

· 基础研究 ·

蛇床子素对 Y1 小鼠肾上腺皮质瘤细胞
皮质功能的影响

潘志强 梁龙龙 方肇勤 刘小美 卢文丽 张园园

摘要 目的 研究蛇床子素(Osthole, Ost)对肾上腺皮质功能的影响。**方法** 以 Y1 小鼠肾上腺皮质瘤细胞为实验对象,以含 10%、1%和 0.1% 血清培养液培养细胞,分别采用 1、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ Ost 处理 Y1 细胞 24、48 h,以 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)为阴性对照组,腺苷酸环化酶激活剂(Bu) 2cAMP 为阳性对照组,倒置显微镜下观察细胞形态变化,采用 ELISA 法检测细胞分泌液皮质酮含量,RT-qPCR 法检测类固醇急性调节蛋白(Star)、胆固醇侧链裂解酶(Cyp11a1)、 21α -羟化酶(Cyp21a1)、 3β -羟基类固醇脱氢酶(Hsd3b2)、 11β -羟化酶 1(Cyp11b1)、 11β -羟化酶 2(Cyp11b2)、 17α -羟化酶/17,20-碳链裂解酶(Cyp17a1)及 17β -羟基类固醇脱氢酶 3(Hsd17b3)基因表达水平。**结果** 100、200 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组可明显抑制 Y1 细胞增殖,且对含 0.1% 血清培养液中细胞抑制作用更明显。与阴性对照组比较,阳性对照组 Y1 细胞 Star、Cyp11a1、Cyp21a1、Hsd3b2、Cyp11b1、Cyp17a1 及 Hsd17b3 基因表达水平明显增强($P < 0.05$);干预 24、48 h,50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组 Y1 细胞皮质酮水平明显升高($P < 0.05$)。与 24 h 比较,干预 48 h 后,25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组皮质酮含量明显升高($P < 0.01$)。干预 24 h 后,25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组 Star、Cyp21a1、Hsd3b2 基因表达明显增强($P < 0.05$);干预 48 h 后,Star 基因表达水平进一步增强($P < 0.05$),但 Cyp11a1 基因表达无明显差异($P > 0.05$)。干预 24、48 h 后,10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组皮质酮合成酶 Cyp11b1 和性激素合成酶 Cyp17a1 基因表达明显增强($P < 0.05$);Ost 对醛固酮合成酶 Cyp11b2 和性激素合成酶 Hsd17b3 基因表达水平未见明显作用。**结论** 蛇床子素通过增强类固醇激素合成相关酶基因表达,参与调节肾上腺皮质功能,并以促进皮质酮的合成与分泌作用为主。

关键词 蛇床子素;肾上腺皮质;Y1 小鼠肾上腺皮质瘤细胞; 11β -羟化酶 1;20-碳链裂解酶; 3β -羟基类固醇脱氢酶;类固醇急性调节蛋白

Effect of Osthole on Adrenocortical Function in Y1 Mouse Adrenocortical Tumor Cells PAN Zhi-qiang, LIANG Long-long, FANG Zhao-qin, LIU Xiao-mei, LU Wen-li, and ZHANG Yuan-yuan Basic Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT Objective To study the effect of osthole (Ost) on adrenocortical function in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. **Methods** Y1 mouse adrenocortical tumor cells were taken as subjects in this experiment. In 10.0%, 1.0%, and 0.1% serum DMEM-F12 medium, Y1 cells were treated with 1, 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$ Ost for 24 and 48 h. 0.1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) was taken as negative control group and 1 mmol/L (Bu) 2cAMP as positive control group. Cell growth morphology was observed under inverted microscope. Contents of corticosterone were tested by ELISA. Expression levels of steroids synthase such as Star, Cyp11a1, Cyp21a1, Hsd3b2, Cyp11b1, Cyp11b2, Cyp17a1, and Hsd17b3 mRNA were detected by Real time quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** Y1 cell proliferation was obviously inhibited by 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ Ost, and its inhibitory effect was more significant in 0.1% serum medium. Compared with the negative control group, gene expressions of Star,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81473562);上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2014-2016 年)(No. ZY3-CCCX-3-3010)

作者单位:上海中医药大学基础医学院(上海 201203)

