重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1034-04

促肾上腺皮质激素释放激素对下丘脑神经元 CREB 的调控

张云东,顾小红,朱佩芳,王正国,周继红,许民辉

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所,重庆 400042)

【摘 要】目的:研究促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone,CRH)对下丘脑神经元内 CREB(CAMP-responsive element-binding protein)含量变化的调节作用。方法:取孕 17d 胎鼠下丘脑分散培养下丘脑神经元,采用 PTI(Photon technology international,PTI)荧光成像系统测量下丘脑神经元胞浆内游离钙浓度($[Ca^{2+}]i$)变化;测量和分析外源性 CRH 对培养下丘脑神经元内钙信号变化的影响,用 Western blot 方法测定神经元内 P-CREB 的含量变化,分别与用细胞膜 L- 型钙通道拮抗剂尼莫地平或 CRH1 受体(CRH_1R)特异性拮抗剂 CP-154526 处理下丘脑神经元后$[Ca^{2+}]i$ 和 P-CREB 的变化作比较。结果:正常对照组的下丘脑神经元$[Ca^{2+}]i$ 含量较低,外源性 CRH 刺激后,$[Ca^{2+}]i$ 立即升高;预先应用尼莫地平或 CP-154526 处理再用 CRH 刺激的神经元$[Ca^{2+}]i$ 含量的增加明显被抑制,同时也可明显抑制神经元内 P-CREB 含量的增加。结论:在急性应激反应中,CRH 可直接与下丘脑神经元 CRH_1R 结合,开放膜 L- 型钙离子通道促使钙离子内流使$[Ca^{2+}]i$ 明显增加,从而进一步激活神经元内 P-CREB 信号通路。说明在调节下丘脑神经元激活过程中 CRH 可能起了重要的作用。

【关键词】钙通道;下丘脑神经元;P-CREB;促肾上腺皮质激素释放激素

【中国图书分类法分类号】R338.2+7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-11

Regulation of P-CREB signals in rat hypothalamic neurons by exogeneous corticotropin—releasing hormone(CRH)

ZHANG Yun-dong,et al

(*Department of Neurosurgery,Daping Hospital Research Institut of Field Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the function and regulation of CREB signaling in rat hypothalamic neurons by exogeneous corticotropin-releasing hormone(CRH). *Methods*:Perifused primary cultures of rat hypothalamic neurons. Intracelluar free Ca^{2+} concentration($[Ca^{2+}]i$) was assayed at 32℃ by fluorescence analysis,the coverslip was mounted in a Delta Scan spectrofluorimeter(Photon Technology International);and phospho-CREB by western blot. *Results*:The basal lower intracellular Ca^{2+} level of perifused primary cultures of rat hypothalamic neurons cultured on coverslipy was markedly increased by CRH,and significantly attenuated by application of nifedipine(Nif) or CP-154526. CRH may cause the increase of phospho-CREB in the neuron of hypothalamus, while CP-154526,Nif can significantly inhibit the production of phospho-CREB. *Conclusion*: CRH may excite hypothalamic neurons directly suggest that phospho-and $[Ca^{2+}]i$,suggesting a role of CRH type 1 receptor in the activation of CRH gene expression.

【Key words】 Calcium signaling;Phosphorylated cAMP-responsive element-binding protein;Hypothalamic;Corticotropin-releasing hormone

Imaki 等[1]曾提出在急性应激反应中,下丘脑合成和分泌的 CRH 对在急性应激反应中起着核心作用的下丘脑神经元的神经内分泌功能可能存在超短正反馈调节机制,但有关 CRH 通过何种信号途径调控下丘脑神经元的神经内分泌活性,至今仍不十分清楚。笔者通过 CRH 刺激培养下丘脑神经元,探讨CRH 引起培养下丘脑神经元内$[Ca^{2+}]i$ 变化及其细胞内 CREB 磷酸化的机制。

1 材料与方法

1.1 下丘脑细胞的分散培养

实验参照 Wilkinson 等[2]的方法,选孕 17d Wistar 胎鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物室提供),在解

作者介绍: 张云东(1968-),男,副教授,副主任医师,博士后,研究方向:创伤后下丘脑-垂体-肾上腺应激反应调控机理。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划专项经费资助项目"973"(G1999054201)。

