论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0964-04

PKA信号通路调控体外培养大鼠脑片的CRH mRNA表达的研究

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

提 要:目的 探讨大鼠下丘脑神经元表达促肾上腺皮质激素释放激素(CRH) mRNA的蛋白激酶A(PKA)信号调控机制。**方法** 通过大鼠下丘脑脑片实验模型,运用Western blot及逆转录多聚合酶链反应(RT-PCR)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(CRH1R)后PKA信号通路的活性变化,及其与CRH mRNA表达的关系。**结果** CRH可引起下丘脑脑片磷酸化PKA、磷酸化环腺苷一磷酸反应元件结合蛋白(CREB)及CRH mRNA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 mRNA含量的增加。**结论** 在下丘脑离体脑片培养条件下,CRH可通过PKA途径实现对下丘脑神经元CRH mRNA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mRNA;促肾上腺皮质激素释放激素受体

中图法分类号: Q555.7; R322.81; R394 **文献标识码:** A

Protein kinase A signal pathway regulating corticotropin-releasing hormone mRNA expression in hypothalamic slice of rats *in vitro*

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

Abstract: Objective To investigate protein kinase A (PKA) signal regulatory mechanism of corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA expression, after CRH stimulated neuron of hypothalamic slices in rats *in vitro*. **Methods** After CRH stimulated corticotropin-releasing hormone type 1 receptor (CRH1R) of hypothalamic slices in rats *in vitro*, the changes of activity of PKA signal pathway and their relationship with CRH mRNA expression were observed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting. **Results** CRH may cause the remarkable increase in phosphorylated PKA (P-PKA), phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (P-CREB) and CRH mRNA content in hypothalamic slices in rats. However, CP-154526 or H89 could have significant inhibition effects on the synthesis of P-PKA, P-CREB and CRH. **Conclusion** PKA signal pathway in ultrashort positive feedback control of CRH secretion in hypothalamus in the stress due to severe traumas.

Key words: stress; hypothalamic slices *in vitro*; corticotropin-releasing hormone mRNA; corticotropin-releasing hormone receptor

下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)激活的中枢调控十分复杂[1,2],由下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)神经元表达的CRH在HPA中起关键作用,1985年Ono[3]提出下丘脑PVN存在CRH神经元超短正反馈理论,后来有研究认为下丘脑PVN CRH神经元的CRH的表达可能主要通过PKA信号通路调控[4],但其机制尚未阐明。在体研究下丘脑PVN的CRH表达的信号调控机制难以实现,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,是否与下丘脑神经元表达的促肾上腺皮质激素释放激素Ⅰ型受体(corticotropin-releasing hormone type 1 receptor, CRH1R)结合,主要通过蛋白激酶A(PKA)信号途径启动下丘脑神经元CRH

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 of China Plan ("973" Project, G1999054201)

作者简介:陈立朝(1971-),男,湖南省沅江市人,硕士,主治医师,主要从事脑外伤的基础及临床方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68757243

通讯作者:周继红,电话:(023)68757854,E-mail:zhoujh@163.net

收稿日期:2004-10-22;修回日期:2004-12-09

的转录，为调控创伤性应激反应提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

CP-154526(Pfizer)；H89(Calbiochem)；CRH(Sigma)；羊抗鼠磷酸化蛋白激酶 A(protein kinase A, P-PKA)抗体(Santa Cruz)；兔抗鼠磷酸化环腺苷一磷酸反应元件结合蛋白（phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, P-CREB）抗体(Cell Signal)；二抗试剂盒(Sigma)；考马斯亮蓝 R-250（Sigma)；化学发光试剂(NEC)；X 线感光胶片(厦门柯达公司)；逆转录多聚合酶链反应 RT-PCR 试剂盒(Boehringer Mannheim, Sigma, Promega)等。

成年雄性 Wistar 大鼠 288 只(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)，体质量 180～250 g，大鼠分笼饲养(6 只/笼)于设定温度和定时光照的房间，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　动物分组

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，观察 CRH 对培养的下丘脑脑片 P-PKA 含量、P-CREB 含量及 CRH mRNA 表达的影响。拮抗剂：CRH1R 拮抗剂为 CP-154526（500 μmol/L)；PKA 拮抗剂为 H89（15 μmol/L)。分组时相点选择：40、80、120、160、200、240 min。对照组为脑片在 32～35 ℃的人工脑脊液（artificial cerebrospinal fluid, 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。刺激组为脑片在 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。CRHlR 拮抗＋刺激组为脑片在 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＋刺激组是拮抗剂为 H89（15 μmol/L)，余同 CRHlR 拮抗＋刺激组。

1.3　脑片模型的制作

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。实验用 ACSF 为改良 Yamamoto 溶液。

1.4　灌流装置及方法

脑片在室温的 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。

1.5　组织取材

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 实验及 RT-PCR 实验检测下丘脑脑片 P-PKA、P-CREB 及 CRH mRNA 含量。

