DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.015
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1459-04

论著

CRH通过PKA途径调节大鼠下丘脑CRH表达的研究

陈立朝[1],许民辉[2],周继红[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]神经外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)刺激下丘脑神经元表达CRH的信号调控机制。方法 通过大鼠下丘脑脑片实验模型,运用免疫组织化学、Western blot技术,观察CRH激活下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素Ⅰ型受体(corticotropin-releasing hormone type 1 receptor, CRH1R)后蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)信号通路的活性变化,及其与CRH表达的关系。结果 CRH可引起下丘脑脑片磷酸化PKA、磷酸化CREB及CRH含量明显增加,而CP-154526、H89可显著抑制磷酸化PKA、磷酸化CREB及CRH含量的增加。结论 在严重创伤应激反应中,CRH通过PKA途径实现对下丘脑神经元CRH的表达的超短正反馈调节。

关键词:应激反应;下丘脑脑片;促肾上腺皮质激素释放激素;促肾上腺皮质激素释放激素受体;蛋白激酶A;cAMP反应元件结合蛋白;CP-154526;H89;大鼠
中图法分类号:R335;R338.27;R977.11 文献标识码:A

Corticotropin-releasing hormone regulates corticotropin-releasing hormone mRNA expression through PKA signal pathway in rat hypothalamic slices *in vitro*

CHEN Li-zhao[1], XU Min-hui[2], ZHOU Ji-hong[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, [2]Department of Neurosurgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the signal regulatory mechanism of expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulated neurons of hypothalamic slices in rats *in vitro*. **Methods** Model of hypothalamic slices of rats was established. After CRH stimulatation of corticotropin-releasing hormone type 1 receptor (CRH1R) of hypothalamic slices in rats *in vitro*, the changes of activity of protein kinase A (PKA) signal passway were observed by immunocytochemical method and Western blotting. The relationship between the changes and CRH mRNA expression was also observed. **Results** CRH could cause the remarkable increase in phosphorylated PKA, phosphorylated CREB, and CRH content in hypothalamic slices in rats. However, CP154526 or H89 could have significant inhibitory effect on the synthesis of P-PKA, P-CREB, and CRH. **Conclusion** PKA signal passway can regulate the ultrashort positive feedback of CRH secretion in the rat hypothalamus in stress due to severe trauma.

Key words: stress; hypothalamic slice *in vitro*; corticotropin-releasing hormone; corticotropin-releasing hormone receptor; protein kinase A; cAMP; response element-binding protein; CP-154526; H89; rat

应激反应的主要特征是以下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)的激活为核心的生理和心理反应。HPA轴激活的中枢控制是十分复杂的,在这一系列神经内分泌调节过程中,下丘脑合成和释放的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)起着关键的作用,它控制着HPA轴的兴奋水平[1~3]。下丘脑神经元表达分泌的CRH是否直接通过与下丘脑神经元表达的CRH1R结合,通过何种信号途径启动下丘脑神经元CRH的转录,目前还不十分清楚。由于HPA激活后的中枢调控十分复杂,在体研究难以实现,因此需要建立可控性好的体外实验模型模仿在体创伤应激反应,研究HPA激活的关键因素CRH刺激下丘脑后,是否直接通过与下丘脑神经元表达的CRH1R结合,通过何种信号途径启动下丘脑神经元CRH的转录,为调控创伤性应激反应提供理论和实验依据。Ono[4]提出下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)存在CRH神经元超短正反馈理论,后来许多研究证实存在这一理论,但其机制尚未阐明。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054201)
作者简介:陈立朝(1971-),男,湖南省沅江市人,硕士,主治医师,主要从事严重创伤早期下丘脑的应激调控机制方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757243
收稿日期:2003-07-11;修回日期:2003-12-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 试剂

CP-154526（Pfizer公司，Yuhpyng Chen博士惠赠）；H89（Calbiochem）；CRH（sigma）；羊抗鼠PKA（磷酸化）抗体（Santa Cruz）；兔抗鼠CREB（磷酸化）抗体（Cell Signal）；HRP标记二抗（兔IgG）（北京中山生物技术公司）；HRP标记二抗（山羊IgG）（Sigma）；考马斯亮蓝R-250（Coomassie Blue）（Sigma）；PVDF膜（NEC Co）；化学发光试剂（NEC Co）；X光感光胶片（厦门柯达公司）。

