

内源性库欣综合征患者外周血糖皮质激素受体敏感性的检测

肖 珍, 余叶蓉[△]

四川大学华西医院 内分泌代谢科 (成都 610041)

【摘要】 目的 检测内源性库欣综合征患者体内糖皮质激素受体(GR)的数量与结合力的改变,为库欣综合征患者术后糖皮质激素合理替代治疗剂量提供参考。**方法** 按入院顺序依次纳入在四川大学华西医院内分泌代谢科住院并诊断为内源性库欣综合征的患者,并选择年龄及性别与患者匹配的健康志愿者作为对照组。采用流式细胞术检测两组受试者单个核细胞(PBMC)GR的数量和结合力,比较两组受试者差异,并分析库欣综合征患者血尿皮质醇水平与其GR数量及结合力的相关性。**结果** 共纳入库欣综合征患者17例和健康志愿者17例。库欣综合征患者GR数量和结合力分别为 11.9 ± 3.1 、 6.6 ± 2.6 ;正常对照组GR数量和结合力分别为 20.6 ± 3.3 、 9.9 ± 3.2 。库欣综合征患者GR数量和结合力低于正常组($P < 0.05$);库欣综合征患者血、尿皮质醇水平与其GR数量或结合力无相关关系。**结论** 库欣综合征患者GR敏感性明显降低,建议手术切除肿瘤后患者采用生理剂量1.6倍的糖皮质激素替代治疗,以克服患者的糖皮质激素抵抗,维持糖皮质激素的生理功能。

【关键词】 库欣综合征 糖皮质激素受体 流式细胞术

The Functional Analysis of Glucocorticoid Receptor in Peripheral Blood of Endogenous Cushing's Syndrome Patients

XIAO Zhen, YU Ye-rong[△]. Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: yerongyu@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the expression level and binding affinity glucocorticoid receptor (GR) in endogenous Cushing's syndrome patients. **Methods** The patients of endogenous Cushing's syndrome were enrolled in the department of endocrinology in West China Hospital of Sichuan University, and age- and sex-matched healthy volunteers were studied as control group. The expression level and binding affinity of GR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were examined by flow cytometry. The differences between the two groups were compared, and the correlations of GR level and affinity to serum cortisol concentration or 24 h urine free cortisol were also analyzed. **Results** There were 17 Cushing's syndrome patients and 17 healthy volunteers. The expression level and binding affinity of GR in Cushing's syndrome patients were 11.9 ± 3.1 and 6.6 ± 2.6 , while the values of normal controls were 20.6 ± 3.3 and 9.9 ± 3.2 . A significant decrease in GR expression and binding affinity in the patients with Cushing's syndrome was found. No correlation was observed between plasma cortisol concentration or 24 h urinary free cortisol and GR expression or binding affinity in Cushing's syndrome patients. **Conclusion** The expression level and binding affinity of GR are obviously decreased in Cushing's syndrome patients, which suggests 1.6 times of physiological dose of glucocorticoid for the patients with hypocortisolism after surgery, in order to overcome glucocorticoid resistance and maintain physiological function of glucocorticoid.

【Key words】 Cushing's syndrome Glucocorticoid receptor Flow cytometry

内源性库欣综合征是一严重危害患者健康的内分泌疾病,手术切除导致高皮质醇血症的垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)细胞腺瘤、肾上腺皮质腺瘤/腺癌、异位分泌ACTH肿瘤等病灶,是库欣综合征的首选治疗方法。由于患者垂体/肾上腺组织中肿瘤以外的正常ACTH细胞/肾上腺皮质细胞长期受到体内增高的糖皮质激素抑制而处于分泌功能低下的状态,因此国内外学术组织的相关指南均建议^[1-2],库欣综合征患者手术切除肿瘤后半年至1年半,需要常规予以亚生理剂量的糖皮质激素替代治疗,直至其垂体ACTH

细胞及肾上腺皮质功能恢复。

正常人糖皮质激素的分泌量约为15~25 mg/d,因此糖皮质激素的生理替代剂量一般为氢化可的松20~30 mg/d或泼尼松5~7.5 mg/d,亚生理剂量应该低于上述生理剂量。但该生理剂量的确定是基于糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)敏感性正常的前提下。如果GR敏感性降低,则上述剂量显然不足以维持其生理功能。我们在临床工作中观察到库欣综合征患者手术切除肿瘤后通常需要泼尼松15~20 mg/d,远高于推荐剂量。我们推测,库欣综合征患者体内糖皮质激素的靶细胞长期暴露于高皮质醇血症环境中,根据激素-受体的降调节原理,其GR的