通讯作者:潘志强, Tel: 021-51322116, E-mail: pzq527@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 05. 0574

Cyp11a1, Cyp21a1, Hsd3b2, Cyp11b1, Cyp17a1, and Hsd17b3 were significantly enhanced in the positive control group ($P < 0.05$). Y1 cell corticosterone levels significantly increased in 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost treatment group after 24- and 48-h intervention ($P < 0.05$). Contents of corticosterone increased more obviously in 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost treatment groups after 48-h intervention, as compared with 24-h intervention ($P < 0.01$). After 24-h intervention, expression levels of Star, Cyp21a1, and Hsd3b2 genes were significantly up-regulated in 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost groups ($P < 0.05$). Star gene expression was further enhanced after 48-h intervention ($P < 0.05$). However, Ost showed no effect on Cyp11a1 ($P > 0.05$). Additionally, gene expressions of Cyp11b1 and Cyp17a1 were significantly enhanced by 10, 25, and 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost after treatment for 24 and 48 h ($P < 0.05$). Ost showed no obvious effect on Cyp11b2 and Hsd17b3 expressions. Conclusion Ost could regulate adrenal cortex function and promote corticosterone synthesis and secretion through strengthening gene expressions of steroidogenic enzymes.

KEYWORDS osthole; adrenal cortex; Y1 mouse adrenocortical tumor cell; Cyp11b1; Cyp17a1; Hsd3b2; Star

肾上腺皮质负责合成与分泌类固醇激素,其分泌的醛固酮参与机体电解质调节和维持水盐平衡;分泌的糖皮质激素参与糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢,还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒、抗休克等作用;此外也合成少量性激素^[1,2]。研究表明,肾上腺皮质功能是中医肾虚证的重要功能定位^[3],因此,以肾上腺皮质细胞为实验对象,探索补肾中药对皮质功能的影响,有助于阐明补肾治法的部分作用机制。

近年研究发现,部分温肾助阳中药具有类似激素样作用^[4]。蛇床子具有温肾壮阳、祛风燥湿、杀虫止痒作用,其有效成分为蛇床子素(osthole, Ost),又名甲氧基欧芹酚,化学名为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素。现代药理研究表明,Ost 对机体内分泌生殖系统、免疫系统、心脑血管系统均有不同作用,包括抗心律失常、抗氧化、抗炎镇痛、抗过敏、抗骨质疏松、抗肿瘤、雄激素样和促性腺激素样作用等^[5]。中医学理论认为,温肾助阳中药有助于改善肾虚证,提示此类中药的药理作用可能涉及对肾上腺皮质功能的调节。本研究观察 Ost 对 Y1 细胞(小鼠肾上腺皮质瘤细胞)相关激素合成酶基因表达的作用及其皮质功能的影响。

材料与方法

1 细胞株 Y1 细胞购自中国科学院细胞库。

2 药物、试剂及仪器 Ost,白色粉末,纯度 > 98%,购自上海市食品药品检验所(批号:110822-201308);腺苷酸环化酶激活剂(Bu)2cAMP、二甲基亚砜(DMSO)均购自 Sigma-Aldrich 公司;Ost 采用 DMSO 溶解。胎牛血清、青链霉素混合液(100 $\times$)、

DMEM-F12 培养液均购自 Hyclone 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;PrimeScript[®] RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司。采用 Primer 3(v. 0.4.0)在线软件设计引物并委托 Life Technologies 公司合成;皮质酮 ELISA 试剂盒购自 Cayman 公司。CKX41 型倒置显微镜(Olympus 公司),Elx800 型酶标仪(Biotek 公司),7500 Fast Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)。

3 细胞培养 Y1 细胞采用含 10%胎牛血清、青链霉素混合液(100 $\times$)的 DMEM-F12 培养液,置于 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 湿饱和的条件下常规培养。细胞生长至 80%~85%融合时,用含 EDTA 0.25%胰酶消化后,铺板后培养,取其对数生长期细胞进行实验。

4 细胞分组及干预 本研究以 0.1% DMSO 为阴性对照组,1 mmol/L (Bu)2cAMP 作为阳性对照组,在含 1%的血清培养液条件下,采用 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 干预 Y1 细胞 24、48 h,在相应时点收集细胞上清培养液用于检测皮质酮含量,收集细胞进行 mRNA 表达检测。