1.2 动物及实验分组

成年雄性Wistar大鼠（由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供）156只，体质量180～250 g，大鼠分笼饲养（6只/笼）于设定温度和8:00～20:00定时光照的房间，食物和水可自由摄取。饲养1周后，开始实验。实验前禁食12 h，自由饮水。

1.2.1 分组原则及标准 用浓度为2 500 pg/ml[5]的外源性CRH刺激培养的下丘脑脑片，2 500 pg/ml的外源性CRH模拟严重创伤应激后下丘脑分泌的CRH浓度刺激培养的下丘脑脑片，复制严重创伤应激后下丘脑形态学变化及CRH、CRH1R表达的模型，观察CRH对培养的下丘脑脑片磷酸化蛋白激酶A（phosphorylated protein kinase A，P-PKA）含量、磷酸化CREB（phosphorylated CREB，P-CREB）含量及CRHmRNA表达的影响。拮抗剂：CRH1R拮抗剂为CP-154526，浓度为500 μmol/L；PKA拮抗剂为H89，浓度为15 μmol/L。

1.2.2 分组内容 时相点选择：40、80、120、160、200、240 min。对照组、CRH刺激组从脑片在32～35 ℃的人工脑脊液（ACSF）灌流（1～1.5 ml/min）孵育60 min后开始计时；拮抗+刺激组从用含拮抗剂及浓度为2 500 pg/ml的外源性CRH的ACSF灌流开始计时。

对照组：脑片在32～35 ℃的ACSF灌流（1～1.5 ml/min）孵育60 min后，继续孵育240 min。实验过程中，始终只用氧合的ACSF灌流。

刺激组：脑片在32～35 ℃的ACSF灌流（1～1.5 ml/min）孵育60 min后，用含浓度为2 500 pg/ml的外源性CRH的ACSF灌流240 min。

CRH1R拮抗+刺激组：脑片在32～35 ℃的ACSF灌流（1～1.5 ml/min）孵育60 min后，用含CP-154526（500 μmol/L）的ACSF灌流，30 min后用含CP-154526（500 μmol/L）及浓度为2 500 pg/ml的外源性CRH的ACSF灌流240 min。

PKA拮抗+刺激组：拮抗剂为H89（15 μmol/L），余同CRH1R拮抗+刺激组。

1.3 脑片模型的制作

按照文献[6]方法改进，将大鼠快速断头，沿矢状缝剪开皮肤，剥去两侧顶骨、颞骨和硬脑膜，取出脑组织，置于0～4 ℃预先充氧（95% O_2 和5% CO_2）饱和的ACSF中。根据解剖标志（视交叉、乳头体为前、后界，左右下丘脑沟为侧界，深约4 mm），制备含有下丘脑的脑组织块约4 mm×4 mm×4 mm，切片槽内倒入ACSF，浸没脑组织块，沿冠状面切得约500 μm厚的脑片。

ACSF的成分：实验用ACSF为改良Yamamoto溶液。

灌流装置及方法：灌流用浴槽的外槽内盛有自来水，经由直流恒温仪使水温保持在所需水平。内槽为一个1 ml的小室，内有水平放置的尼龙细丝网。实验中，脑片置于尼龙网上，氧合的ACSF经蠕动泵以1～1.5 ml/min恒速推动，由入水口进入内槽，浸没脑片；再由对侧的出口流出。脑片在室温的人工脑脊液（ACSF）中平衡90 min后移入内槽的小室中，缓慢升温至32～35 ℃。实验期间始终向ACSF中通混合氧。ACSF（脑片）温度由两台循环水浴调控，温度变化速率为（1.5±0.3）℃/min。

1.4 组织取材

培养结束后，取240 min时相点的对照组、刺激组、CRH1R拮抗+刺激组、PKA拮抗+刺激组脑片用于免疫组化（常规SABC法）观察CRH表达（后两组只作免疫组化）。

培养结束后，取各时相点脑片置于EP管内，置液氮内保存，用于Western blot实验检测下丘脑脑片P-PKA、P-CREB含量[7]。

1.5 观测指标

①CRH对培养下丘脑脑片CRH及CRH1R表达的影响；②CRH对培养下丘脑脑片P-PKA、P-CREB含量的影响。

1.6 统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用SPSS软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学