敏感性很有可能发生改变。为此,本研究以库欣综合征患者为研究对象,采用流式细胞术分析其外周血单个核细胞 GR 的受体数量与结合力的改变,为库欣综合征患者术后糖皮质激素替代治疗方案提供临床资料及理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

按入院顺序依次纳入 2016 年 7 月至 2017 年 9 月于四川大学华西医院内分泌代谢科住院并诊断为内源性库欣综合征的患者。收集患者的一般资料,检测患者清晨 8 时及午夜 12 时血皮质醇水平,24 h 尿游离皮质醇水平,以及 1 mg 地塞米松过夜抑制试验次晨血皮质醇数据。根据血 ACTH 水平将患者分为 ACTH 依赖或 ACTH 非依赖性库欣综合征,前者行头部鞍区核磁共振、地塞米松大抑制试验、去氨加压素(DDAVP)刺激试验以确定 ACTH 来源,必要时行岩下窦采血测定 ACTH 水平以进一步明确其亚型;后者则行上腹部 CT 确定肾上腺肿瘤部位。

另外选择年龄及性别与库欣综合征患者匹配的健康志愿者作为对照组。检测正常组受试者的血皮质醇及 ACTH 水平。

库欣综合征组与正常对照组受试者均于清晨空腹时抽取肘静脉血 4 mL 以获取外周血单个核细胞(PBMC)。

1.2 PBMC 制备

采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法获得受试者 PBMC^[3]。具体方法如下:在 15 mL 离心管中先加入 4 mL 人血淋巴细胞分离液,将受试者 4 mL 的肝素抗凝血用移液枪沿管壁缓慢叠加于分层液面上,2 000 r/min 水平离心 20 min。离心后管内分 3 层,中间层即为单个核细胞(包括淋巴细胞和单核细胞);用移液枪吸出单个核细胞层,另置于离心管中,加入 2 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤两次,混匀并离心 1 500 r/min 10 min,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬细胞,分别取 100 μ L 置于试验管与对照管中备用。

1.3 流式细胞术检测 GR 数量

在试验管和对照管中均加入 500 μ L 固定破膜剂(eBioscience, San Diego, CA, USA),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min,2 mL 缓冲液洗涤两次,1 500 r/min 离心 7 min 后弃上清,100 μ L 缓冲液重悬细胞。试验管加入异硫氰酸荧光素标记的 GR 单克隆抗体 FITC-anti-GR 10 μ L(5E4, AbD Serotec, Dusseldorf, Germany),对照管加入等量异硫氰酸荧光素标记的小鼠 IgG1 kappa FITC-IgG1 2 μ L(BD Biosciences),避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。2 mL 缓冲液洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,300 μ L 缓冲液重悬细胞。将待检测试管置于流式细胞仪(Beckman Navios, USA)检测。

1.4 流式细胞术检测 GR 结合力

试验管中加入 2×10^{-8} mol/L FITC-Dex (Molecular Probe, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),对照管提前

10 min 加入 500 倍于 FITC-Dex 的 Dex(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)作为同型对照(与 FITC-Dex 竞争结合 GR),避光,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅孵育 60 min,每 10 min 摇匀一次。2 mL PBS 洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,将洗涤后的细胞重悬在 300 μ L 的 PBS 溶液中。将待检测试管置于流式细胞仪(Beckman Navios, USA)检测分析。

采用型号为 Beckman Coulter Navios 的流式细胞仪进行细胞样本检测,CELLQuest 软件分析结果。根据细胞前向散射信号(FSC)和侧向散射信号(SSC)双参数设门确定单个核细胞群,Cell Quest 软件获取至少 2×10^4 个细胞,进行细胞收集和数据分析,GR 数量和结合力的定量均采用平均荧光强度表示(MFI)。

1.5 统计学方法

服从正态分布、方差齐的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;若不服从正态分布或方差不齐,则用中位数(四分位间距)表示,组间比较采用 t' 。计数资料采用频数表示,以 Fisher 精确概率法进行组间比较。相关性分析选用 Pearson 相关。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组受试者临床资料及生化检测结果