5 观察指标及检测方法

5.1 不同血清浓度培养条件下各组 Y1 细胞形态观察 由于血清所含物质复杂,血清中的激素对细胞生长有重要作用,本研究应用常规含 10%血清培养液和 0.1%低血清培养液两种培养条件,分别采用 0.1% DMSO, 1、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ Ost 干预 Y1 细胞 24 h,在倒置显微镜下观察细胞形态并在 200 倍下拍摄细胞照片。

5.2 皮质酮含量测定 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法进行检测。按照小鼠皮质酮 ELISA 试剂

盒说明书进行操作,流程包括:配制皮质酮标准品及稀释不同梯度,5 倍稀释细胞上清培养液样品,加入标准品和样品、酶标试剂,孵育,洗涤,加入显色底物,酶标仪检测 A₄₁₂ 读数值,进行数据分析。

5.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测相关基因 mRNA 表达 检测类固醇急性调节蛋白(Star)、胆固醇侧链裂解酶(Cyp11a1)、21α-羟化酶(Cyp21a1)、3β-羟基类固醇脱氢酶(Hsd3b2)、11β-羟化酶 1(Cyp11b1)、11β-羟化酶 2(Cyp11b2)、17α-羟化酶/17,20-碳链裂解酶(Cyp17a1)及 17β-羟基类固醇脱氢酶 3(Hsd17b3)基因表达。上下游引物序列采用 Primer3(v.0.4.0)在线软件合成(表 1),委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提 Y1 细胞总 RNA;逆转录反应体系 20 μL,反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃;PCR 扩增反应体系为 20 μL,反应程序为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 循环。基因相对表达量分析方法,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析^[6],以 0.1% DMSO 为对照组,以 β-actin 基因 Ct 均值作为内参,ΔCt = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因},其中 Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值,ΔΔCt = ΔCt_{实验组} - ΔCt_{对照组},目的基因相对表达量 = 2^{-ΔΔCt}。本实验采用 6 孔板,各组均复孔,并独立重复 1 次。

6 统计学方法 采用 GraphPad.Prism 5.0 专业软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同血清浓度培养条件下各组 Y1 细胞形态比较(图 1) 对照组 Y1 细胞呈现扁平、贴壁样生长,在 10%血清培养液条件下,1、10、25、50、100 μmol/L Ost 组 Y1 细胞形态无明显变化,200 μmol/L Ost 组细胞形态呈现轻度皱缩现象。在 0.1%血清培养液条件下,1、10、25、50 μmol/L Ost 组 Y1 细胞形态亦无明显变化。100 μmol/L Ost 组细胞显著皱缩并出现死亡,200 μmol/L Ost 组细胞大量脱落与死亡。提示大于 100 μmol/L 浓度的 Ost 在低血清培养液条件下对小鼠肾上腺皮质瘤细胞有明显的抑制生长作用。故后续实验 Ost 浓度选用 10、25、50 μmol/L。

2 各组干预 24、48 h Y1 细胞皮质酮分泌水平比较(表 2) 与阴性对照组比较,阳性对照组皮质酮水平明显升高(P < 0.01),且干预 48 h 后皮质酮含量升高较 24 h 时更明显(P < 0.05);50 μmol/L Ost 组干预 24 h, Y1 细胞皮质酮水平明显升高(P < 0.05),25、50 μmol/L Ost 组干预 48 h, Y1 细胞皮质酮水平明显升高(P < 0.01);与干预 24 h 比较,25、50 μmol/L Ost 组干预 48 h 后皮质酮水平明显升高(P < 0.01)。

3 各组干预 24、48 h Y1 细胞类固醇激素合成起始环节相关酶基因表达水平比较(表 3) 与阴性对照组比较,阳性对照组 Star 基因表达水平明显升高(P < 0.01),且干预 48 h 后,Star 基因表达明显高于 24 h(P < 0.01);干预 24 h 后,25、50 μmol/L Ost 组 Star 基因表达水平明显升高(P < 0.05);干预 48 h 后,