对照组、CRH1R拮抗+刺激组、PKA拮抗+刺激组有极少量CRH免疫组化阳性黄色反应物的分布于下丘脑神经元的胞浆；刺激组分布于下丘脑神经元胞浆的CRH免疫组化阳性黄色反应物的着色显著加深。

2.2 CRH对培养下丘脑脑片PKA、CREB活化的影响

Western blot结果显示，CRH刺激下丘脑脑片后，于40、80 min P-PKA含量明显增加，于2 h回落至较低水平，于160 min P-PKA含量再次升高；40、80、120 min P-CREB含量明显增加，于160 min回落至较低水平，于200 min P-CREB含量再次升高。CP-154 526可明显抑制下丘脑脑片P-PKA含量增加，CP-154 526、H89可明显抑制下丘脑脑片P-CREB含量增加。刺激组与同时相点的对照组相比较，差异非常显著（$P<0.01$）（表1、2）。

表1 CRH对下丘脑脑片PKA活化的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of CRH on PKA activation in hypothalmic slices of rats（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

	Control	Content of P-PKA（A/mm²）		
		Stimulation	CP154526+stimulation	H89+stimulation
40 min	0.365±0.114	1.007±0.387**	0.408±0.114	0.389±0.079
80 min	0.362±0.087	2.261±0.687**	0.772±0.210	0.687±0.132
120 min	0.365±0.102	1.357±0.420**	0.399±0.086	0.402±0.046
160 min	0.357±0.098	1.415±0.527**	0.449±0.132	0.386±0.121
200 min	0.358±0.112	1.424±0.416**	0.525±0.137	0.463±0.074
240 min	0.363±0.108	1.588±0.443**	1.247±0.266*	0.822±0.137*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　CRH 对下丘脑脑片 CREB 磷酸化的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of CRH on phosphorylation of CREB in hypothalmic slices of rats ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Content of P-CREB (A/mm^2)		
		Stimulation	CP154526+stimulation	H89+stimulation
40 min	0.332±0.021	1.604±0.122 **	0.479±0.046	0.439±0.035
80 min	0.324±0.037	2.211±0.234 **	0.579±0.038	0.578±0.028
120 min	0.332±0.022	2.787±0.188 *	0.545±0.019	0.355±0.023
160 min	0.326±0.024	1.723±0.120 **	0.697±0.036 *	0.601±0.015
200 min	0.321±0.019	1.986±0.137 **	0.529±0.033	0.433±0.036
240 min	0.328±0.016	1.768±0.108 **	0.883±0.068 *	0.789±0.054 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

3.1　下丘脑脑片动物模型的制备

创伤应激反应中 HPA 轴激活的中枢控制是十分复杂的, 在这一系列神经内分泌调节过程中, 下丘脑合成和释放的 CRH 起着关键的作用, 它控制着 HPA 轴的兴奋水平。随着对应激反应研究的深入, 需要建立可控性和重复性较好的体外实验模型模拟在体创伤应激反应。

本研究成功制备了下丘脑脑片培养模型, 并有如下优点: ①下丘脑位置深, 采用离体脑片技术直接将刺激因素与拮抗因素灌流到这些脑区, 解决了在体实验中的困难。②在离体情况下, 无 HPA 的产物(ACTH、GC)、心房钠尿肽等因素影响, 可以较容易在实验过程中控制实验条件, 控制脑片的外周微环境。但在实践过程中脑片技术仍有一些局限性: ①切断了上、下的神经联络。②技术难度大, 许多环节都可影响脑片的存活。

3.2　CRH 对培养下丘脑脑片 PKA、CREB 活化的影响

CRH 受体属于 G 蛋白耦联受体, 在大鼠, 其存在 3 种亚型, CRH1R、CRH2aR 和 CRH2bR。CRH1R 主要分布于 CNS, CRH2aR 和 CRH2bR 主要分布于外周组织, 都以 cAMP 为第二信使。

由 415 个氨基酸残基构成的大鼠 CRH1R, 主要分布于中枢神经系统, 外周组织(如皮肤、卵巢、子宫平滑肌)也有 CRH1R 表达。在生理条件下, 大鼠 CRH-1RmRNA 在嗅球、大脑皮层、红核、小脑、垂体中表达较高, 而在下丘脑中表达非常低。急性应激、慢性应激、ADX+CORT、CRH、LPS 使下丘脑 PVN 区 CRH1R 的表达明显增强; 大剂量 GC 及饥饿对下丘脑 PVN 区 CRH1R 的表达有抑制作用[4~6]。

