法检测的各物质诱导最大 β -半乳糖苷酶 50% 时的暴露浓度 (EC_{50} 值).图 3 为糖皮质激素 EC_{50} 值与辛醇水分配系数 (K_{ow}) 的相关关系.由于可的松在本实验暴露浓度范围内没有监测出活性,强的松则显示微弱的活性,在表 1 中,其 EC_{50} 表示为 $>7 \times 10^6$ nmol/L (最大暴露浓度),而在图 3 中用 7×10^6 nmol/L 代替.由图 3 可见,天然和合成糖皮质激素的糖皮质激素受体效应强度分别和它们的 lgK_{ow} 值呈正相关关系.

2.3 环境中存在糖皮质激素的可能性和潜在危害性

Overli 等^[3]已经证明,长期喂食氢化可的松给受干扰的鱼,会抑制鱼的运动和好斗行为.

Halpenny 等^[10]发现暴露于糖皮质激素会影响箭齿鲈(美洲的一种比目鱼)的免疫反应.还有研究表明,暴露于氢化可的松的虹鳟鱼在竞争配对时更有可能处于劣势^[11].为了评价这类具有荷尔蒙类活性物质对生态系统的风险性,首要的任务就是建立环境介质中该类物质的监测方法.

表 1 天然和合成糖皮质激素的分子量, lgK_{ow} 和 β -半乳糖苷酶诱导活性

Table 1 Molecular weight, lgK_{ow} and inductivity for β -galactosidase of natural and synthetic glucocorticoids

种类	名称	分子量	lgK_{ow}	$EC_{50}(\times 10^3 \text{ nmol/L})$	TEF
天然激素	氢化可的松	362.5	1.43	133.6	1
	可的松	360.4	1.24	>7000	0.02
	肾上腺酮	346.5	1.76	6.3	21.17
合成激素	甲基强的松龙	374.5	2.18	9.9	13.49
	强的松龙	360.5	1.69	320.6	0.42
	地塞米松	392.5	2.06	92.7	1.44
	强的松	358.4	1.56	>7000	0.02

注: TEF 为相对于氢化可的松的等当量毒性

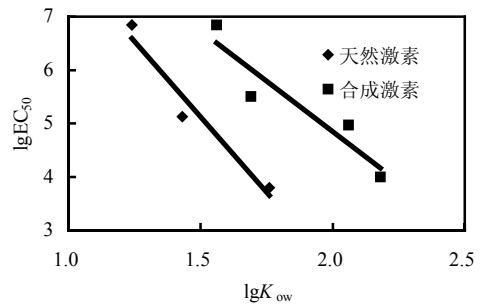


图 3 EC_{50} 值与 K_{ow} 值的相关关系

Fig.3 Correlation between EC_{50} and K_{ow}

3 结论

3.1 糖皮质激素受体重组基因酵母测试方法是筛选糖皮质激素物质的有效方法.

3.2 天然和合成糖皮质激素的糖皮质激素受体效应作用强度与其结构有很大的关系,与 lgK_{ow} 值有很好的相关关系.

参考文献:

[1] Song Liangnian. Relationship between the induction of heat

- shock proteins and the decrease in glucocorticoid receptor during heat shock response in human osteosarcoma cells [J]. *Science in China*, 1995,38(12):1473-1481.
- [2] Jentoft Sissel, Held James A, Malison Jeffrey A, *et al.* Ontogeny of the cortisol stress response in yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003,26(4):371-378.
- [3] Qverli Qyvind, Kotzian Susann, Winberg Svante. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout [J]. *Hormones and Behavior*, 2002,42:53-61.
- [4] Rose J D. Corticosteroid actions from neuronal membrane to behavior neurophysiological mechanisms underlying rapid behavior effects of corticosterone [J]. *Biochem.*, 2000,78:307-315.
- [5] Mizuno S, Misaka N, Kasahara N. Effects of cortisol and angiotensin II on the number and size of juxtaglomerular cells in masu salmon, *oncorhynchus masou* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002,25:249-254.
- [6] Barnes P J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids molecular mechanisms [J]. *Clinical Science*, 1998,94:557-572.
- [7] Yanovski J A, Cutler G B J. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome [J]. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1994,23(3):487-509.
- [8] Sumpter J P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview [J]. *Acta. Hydrochim., Hydrobiol.*, 2005,33(1):9-16.
- [9] Nishikawa Ji, Saito K, Goto J, *et al.* New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999,154:76-83.
- [10] Halpenny C M, Kocan R M, Winton J R, *et al.* Elevated temperature exacerbates *Ichthyophonus* infections in buffalo sculpin [A]. *Fish health newsletter* [C]. Bethesda: Fish Health Section / American Fisheries Society, 2002.18-20.
- [11] Gilmour Kathleen M, Dibattista Joseph D, Thomas Justin B. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2005,45: 263-273.
- 作者简介:** 黄 崇(1978-),女,河南南阳人,硕士,主要从事动物环境毒理研究.

英国气象部门报告指出气候变化的巨大风险

由于人类活动大量排放温室气体导致的气候变化,可能比以前认为的有更大的全球性灾难风险,这是最近英国气象局(Meteorological Office)发表的一份报告指出的.报告关注全世界会接近温度的阈值,将引发不可逆转的巨大影响.报告的题目是:“避免危险的全球气候变化”,报告列出证据表明格陵兰冰层(仅次于南极冰层的北半球最大冰层)可能已经开始融化,如果格陵兰当地气温比目前平均气温高出2.7℃,则可能是引起冰层不可逆转融化的阈值.但这一数值已处于联合国政府间气候变化委员会(IGCC)预测的本世纪温升的范围内.科学家预计,全球平均气温升高 1℃就会导致广泛的珊瑚变白和海洋生态系统的巨大破坏.报告指出最近的研究表明,由于从大气中吸收了大量的 CO₂,海洋已开始有些酸化.报告认为从长远角度考虑减少 CO₂ 排放的技术已经有了,如提高能源效率、更多使用核能以及在交通运输领域使用可再生燃料等.

江 年 摘自《Chemical & Engineering News》, February 6,19(2006)