表 1 目的基因引物序列

基因	mRNA 序列号	引物序列	Tm 值(℃)	产物(bp)
β-actin	NM_007393	上游 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	59.98	228
		下游 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'	60.02	
Cyp11a1	NM_019779	上游 5'-GCTGGAAGGTGTAGCTCAGG-3'	60.01	224
		下游 5'-CACTGGTGTGGAACATCTGG-3'	60.00	
Cyp11b1	NM_001033229	上游 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3'	60.12	140
		下游 5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'	60.00	
Cyp11b2	NM_009991	上游 5'-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3'	60.02	160
		下游 5'-AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT-3'	60.02	
Cyp17a1	NM_007809	上游 5'-TGGTCATATGCATGCCAACT-3'	60.00	132
		下游 5'-CCCTTCTTCACGAGCACTTC-3'	60.02	
Cyp21a1	NM_009995	上游 5'-ATAGAGCAGCTGACCCAGGA-3'	59.98	121
		下游 5'-CTCCAAAAGTGAGGCAGGAG-3'	60.01	
Hsd3b2	NM_153193	上游 5'-TCCAGCTCAGTTGATGTTGC-3'	59.99	129
		下游 5'-TGCCTTCTCAGCCATCTTTT-3'	59.96	
Hsd17b3	NM_008291	上游 5'-GTTCTCGCAGCACCTTTTTC-3'	60.00	218
		下游 5'-AGCTTCCAGTGGTCCTCTCA-3'	59.99	
Star	NM_011485	上游 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3'	59.96	103
		下游 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'	59.97	

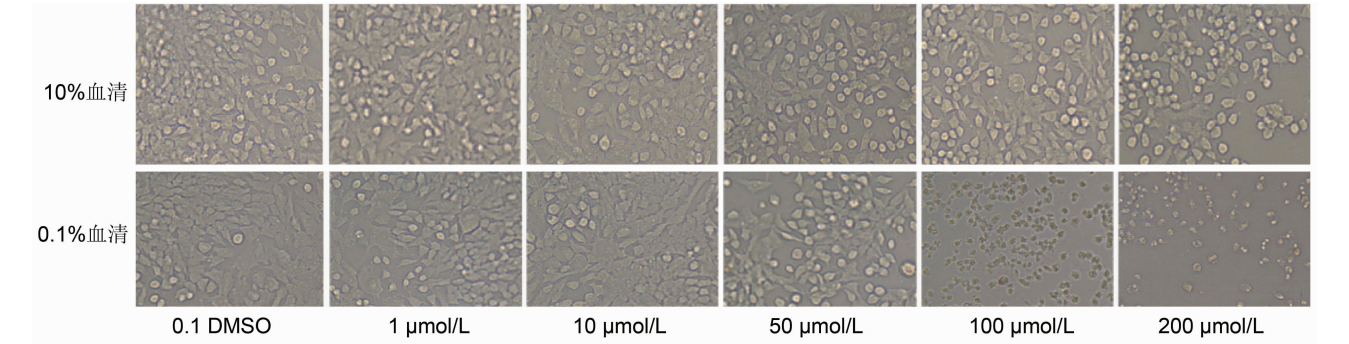


图1 不同血清浓度培养条件下各组 Y1 细胞干预 24 h 后细胞形态变化 (×200)

10、25 和 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组 Star 基因表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

与阴性对照组比较,Cyp11a1 基因表达阳性对照组明显增强($P < 0.05$),10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与阴性对照组比较,干预 24 h 阳性对照组 Hsd3b2 基因表达明显升高 ($P < 0.01$); 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组 Hsd3b2 基因表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);干预 48 h 后,各组上调 Hsd3b2 基因表达的幅度下降,且阳性对照组与 50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组较 24 h 时表达明显下降($P < 0.05$)。

表2 各组干预 24、48 h Y1 细胞皮质酮分泌水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h
阴性对照	4	1 118.55 $\pm$ 176.42	1 663.55 $\pm$ 301.86
阳性对照	4	2 785.20 $\pm$ 66.90 **	5 027.00 $\pm$ 282.13 ** Δ
10 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	1 472.90 $\pm$ 170.84	1 806.10 $\pm$ 151.04
25 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	1 465.95 $\pm$ 115.33	3 179.05 $\pm$ 668.00 ** Δ
50 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	1 700.40 $\pm$ 216.23 *	4 643.20 $\pm$ 414.51 ** Δ