重庆维普 http://www.cqvip.com

剖显微镜下分离出胎鼠大脑，除去脑膜及血凝块，分离下丘脑(以视交叉－乳头体为前后界，左右下丘脑沟为侧界，深约1.5mm)，经 D-Hank 液冲洗后仔细剪碎脑组织成约 $1mm^3$ 大小的小块，组织块中加入 1.25g/L 胰蛋白酶溶液(D-Hank 液配制，pH7.4～7.6)，37℃下消化 30min，再以吸管吹打直至分散为单细胞悬液。每一下丘脑大约可分离出 1.2×10^6 个细胞，加入 DMEM/Ham F12(美国 Sigma 公司)培养液(体积 1∶1，含体积分数为 10%的胎牛血清)，最终制成密度为 5×10^5 的细胞悬液，接种于生长面上有多聚赖氨酸(0.1mg/ml)的盖玻片上，置于 30mm 培养板中，置 37℃、体积分数 5%的 CO_2 培养箱孵育。

1.2 胞浆内钙离子的测定

取出培养 7d 下丘脑神经元培养板，去除培养液，用 PSS(NaCl 118mmol/L，KCl 4.75mmol/L，$NaHCO_3$ 25mmol/L，$MgSO_4$ 1.2mmol/L，$CaCl_2$ 1.8mmol/L，KH_2PO_4 1.2mmol/L，Glucose 11mmol/L)冲洗 2 次。每孔加入 1ml PSS，并加入 4μmol/L Fura-2/AM 和 0.2g/L Pluronic F-127，置入 37℃孵箱中孵育 1h，弃除 Fura-2/AM。再用 PSS 冲洗 2 次，去除残余的 Fura-2/AM，将负载 Fura-2 的下丘脑神经元置于荧光显微镜下(日本 Olympus 公司)，用 PTI 荧光成像系统进行测定，持续时间约 300s。钙荧光的激发波波长为 340/380nm，发射波波长为 510nm，荧光信号用 Felix 专用软件处理，测定神经元游离钙与结合钙荧光强度的比值[游离钙/结合钙(Ratio)]，Ratio 的升高表明$[Ca^{2+}]i$ 升高。分组：(1)CRH(10^{-12}、10^{-10}、10^{-8}、10^{-6}mol/L)刺激组；(2)预先分别用尼莫地平(5μmol/L)或 CP-154526(500μmol/L)处理再用 CRH(10^{-12}、10^{-10}、10^{-8}、10^{-6}mol/L)刺激组；(3)分别设置相应的对照组，对照组用等渗盐水刺激。

1.3 Western blot

提取培养下丘脑神经元总蛋白，并定量。根据蛋白浓度计算所需上样量(注：以上操作均在冰板上进行)。聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白(上样量为 40μg 总蛋白)，电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维膜上，封闭、加一抗(稀释 1∶1 000)、辣根过氧化物酶标记二抗(稀释 1∶1 000)，化学发光试剂增强反应，X 线胶片压片曝光，凝胶成像系统分析结果，设对照并重复 3 次。

1.4 统计学处理

实验数据以"$\bar{x}\pm s$"表示，分别进行 t 检验和方差分析。

2 结 果

基础状态下下丘脑神经元$[Ca^{2+}]i$ 含量较低，为(156±8)nmol/L。外源性 CRH 刺激后，下丘脑神经元 Ratio 明显增加，持续在较高水平($P<0.01$)(图1)，在用 10^{-12}mol/L 的 CRH 刺激时，各刺激组$[Ca^{2+}]i$ 的变化与对照组相比较无显著差异；分别用 10^{-10}、10^{-8}、10^{-6} mol/L 刺激时，各刺激组$[Ca^{2+}]i$ 的变化与对照组相比较均显著增加。而预先应用膜 L-型钙通道拮抗剂尼莫地平处理后，Ratio 的增加明显被抑制($P<0.05$)(图2)；应用 CP-154526 处理后，Ratio 的增加也明显被抑制($P<0.05$)。但在应用尼莫地平或 CP-154526 处理后，Ratio 仍明显高于对照组($P<0.01$)。

CRH 刺激下丘脑神经元后，P-CREB 含量于刺激后 15min 开始增加，持续在较高水平，于刺激后 12h 开始回落，各刺激组与对照组相比较差异非常显著($P<0.01$)；CP-154526、Nif 可抑制 CRH 刺激下丘脑神经元 P-CREB 含量增加(图 3、表 1)。