本研究纳入了 17 例内源性库欣综合征的患者,男性 1 例,女性 16 例。其中库欣病 10 例,肾上腺腺瘤 3 例,异位 ACTH 综合征 3 例,双侧肾上腺大结节样增生 1 例,年龄 18~58 岁(37.2 ± 12.2 岁)。库欣综合征组患者晨 8 时与午夜 12 时血皮质醇 PTC 水平分别为(954.8 ± 229.5) nmol/L、(797.2 ± 249.5) nmol/L;24 h 尿游离皮质醇水平为(1206.1 ± 552.8) μ g,1 mg 地塞米松过夜抑制试验次晨 8 时血皮质醇均 >200 nmol/L。正常对照组 17 例(男 1 例,女 16 例),年龄 18~55 岁(34.8 ± 12.2 岁)。正常对照组清晨 8 时皮质醇水平为(379.3 ± 100.1) nmol/L。两组受试者的年龄、性别比基本一致,差异无统计学意义,库欣综合征组血皮质醇水平高于对照组($P<0.05$)。

2.2 库欣综合征组与正常对照组 GR 数量与结合力

如图 1 所示,库欣综合征患者 PBMC 的 GR 数量低于正常对照组(11.9 ± 3.1 vs. 20.6 ± 3.3),差异有统计学意义($P<0.000 1$)。库欣综合征组单个核细胞 GR 结合力(6.6 ± 2.6)低于正常对照组(9.9 ± 3.2),差异有统计学意义($P=0.002 2$)。

2.3 库欣综合征患者 GR 数量/结合力与血尿皮质醇水平的相关性分析

Pearson 相关分析未发现 GR 数量和结合力与清晨 8 时血浆皮质醇和 24 h 尿游离皮质醇存在线性相关关系。见图 2 和图 3。

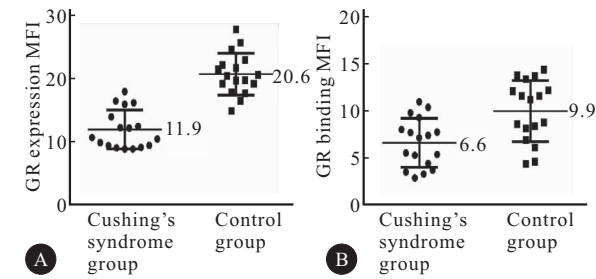


图 1 库欣综合征患者与正常对照组 GR 数量(A)与 GR 结合力(B)的散点分布图

Fig 1 Scatter plots of the expression (A) and the binding (B) of GR in Cushing's syndrome and control subjects

MFI: Mean fluorescence intensity

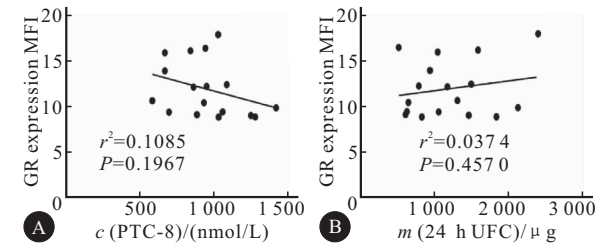


图 2 库欣综合征患者 GR 数量与清晨 8 点血浆皮质醇(A)、24 h 尿游离皮质醇(B)的相关性分析

Fig 2 Correlations between the expression of GR and serum cortisol concentration (A) or 24 h urine free cortisol (B) in Cushing's syndrome

MFI: Mean fluorescence intensity

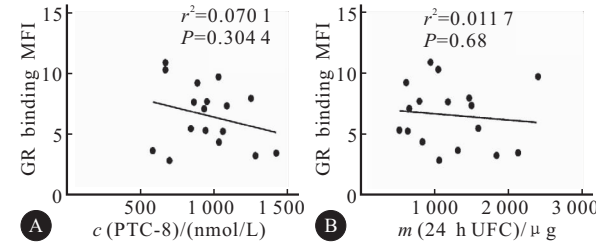


图 3 库欣综合征患者 GR 结合力与清晨 8 点血浆皮质醇(A)、24 h 尿游离皮质醇(B)的相关性分析

Fig 3 Correlations between the binding of GR and serum cortisol concentration (A) or 24 h urine free cortisol (UFC) (B) in Cushing's syndrome