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本组干预 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$;表 3 同

4 各组 Y1 细胞干预 24、48 h 皮质酮合成酶基因表达水平比较(表 4) 与阴性对照组比较,阳性对照组皮质酮合成关键酶 Cyp11b1 基因表达明显升高 ($P < 0.01$); 用药 24、48 h 后,10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组 Cyp11b1 基因表达亦明显升高 ($P < 0.05$)。Ost 干预 24、48 h 后,Cyp21a1 基因呈现不同特征。与阴性对照组比较,阳性对照组 Cyp21a1 基因表达明显升高 ($P < 0.01$);10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ Ost 组干预 24 h 后可上调 Cyp21a1 基因表达($P < 0.05$),并呈现量效关系。与用药 24 h 比较,干预 48 h 后各组 Cyp21a1 基因表达均受抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 各组 Y1 细胞干预 24、48 h 醛固酮合成酶基因表达水平比较(表 5) (Bu) 2cAMP 和 Ost 对醛固酮合成关键酶 Cyp11b2 基因表达均无明显作用,且发现 Cyp11b2 基因在 Y1 细胞中表达量极低。

6 各组 Y1 细胞干预 24、48 h 性激素合成酶基因表达水平比较(表 6) 与阴性对照组比较,给药干预 24、48 h 后,(Bu) 2cAMP 均促进 Cyp17a1 基因

表3 各组干预 24、48 h Y1 细胞类固醇激素合成起始环节相关酶基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Star		Cyp11a1		Hsd3b2	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	4	1.24 $\pm$ 0.28	1.06 $\pm$ 0.22	0.88 $\pm$ 0.15	1.02 $\pm$ 0.11	1.09 $\pm$ 0.06	1.18 $\pm$ 0.13
阳性对照	4	2.68 $\pm$ 0.35 *	12.94 $\pm$ 2.11 ** Δ	2.22 $\pm$ 0.30 *	2.96 $\pm$ 0.49 *	24.53 $\pm$ 3.87 **	12.59 $\pm$ 1.66 ** Δ
10 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	1.57 $\pm$ 0.17	1.73 $\pm$ 0.50 *	1.24 $\pm$ 0.37	1.03 $\pm$ 0.09	2.62 $\pm$ 0.34 *	1.24 $\pm$ 0.33
25 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	2.05 $\pm$ 0.54 *	3.19 $\pm$ 0.49 *	1.11 $\pm$ 0.20	1.17 $\pm$ 0.11	2.45 $\pm$ 0.41 *	1.22 $\pm$ 0.34
50 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	3.55 $\pm$ 0.96 *	4.36 $\pm$ 1.28 **	1.27 $\pm$ 0.34	0.81 $\pm$ 0.06	8.83 $\pm$ 1.16 **	1.96 $\pm$ 0.57 ** Δ

表4 各组干预 24、48 h Y1 细胞皮质酮合成酶基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cyp11b1		Cyp21a1	
		24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	4	1.00 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.16
阳性对照	4	3.09 $\pm$ 0.41 **	4.85 $\pm$ 2.43 ** Δ	6.28 $\pm$ 0.68 **	1.57 $\pm$ 0.36 Δ
10 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	1.65 $\pm$ 0.47 *	1.47 $\pm$ 0.17 *	3.21 $\pm$ 0.58 *	0.89 $\pm$ 0.34 Δ
25 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	2.48 $\pm$ 1.16 *	2.54 $\pm$ 0.42 *	5.01 $\pm$ 0.89 *	0.96 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$
50 $\mu\text{mol/L}$ Ost	4	2.96 $\pm$ 1.69 *	2.18 $\pm$ 0.19 *	6.76 $\pm$ 1.21 *	0.78 $\pm$ 0.29 $\Delta\Delta$

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与干预 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 5 各组干预 24、48 h Y1 细胞醛固酮合成
关键酶基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cyp11b2	
	24 h	48 h
阴性对照	1.05 ± 0.05	1.00 ± 0.11
阳性对照	1.35 ± 0.49	1.38 ± 0.44
10 μmol/L Ost	1.43 ± 0.55	1.16 ± 0.38
25 μmol/L Ost	0.92 ± 0.40	0.78 ± 0.30
50 μmol/L Ost	0.95 ± 0.32	0.93 ± 0.28