3 讨 论

CRH 是 1981 年 Vale 等从山羊下丘脑中分离出的一种含 41 个氨基酸的肽，与机体内分泌、生理机能、神经化学和行为反应密切相关，尽管 CRH 广

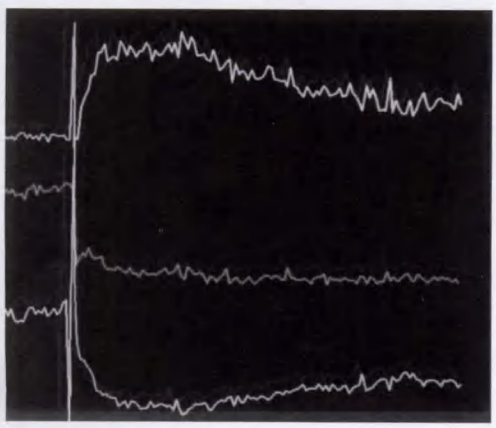


图 1 CRH 刺激下丘脑神经元胞浆内游离钙/结合钙(Ratio)的变化

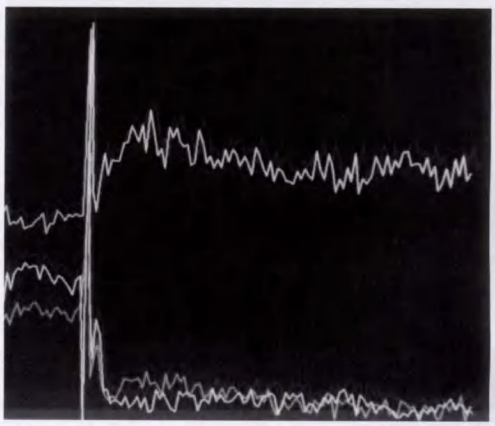


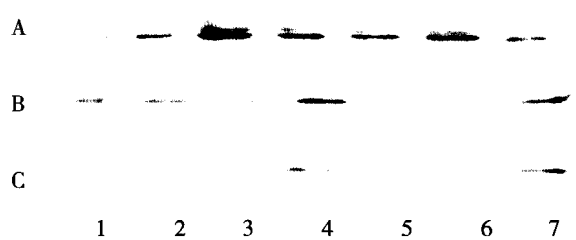
图 2 尼莫地平+CRH 刺激下丘脑神经元胞浆内游离钙/结合钙(Ratio)的变化

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 1 CRH 刺激下丘脑神经元磷酸化 CREB 含量变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

	P-CREB 含量(Odu/mm²)		
	CRH 刺激	CRH 刺激+Nif	CRH 刺激+CP-154526
对照组	1.44 ± 0.24	0.22 ± 0.03	0.35 ± 0.05
15min	2.23 ± 0.13**	0.23 ± 0.03	0.36 ± 0.07
30min	5.42 ± 0.30**	0.47 ± 0.15*	0.35 ± 0.05
1h	3.66 ± 0.19**	0.35 ± 0.14	1.37 ± 0.23**
2h	3.05 ± 0.17**	0.73 ± 0.24**	0.53 ± 0.16*
6h	4.09 ± 0.29**	0.22 ± 0.05	0.34 ± 0.18
12h	2.58 ± 0.85**	2.37 ± 0.43**	1.87 ± 0.30**

*$P<0.05$, **$P<0.01$



1、2、3、4、5、6、7 泳道分别为正常对照组、刺激后 15 min、30 min、1 h、2 h、6 h、12 h P-CREB 变化。A.CRH 刺激组;B.尼莫地平 +CRH刺激组;C.CP-154526+CRH 刺激组。

图 3 CRH 刺激下丘脑神经元 P-CREB 蛋白含量变化

泛分布于中枢神经系统(Control neurol sgsbem,CNS)内,但以下丘脑中含量最高。CRH 是下丘脑释放的对 HPA 轴调节的最主要的神经分泌物。CRH 受体属于 G 蛋白偶联受体,在大鼠,其存在 3 种亚型,CRH_1R、$CRH_{2a}R$ 和 $CRH_{2B}R$,CRH1R 主要分布于 CNS,$CRH_{2a}R$ 和 $CRH_{2B}R$ 则主要分布于外周组织。