CRH 与受体结合后, 通过 G 蛋白耦联, 激活腺苷酸环化酶, 使细胞内 cAMP 浓度增加, 后者激活 PKA, 使靶细胞蛋白磷酸化, 从而调节细胞反应。cAMP 对细胞反应的调节主要有 2 种方式: ①cAMP 通过激活 PKA 介导蛋白磷酸化及磷酸酶介导的脱磷酸化传递信号; PKA 全酶由 4 个亚基(R2C2), R 亚基上有 2 个 cAMP 结合位点, 与 cAMP 结合后, R 亚基和 C 亚基解离, 使 C 亚基激活而表现出催化活性, 导致靶蛋白磷酸化, 而产生生理效应。其中 cAMP 浓度的高低直接影响 R 亚基与 cAMP 的结合量, 控制细胞的 C 亚基释放率和释放速度。②当 cAMP 结合到 PKA 的调节亚基而激活 PKA, 导致 PKA 的催化亚基移入核内, 使 cAMP 激活的转录因子-CREB 的转录激活区域磷酸化, CREB 活性调节的关键是 N 端转录活性区附近的第 133 位点上的丝氨酸(serine, Ser)的磷酸化, 作用于 cAMP 反应元件(cAMP respons-element, CRE)位点后可表现出激活转录的活性, 从而调节基因转录, CRE 序列存在于 CRH 基因的上游调节区, 而且已证明其功能与 CRH 转录活性有关。非应激状态下 CREB 广泛存在于下丘脑的细胞核中, 而 P-CREB 的只散在于 PVN 中, 应激状态下 PVN 中 P-CREB 明显增加[2~11]。

本实验表明, CRH 刺激下丘脑脑片后, 各组 P-PKA、P-CREB 含量明显提高, 而 P-PKA、P-CREB 含量升高后回落, 然后再次升高的现象, 可能与下丘脑脑片中 CRH1R 表达的变化有关; CRH1R 拮抗剂 CP-154526 可明显抑制 CRH 刺激的下丘脑脑片 P-PKA、P-CREB 含量增加, 说明在应激反应中, CRH1R 在下丘脑 PVN 神经元的激活中起重要的介导作用, 同时也说明 CRH 可直接通过与 CRH1R 结合调控 CRH 神经元的活性。PKA 阻滞剂 H89 可明显抑制 CRH 刺激的下丘脑脑片 P-PKA、P-CREB 含量增加。提示 PKA 信号物质参与了 CRH 调控的下丘脑神经元功能变化的过程, 主要通过 CRH1R 来调控[8~11]。

3.3　CRH 对培养下丘脑脑片 CRH 表达的影响

本实验结果提示, 对照组下丘脑有少量的 CRH 表达, 可观察到很低和散在的 CRH 免疫组化阳性黄色反应物的分布于下丘脑神经元的胞浆, 说明在生理情况下下丘脑具有一定的神经内分泌功能。CRH 刺激下丘脑脑片后, 分布于下丘脑神经元胞浆的 CRH、CRH1R 免疫组化阳性黄色反应物的着色显著加深, 而用 CRH1R 拮抗剂 CP-154526 拮抗+CRH 刺激或 PKA 拮抗剂 H89 拮抗+CRH 刺激处理的大鼠下丘脑脑片后, 可明显减少 CRH 刺激引起下丘脑 CRH 的表达。本实验结果与在体创伤应激及脑室注射 CRH 的结果一致[12, 13]。在应激反应中, CRH 可能通过选择性的刺激 CRH1R 表达并激活其 CRH1R、活化的 PKA 信号通路参与调控, 导致自身基因的表达, 从而使下丘脑 PVN 合成和分泌的 CRH 增加。而在体实验随后出现的 CRH

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达回落，可能是由于机体(如：糖皮质激素等)对下丘脑室旁核的负反馈调节所致。