表达($P < 0.05$); 10、25 和 50 μmol/L Ost 组干预 24、48 h 后均可上调 Cyp17a1 基因表达水平($P < 0.05$)。与阴性对照组比较, 阳性对照组可诱导 Hsd17b3 基因表达($P < 0.01$); 不同浓度 Ost 组 Hsd17b3 基因表达水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

肾上腺皮质功能被认为与中医证候有关, 尤其是虚证往往表现出肾上腺皮质功能不同程度的衰退^[7], 温肾助阳类中药有助于改善肾阳虚为主的证候。本研究主要观察蛇床子主要组分 Ost 对小鼠肾上腺皮质功能作用的影响。在细胞株选择方面, 常用的肾上腺皮质细胞包括人肾上腺皮质癌细胞系 (NCI-H295R、HAC-15、SW-13 等)、小鼠肾上腺皮质瘤细胞 (Y1) 及大鼠、牛等原代细胞^[8]。由于本课题组长期以来开展了大量的小鼠证候实验研究^[9,10], 因此采用 Y1 小鼠肾上腺皮质瘤细胞为实验对象。Y1 细胞的生物学特性具备分泌皮质激素的能力, 尤其对腺苷酸环化酶激活剂应答力强并可促进皮质激素的合成与分泌。本研究采用了 (Bu)2cAMP 作为 Y1 细胞诱导激素分泌的阳性对照剂, 结果显示 (Bu)2cAMP 可明显促进 Y1 细胞皮质酮与性激素合成酶相关基因表达, 并诱导皮质酮分泌。结果也发现, 醛固酮合成酶 Cyp11b2 基因表达量在 Y1 细胞极低, 不能被 (Bu)2cAMP 诱导表达, 提示 Y1 细胞失去合成与分泌醛固酮的生物学特性。此外, 有报道显示 Y1 细胞对促肾上腺皮质激素

(ACTH) 的应答力弱, 本课题组前期研究发现 Y1 细胞对 ACTH 急性应答弱、但对 ACTH 慢性应答依然存在^[8]。

本研究首先观察了 Ost 对 Y1 细胞增殖的影响, 发现 1~200 μmol/L Ost 对含 10% 血清培养液的 Y1 细胞增殖作用不明显, 通过剥夺血清后, 浓度大于 100 μmol/L Ost 对 Y1 细胞的生长具有显著抑制甚至毒性作用, 提示血清所含某种物质可减弱 Ost 对 Y1 细胞增殖的抑制效应, 或 Ost 对极低血清培养环境下的 Y1 细胞敏感性增强。在此基础上, 进一步从肾上腺皮质细胞 3 个功能水平观察 10、25 和 50 μmol/L Ost 对 Y1 细胞类固醇激素合成酶基因表达的作用, 并观察了两个时间窗口的药物作用效应。结果发现, Ost 可促进 Star 基因表达, 且呈现时效与量效关系, 提示 Ost 可促进胞浆内胆固醇向线粒体转运, 从而有利于提供 Y1 细胞类固醇激素合成的原料。但 Ost 对 Cyp11a1 表达无明显作用。由于 Cyp11a1 属类固醇激素合成限速酶, 提示 Ost 不能加速启动胆固醇侧链的裂解。此外, 不同浓度 Ost 干预 24 h 后可增强 Cyp21a1 和 Hsd3b2 基因表达, 从而有助于类固醇激素合成, 但随用药时间延长至 48 h, 该作用逐渐减弱。

进一步研究发现, 皮质酮合成关键酶 Cyp11b1 表达可被 Ost 诱导, 并具有量效作用, 进而检测细胞分泌液中皮质酮含量, 发现 Ost 能促进皮质酮的合成与分泌, 并与 Ost 剂量和作用时间有关。然而, 醛固酮合成酶 Cyp11b2 转录的起始模板量极低, 既不能通过腺苷酸环化酶激活剂诱导表达, 也不能被 Ost 所增强表达, 因此未检测细胞分泌液的醛固酮水平。有文献报道 Y1 细胞醛固酮合成与分泌较少, 即使血管紧张素 II 也不能刺激 Y1 细胞类固醇合成^[11]。