1.6　观测指标

CRH 对培养下丘脑脑片 CRH mRNA 表达的影响及对 P-PKA、P-CREB 含量的影响。

1.7　统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　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-154526 可明显抑制下丘脑脑片 P-PKA 含量增加，CP-154526、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 对培养下丘脑脑片 PKA 活化的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Content of P-PKA after CRH stimulated hypothalamic slices in rats *in vitro* ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Content of P-PKA (Odu/mm²)					
	40 min	80 min	120 min	160 min	200 min	240 min
Stimulation	1.007±0.387**	2.261±0.687**	1.357±0.420**	1.415±0.527**	1.424±0.416**	1.588±0.443**
CP-154526＋Stimulation	0.408±0.114	0.772±0.210	0.399±0.086	0.449±0.132	0.525±0.137	1.247±0.266*
H89＋Stimulation	0.389±0.079	0.687±0.132	0.402±0.046	0.386±0.121	0.463±0.074	0.822±0.137*
Control	0.365±0.114	0.362±0.087	0.365±0.102	0.357±0.098	0.358±0.112	0.363±0.108

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

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

Tab 2　Content of P-CREB after CRH stimulated hypothalamic slices in rats *in vitro* ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Content of P-PKA (Odu/mm²)					
	40 min	80 min	120 min	160 min	200 min	240 min
Stimulation	1.604±0.122**	2.211±0.234**	2.787±0.188*	1.723±0.120**	1.986±0.137**	1.768±0.108**
CP-154526＋Stimulation	0.479±0.046	0.579±0.038	0.545±0.019	0.697±0.036*	0.529±0.033	0.883±0.068*
H89＋Stimulation	0.439±0.035	0.578±0.028	0.355±0.023	0.601±0.015	0.433±0.036	0.789±0.054*
Control	0.332±0.021	0.324±0.037	0.332±0.022	0.326±0.024	0.321±0.019	0.328±0.016

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

2.2 CRH 对培养下丘脑脑片 CRH mRNA 表达的影响

CRH 刺激下丘脑脑片后 40 min 后，CRH mRNA 含量呈逐渐增加的趋势，各刺激组与对照组相比较差异非常显著（$P<0.01$）；CP-154526、H89 可明显抑制 CRH 刺激下丘脑神经元 CRH mRNA 含量增加，CRH 刺激组与对照组、CRHlR 拮抗 + 刺激组、PKA 拮抗 + 刺激组相比较差异显著（$P<0.01$）（表 3）。

表 3 CRH 对培养下丘脑脑片 CRH mRNA 表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Content of CRH mRNA after CRH stimulated hypothalamic slices in rats *in vitro* ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Content of P-PKA (Odu/mm^2)					
	40 min	80 min	120 min	160 min	200 min	240 min
Stimulation	0.588 ± 0.042	1.485 ± 0.113**	1.554 ± 0.068**	1.634 ± 0.054**	1.755 ± 0.063**	2.766 ± 0.082**
CP-154526 + Stimulation	0.412 ± 0.028	0.425 ± 0.043	0.577 ± 0.047	0.675 ± 0.039*	0.735 ± 0.054*	1.487 ± 0.144**
H89 + Stimulation	0.427 ± 0.037	0.444 ± 0.052	0.543 ± 0.098	0.602 ± 0.123	0.425 ± 0.096	0.921 ± 0.083**
Control	0.308 ± 0.019	0.315 ± 0.021	0.298 ± 0.017	0.310 ± 0.024	0.304 ± 0.020	0.306 ± 0.023

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

3 讨论

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。

本研究成功建立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、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。

CRH 受体属于 G 蛋白耦联受体，在大鼠中存在 3 种亚型——CRHlR、CRH2aR 和 CRH2bR。CRHlR 主要分布于中枢神经系统，CRH2aR 和 CRH2bR 主要分布于外周组织，都以环腺苷一磷酸（cyclic adenosine monophosphate response，cAMP）为第二信使。

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。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[2~7]。

本实验显示，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 CRHlR 表达的变化有关；CRHlR 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，CRHlR 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 CRHlR 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 CRHlR 来调控[6,7]。

本实验结果提示，对照组下丘脑有少量的 CRH mRNA 表达，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，下丘脑 CRH mRNA 表达明显升高，而用 CRHlR 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 mRNA 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[8,9]。在应激反应中，CRH 可能通过选择性的刺激 CRHlR 表达并激活其 CRHlR、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 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。

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 PKA 信号通路，即通过 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 位点上的丝氨酸的磷酸化-转录激活区域磷酸化，P-CREB 与 CRH 基因的启动区域 cAMP 反应元件结合后，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。

参考文献：

[1] Lezoua lc'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-kappa B[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(1): 147 - 159.

[2] 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.