MFI: Mean fluorescence intensity

2.4 肾上腺来源与垂体来源(库欣病)库欣综合征患者 GR 数量/结合力的比较

10 例库欣病患者的血、尿皮质醇水平分别为(963.7±248.8) nmol/L、(1 236.2±665.8) μg/24 h,1 mg 地塞米松过夜抑制试验晨血皮质醇水平为 588(400,876) nmol/L; 3 例肾上腺腺瘤患者血、尿皮质醇平均水平分别约为 913.7 nmol/L、1 116.4 μg/24 h,1 mg 地塞米松过夜抑制试

验晨血皮质醇水平为 739 nmol/L。如图 4 所示,库欣病患者 GR 数量、结合力大小分别为 10.5(9.3,16.2)、6.7±2.5;肾上腺腺瘤患者 GR 数量、结合力大小平均约为 11.3、6。肾上腺来源与垂体来源的库欣综合征患者其 GR 数量或结合力基本一致,差异无统计学意义($P>0.05$)。

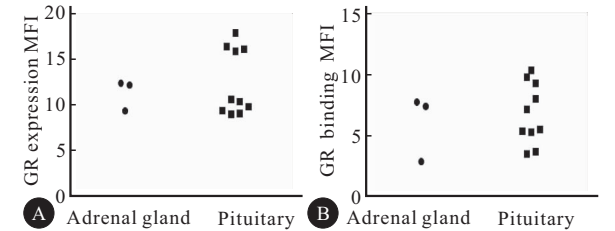


图 4 肾上腺来源与垂体来源库欣综合征患者 GR 数量(A)、GR 结合力(B)的散点分布图

Fig 4 Scatter plots of the expression (A) and the binding (B) of GR in patients with Cushing's syndrome from adrenal gland and pituitary

MFI: Mean fluorescence intensity

3 讨论

库欣综合征患者在手术切除肿瘤后的低皮质醇血症期间如何进行糖皮质激素替代治疗,一直是困扰内分泌专业医师的临床难题。糖皮质激素的替代治疗剂量过大不利于患者自身肾上腺皮质功能的恢复,并可能加重患者已存在的库欣综合征的各种并发症如高血压、骨质疏松等。而糖皮质激素替代治疗剂量不足,又可能使患者处于肾上腺皮质功能低下的状态,患者极度乏力、纳差,生活质量差,在应激状态下容易发生肾上腺危象,危及生命。而目前相关指南均推荐,库欣综合征患者手术切除肿瘤后需要常规予以亚生理剂量的糖皮质激素替代治疗,认为这个推荐剂量符合正常人皮质醇的分泌剂量,因而可以避免不足量或过量治疗。由于没有确切的糖皮质激素需要量的可靠的标志以及相关临床研究,初始剂量都是根据临床经验估计,进一步调整剂量则依赖临床表现、患者的意愿、合并的疾病。然而,推荐替代剂量往往是基于 GR 敏感性正常的前提下所确定的,并未考虑库欣综合征患者 GR 敏感性是否发生改变。因此,探索合适的糖皮质激素替代治疗方案对于库欣综合征患者术后尽快恢复并尽可能减少糖皮质激素的不良反

本研究采用流式细胞术检测了 17 例库欣综合征患者 PBMC 的 GR 数量以及 GR 与糖皮质激素的结合力,并与年龄及性别配对的 17 例健康志愿者比较。结果发现,库欣综合征患者体内 PBMC 的 GR 数量降低,仅为对照组的 58%。同时,糖皮质激素与 GR 的结合力亦低于对照组,仅为对照

组的 67%。即库欣综合征患者 PBMC 的 GR 对糖皮质激素的敏感性较正常人至少降低 60%。

本研究进一步分析了库欣综合征患者血、尿皮质醇水平与 GR 数量/结合力之间是否存在相关关系以及不同病因(垂体来源与肾上腺来源)与 GR 数量/结合力之间是否存在相关关系。结果显示,库欣综合征患者血、尿皮质醇水平的高低与 GR 的敏感性之间无相关关系。同样,垂体来源与肾上腺来源的库欣综合征患者靶细胞 GR 的敏感性亦无明显差异。提示,库欣综合征患者体内 GR 敏感性降低可能与患者的长期高皮质醇血症有关,而患者个体之间血、尿皮质醇水平的差异对靶细胞 GR 的敏感性影响不大。