另外, 在性激素合成方面, 发现 Ost 干预 24、48 h 后均可促进 Cyp17a1 基因表达, 但对 Hsd17b3 基因表达无作用。有文献报道^[12], 17βHSDs 酶 6 个亚型, 其中人 Hsd17b3 唯一表达于睾丸细胞。此外, 文献报道 Y1 细胞性激素合成量极少^[13], 因此本研究未深入检测细胞所分泌的性激素水平。在后续研究中本

表 6 各组干预 24、48 h Y1 细胞性激素合成酶基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cyp17a1		Hsd17b3	
	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	1.07 ± 0.15	0.91 ± 0.12	0.96 ± 0.08	0.91 ± 0.16
阳性对照	2.71 ± 0.53*	2.72 ± 0.33*	14.33 ± 2.61**	6.61 ± 0.74**
10 μmol/L Ost	3.46 ± 0.84*	3.52 ± 0.78*	1.25 ± 0.34	1.23 ± 0.41
25 μmol/L Ost	3.51 ± 1.11*	3.05 ± 0.66*	0.92 ± 0.15	0.81 ± 0.22
50 μmol/L Ost	7.69 ± 1.36*	4.12 ± 0.89*	1.54 ± 0.37	1.21 ± 0.39

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

课题组将采用小鼠睾丸间质细胞为对象,探索 Ost 对睾酮合成与分泌的可能作用。

综上, Ost 作用于 Y1 细胞后,可能通过激活 Star 的表达,增强线粒体膜对胆固醇的转运能力,最后通过促进皮质酮合成酶的表达以增加皮质酮的合成量^[8],且对性激素合成酶有明显促进作用,但对醛固酮合成酶无作用。推测 Ost 对 Y1 细胞皮质功能的作用类似于 (Bu)2cAMP 药效,可能通过增加激活环磷酸腺苷 (cAMP) 途径^[14],进而激活腺苷酸环化酶以提高细胞内 cAMP 含量实现促进皮质酮的合成与分泌。

参 考 文 献

- [1] Miller WL. A brief history of adrenal research: steroidogenesis—the soul of the adrenal[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 371(1–2): 5–14.
- [2] Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, et al. Acute and chronic regulation of aldosterone production [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 350(2): 151–162.
- [3] 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 50–52.
- [4] 闫朋宣, 杜宝俊, 罗然. 中药类激素样作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 531–534.
- [5] 汪文来, 于智敏, 鞠大宏, 等. 蛇床子化学及药理研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(6): 704–706.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDeltaCT) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [7] 沈自尹. 衰老—生理性肾虚证的 HPAT 轴分子网络调控研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(9): 841–843.
- [8] 潘志强, 方肇勤. 肾上腺皮质细胞模型研究进展[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(8): 730–734.
- [9] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 同病异证和异病同证的物质基础—肿瘤、高血压、糖尿病大鼠/小鼠神经—内分泌组织一些重要激素的转录特征[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(5): 58–67.
- [10] 潘志强, 方肇勤, 卢文丽, 等. 不同程度邪毒证 H22 肝癌小鼠血液激素含量动态变化分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(10): 1361–1365.
- [11] Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228(1–2): 23–38.
- [12] Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J]. Endocr Rev, 2011, 32: 81–151.
- [13] Miller WL. Androgen synthesis in adrenarche[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2009, 10(1): 3–17.
- [14] 张志文. 激素第二信使 cAMP 的发现[J]. 生物学通报, 2010, 45(7): 59–62.

(收稿: 2015-01-15 修回: 2015-12-30)

《中国中西医结合杂志》获 2014 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号

中国科技信息研究所(简称中信所)2015 年 10 月 21 日公布了最新的中国科技论文统计结果。《中国中西医结合杂志》再次获得 2014 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号。自 2002 年中信所评选此荣誉称号以来,共计十三次评选中,我刊第十二次获得此荣誉称号。同时,我刊继续获评为“中国科技核心期刊”,并有 22 篇文章入选“中国精品科技期刊顶尖学术论文”(F5000)。