[3] Ono N, Samson W, McDonald J, *et al*. Effects of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(22): 7787 - 7790.

[4] Imaki T, Katsumata H, Miyata M, *et al*. Expression of corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in paraventricular nucleus after acute stress [J]. Neuroendocrinology, 2001, 73(5): 293 - 301.

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

[7] Grinevich V, Ma X 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.

[8] 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 R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(12): 2076 - 2091.

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

（编辑　张大春）

（上接 960 页）

2.4　两组产后出血量比较

均用一次性聚血盆收集产后出血，产后 24 h 两组出血量无明显差异（$P > 0.05$），产后 24 h 之后，实验组出血明显少于对照组（$P < 0.01$），说明通过新生儿吸吮有增强子宫收缩的作用，见表 1。

表 1　两组产后出血量比较

组别	例数	< 24 h		24 ~ 48 h		48 ~ 72 h	
		< 100 ml	> 100 ml	< 80 ml	> 80 ml	< 50 ml	> 50 ml
试验组	306	35	71	74**	42**	85**	21**
对照组	119	41	78	53	66	48	71

**：与对照组比较，$P < 0.01$

2.5　两组产后乳房问题比较

两组产妇产后 4 d 内出现奶胀、皮肤发红、乳头皲裂乳房问题者，试验组 21 例，占 19.91%；对照组 74 例，占 62.10%，两组间判别有非常显著性的意义（$\chi^2 = 39.544$，$P < 0.01$）。

3　讨论

通过对 225 例产妇泌乳的对比、观察、分析，认为产后早吸吮、按需哺乳，可使 PRL 值升高，有助于早泌乳、多泌乳。分娩后由于雌激素与孕激素对于 PRL 的抑制作用消失开始泌乳。乳汁的分泌依赖于 PRL，射乳则依赖于催产素。PRL 的分泌因哺乳刺激而反射性上升[1]。吸吮反射是人类的本能，此反射于胎内 32 ~ 36 周时成熟，出生 10 ~ 30 min 时最强，30 min 后减弱，要到第 2 天才能恢复。故生奶时间越早泌乳反射建立也就越早，母乳喂养率越高。早期哺乳刺激乳头，可引起催乳反射，即吸吮刺激通过乳头 N 末梢传入脑垂体前叶，引起 PRL 释放，PRL 经血循环作用于乳腺细胞使之泌乳，吸吮的刺激同时传入垂体后叶，致使释放催产素，催产素直接作用于肌上皮细胞，使之收缩而增加乳腺管内压，对乳汁流出和乳房的排空起重要作用。当乳房排空时也可作为一种机械刺激而促进 PRL 的分泌，为下次分泌乳汁作好准备。催产素还可使子宫收缩，有利于胎盘剥离面血窦的闭合，有助于防止产后出血。本资料亦提示这一点。

过早地给婴儿添加食品，会干扰吸吮和泌乳[2]。试验组奶量充足，出现母乳开发症较少，婴儿得到母乳和精神满足者较安静；产妇心情舒畅，良好情绪和环境更增强了母亲的信心，形成良性循环，纯母乳喂养率达到 100%。对照组由于生奶晚，使用橡皮奶头等，使婴儿错过最佳记忆时期，造成乳头错觉，降低了婴儿对母乳的渴求，纯母乳喂养率 58.82%（70/119），混合喂养 39.496%（47/119），人工喂养 1.68%（2/119）。过早给婴儿添加食品，婴儿胃肠道内母乳保护层被稀释，破坏，对婴儿健康也不利，试验组无大便异常者，对照组 28 例出现不同大便异常情况。

新生儿及时有效的吸吮避免了乳汁在乳房内淤积，保持乳腺管通畅。生奶时间晚，做不到及时有效的吸吮，易出现奶胀，当乳房胀满到一定程度时，腺上皮产生一种多肽，称为乳汁抑制因子，在乳汁中抑制泌乳。同时影响婴儿含接乳晕，吸吮时牵拉摩擦乳头，造成乳头皲裂，产生时导致细菌感染。对照组出现乳房问题者明显高于试验组（$P < 0.01$）。

通过 225 例的临床试验证明，产褥早期按需哺乳、泌乳素分泌增加，促使产褥早期分泌乳汁，增加乳量，并能加快子宫复旧，减少产后出血量，减少母儿并发症发生。

关键词：产褥早期；按需哺乳；乳汁分泌

中图法分类号：R174.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 王泰龄. 儿科学 M]. 第 5 版. 北京：人民卫生出版社，2002：264 - 265.

[2] 左赫起子. 母乳同室还是异室[J]. 国产期医学，1993，23(1)：115 - 119.

[3] 苏忠厉，蔡薇薇，杨建新. 对出生 1 ~ 4 月龄婴儿母乳喂养率的调查及对策[J]. 中华护理杂志，1996，31(2)：113 - 115.

（编辑　薛周文）