HUIZENGA 等^[4]研究发现库欣综合征患者 GR 结合力降低而数量无差异,且 GR 结合力与皮质醇水平呈负相关关系。但在本研究中,库欣综合征患者 GR 数量较正常人降低。对于该结果可能的一种解释是不同患者 PBMC 的各细胞成分比例不同,有研究表明淋巴细胞与单核细胞两者 GR 数量或结合力存在着一定差异^[5],由于本研究并未分析不同细胞间 GR 敏感性,而无法评估其是否存在差异。另一方面,GR 数量的降低可能是由于长期暴露于高皮质醇水平而机体通过自身调节的结果,与大量研究表明外源性使用 GC 会使 GR 数量和结合力下调类似。同时,本研究中库欣综合征患者和正常对照组 GR 数量分别波动于 8.8~17.9、14.8~27.7,两者之间存在着一定重叠,我们不排除随着样本数量的增大,这种差异会变小的可能。

GR 是糖皮质激素生理和药理作用的关键环节^[6],糖皮质激素的效应需要完整且足量的 GR 介导而实现。研究表明,健康人外周血单个核细胞中 GR 数量与激素反应性密切相关^[7],临床上使用糖皮质激素的疗效亦取决于 GR 数量及其与 GC 的亲和力^[8-9]。如果生理水平的糖皮质激素不能发挥应有的生理作用,即 GR 对糖皮质激素的反应性降低,称为糖皮质激素抵抗。原发性糖皮质激素抵抗综合征(primary glucocorticoid resistance syndrome, PGRS)就是由于 GR 基因缺陷所致的 GR 受体异常而使靶组织对 GC 不敏感从而导致的一系列临床综合征^[10-12]。库欣综合征患者肿瘤切除需要高于生理剂量的糖皮质激素替代方能维持其生理功能,提示库欣综合征患者存在不同程度的糖皮质激素抵抗。本研究的结果证实了这一推测。根据本研究结果,库欣综合征患者术后糖皮质激素的替代治疗剂量应该较生理剂量增加 60%左右。我们建议,在手术后 1 月内可使用泼尼松 10~15 mg/d 或氢化可的松 40~60 mg/d,以克服患者体内各组织器官的糖皮质激素抵抗,维持糖皮质激素的生理作用。此后,根据患者的恢复情况逐渐减少糖皮质激素剂量,术后半年至 1 年待患者肾上腺皮质功能恢复后方可停止糖皮质激素替代治疗。

由于库欣综合征是一较少见的内分泌疾病,故本研究所纳入的病例数较少,本研究的结论尚需增加样本量后进一步证实。此外,库欣综合征患者术后糖皮质激素抵抗的状态何

时能恢复以及是否能完全恢复,尚需长期的随访观察。

参 考 文 献

- [1] NIEMAN LK, BILLER BM, FINDLING JW, *et al.* Treatment of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(8):2807-2831.
- [2] 中华医学会内分泌学分会. 库欣综合征专家共识(2011 年). *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(2):96-102.
- [3] MOLIJN GJ, KOPER JW, VAN UFFELEN CJ, *et al.* Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leucocyte in patients with sepsis or septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995, 43(2):197-203.
- [4] HUIZENGA NA, DE HERDER WW, KOPER JW, *et al.* Decreased ligand affinity rather than glucocorticoid receptor down-regulation in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2000, 142(5):472-476.
- [5] LIPPMAN M, BARR R. Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*, 1977, 118(6):1977-1981.
- [6] MULLER MR, RENKAWITZ R. The glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1088(2):171-182.
- [7] TANAKA H, ICHIKAWA Y, AKAMA H, *et al.* *In vivo* responsiveness to glucocorticoids correlated with glucocorticoid receptor content in peripheral blood leukocytes in normol humans. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1989, 121(4):470-476.
- [8] KOFLER R, CHMIDT SS, KOFLER A, *et al.* Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation: resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *J Endocrinol*, 2003, 178(1):19-27.
- [9] TISSING WJ, MEIJERINK JP, DEN BOER ML, *et al.* Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2003, 17(1):17-25.
- [10] CHROUSOS GP, VINGERHOEDS A, BRANDON D. Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *J Clin Invest*, 1982, 69(6):1261-1269.
- [11] CHROUSOS GP, DETERA-WADLEIGH SD, KARL M. Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann Intern Med*, 1993, 119(11):1113-1124.
- [12] CHARMANDARI E, KINO T, VOTTERO A. Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission and clinical phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4):1939-1949.

(2018-06-25 收稿, 2018-09-21 修回)

编辑 汤洁