通过本研究表明，外源性CRH模拟严重创伤应激后下丘脑分泌CRH浓度刺激培养的下丘脑脑片，成功地复制出严重创伤应激后下丘脑形态学变化及CRH高表达的模型，外源性CRH刺激培养的下丘脑脑片后，出现下丘脑脑片中P-PKA、P-CREB及CRH的含量明显升高。外源性CRH直接与下丘脑脑片的CRH1R结合后，通过G蛋白耦联，激活腺苷酸环化酶，使细胞内cAMP浓度增加，cAMP结合到PKA的调节亚基而激活PKA，导致PKA的催化亚基移入核内，使转录因子-CREB的N端转录活性区附近的第133位点上的Ser的磷酸化-转录激活区域磷酸化，P-CREB与CRH基因的启动区域CRE结合后，启动下丘脑神经元CRH的基因表达，其表达量随外源性CRH的刺激浓度增加而增加，进一步说明了在应激反应中下丘脑可能存在超短正反馈调节下丘脑神经元表达分泌CRH。通过本研究还表明，PKA阻滞剂H89、CRH1R拮抗剂CP-154526不能完全抑制CRH刺激的下丘脑脑片CRH含量增加，说明CRH除主要通过与CRH1R结合激活PKA信号通路之外，可能还与下丘脑CRH2R和其它受体结合后激活其它信号通路，共同调控下丘脑CRH的表达。

参考文献：

[1] Vale W, Spiess J, Rivier C, *et al*. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin[J]. Science, 1981, 213(4514): 1394—1397.

[2] Lezoualc'h F, Engert S, Berning B, *et al*. Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappaB[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(1): 147—159.

[3] Preil J, Muller M B, Gesing A, *et al*. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2 [J]. Endocrinology, 2001, 142(11): 4946—4955.

[4] Ono N, Samson W K, McDonald J K, *et al*. Effect of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the scretion of anterior pituitary hormones[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(22): 7787—7790.

[5] Samson W K, Taylor M M, Follwell M, *et al*. Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates[J]. Regul Pept, 2002, 104(1—3): 97—103.

[6] Morris M J, Pavia J M. Stimulation of neuropeptide Y overflow in the rat paraventricular nucleus by corticotropin-releasing factor[J]. J Neurochem, 1998, 71(4): 1519—1524.

[7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京：高等教育出版社，1993. 59.

[8] Morris J F. Membrane retrieval at neurosecretory axon endings[J]. Nature, 1976, 261(5562): 723—725.

[9] Grinevich V, Max M, Herman J P, *et al*. Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats[J]. J Neuroendocrinol, 2001, 13(8): 711—723.

[10] Hillhouse E W, Grammatopoulos D K. Control of intracellular signalling by corticotropin-releasing hormone in human myometrium[J]. Front Horm Res, 2001, 27: 66—74.

[11] Grammatopoulos D K, Randeva H S, Levine M A, *et al*. Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2 beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(12): 2076—2091.

[12] Ellis L, Gilston V, Soo C C, *et al*. Activation of the transcription factor NF-kappa B in the tat air pouch model of inflammation[J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(4): 303—307.

[13] Bale T L, Contarino A, Smith G W, *et al*. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress[J]. Nat Genet, 2000, 24(4): 410—414.

(编辑 张 宁)

欢迎订阅《中华烧伤杂志》

《中华烧伤杂志》是中华医学会主办的高级专业学术期刊，读者对象为医学院校、科研机构各级从事烧伤救治的医生，以及与烧伤防治研究相关学科的人员。烧伤及其并发症几乎涉及医学科学所有边缘学科，与病理生理学、病理学、免疫学、微生物学、分子生物学、生物工程学均有密切关系。临床面临的休克、感染、营养、内脏并发症、水、电解质紊乱及创面修复等难题都很突出。本刊将择优刊登上述外科基本问题以飨读者，为读者提供烧伤及相关学科的新理论、新技术、新方法、新经验。《中华烧伤杂志》由国内著名烧伤外科及相关学科专家组成编委会，杂志具有科学性、实用性，内容新颖，可读性强，是目前国内惟一的全国性烧伤学术界权威刊物。本刊为双月刊，大16开，64页亚光铜印刷并配彩图，每期10元。邮发代号：78—131。欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。

地 址：重庆市西南医院《中华烧伤杂志》编辑部 邮 编：400038

电 话：(023)68754670、65460278 传真：(023)65460398 E-mail：cmashz@mail.tmmu.com.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net