CRH 引起下丘脑神经元细胞内第二信使$[Ca^{2+}]i$的变化使细胞外信息经过转导、放大,转变为细胞内信息。细胞内很多基因受$[Ca^{2+}]i$的调节,如:c-fos、c-myc 等早期反应基因[3]。因此,无论引起$[Ca^{2+}]i$变化的 Ca^{2+} 是来自于细胞外内流的或内贮 Ca^{2+} 释放的,都可激活这些早期反应基因表达[4]。但在海马神经元,受体门控的 Ca^{2+} 通道(N-mithyl-D-aspartate,NMDA 通道)和电压门控的 Ca^{2+} 通道(如 L 型通道)介导 Ca^{2+} 进入含不同 Ca^{2+} 反应元件的不同的胞质区域,虽然不同空间分布的 Ca^{2+} 信号均能有效地启动血清反应元件(SRE)介导的 c-fos 基因转录,但在激活 cAMP 反应元件(CRE)介导的 c-fos 基因转录中,通过 L- 型通道进入的 Ca^{2+} 比从 NMDA 通道进入的 Ca^{2+} 更有效[5]。

调节 CREB 活性的一关键机制是 Ser133 位点的磷酸化。本研究显示,CRH 刺激后 P-CREB 含量增多,刺激后各组与对照组相比差异显著;而用 CRH 受体拮抗剂 CP-154526,可显著减少 CREB 的表达,说明 CRH 与 CRH_1R 的结合可使 P-CREB 含量增加,从而调控基因转录。CREB 磷酸化主要是通过PKA 信号途径活化调节转录因子[6]。PKA 活化后,使得异四聚体的 PKA 解离,催化亚基由细胞质进入核内,然后使转录因子 CREB 在 N 端转录活性区附近的 Ser133 磷酸化活化,从而调控基因转录[7]。

本实验表明,用 Nif 处理后,P-CREB 含量的增加可被明显阻滞,说明从 L 型 Ca^{2+} 通道内流的 Ca^{2+} 可激活胞质内 Ca^{2+} 信号,刺激 CREB 磷酸化。CREB 除受 PKA 影响外,胞内钙离子浓度变化也可使CREB 磷酸化而激活 CREB[8]。很多基因受$[Ca^{2+}]i$变化的调节,基因对 Ca^{2+} 敏感是因为启动子的上游存在专一的 DNA 序列,而转录因子是这些基因的启动子反应元件结合蛋白[9]。Ca^{2+} 激活 CRE 依赖的转录需要多步过程,CREB Ser133 的磷酸化是很多信号通路的共同途径[10]。且$[Ca^{2+}]i$变化和 PKA 途径激活所引起的磷酸化修饰都发生在 CREB 分子的同一位点上(第 133 位 Ser 残基)。说明两种信号途径所传递的信号可汇集在转录调节因子的同一氨基酸残基上,发挥调节作用[11]。

下丘脑神经细胞受外源性 CRH 刺激后,通过开放膜钙离子通道启动细胞外 Ca^{2+} 内流及内贮 Ca^{2+} 释放,增加$[Ca^{2+}]i$,而致一系列转录因子的活化而实现对基因转录的调节,使下丘脑神经元表型发生相应的改变,从而调节下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的功

重庆维普 http://www.cqvip.com

能,在应激反应中,下丘脑分泌的 CRH 在调节下丘脑神经元的激活过程中可能起了重要的作用。

参 考 文 献

[1] 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(1):293-301.

[2] Wilkinson M,Gibson CJ,Bresslev BH,et al. Hypothalaminc neurons in dissociated cell culture[J]. Brain Res,1974;82(3):129-133.

[3] Michikawa T,Miyawaki A,Furuichi T,et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium signaling[J]. Crit Rev Neurobiol,1996;10(1):39-55.

[4] Yamamori F,Asai M,Yoshida M,et al. Calcium/calmodulin kinase IV pathway is involved in the transcriptional regulation of the corticotropin-releasing hormone gene promoter in neuronal cells[J]. J Mol Endocrinol.2004;33(3):639-649.

[5] Imaki T,Nahan JL,Rivier C,et al. Differential regulation of CRH mRNA in rat brain regions by glucocorticorticoids and stress [J]. J Neurosci,1991;11(3):585-599.

[6] Lalmansingh AS,Uht RM.Estradiol(E2) Regulates corticotropin releasing hormone gene(crh) expression in a rapid and phasic manner that parallels estrogen receptor -alpha(ER {alpha}) and -beta ({beta}) recruitment to a cAMP regulatory element(CRE) in the proximal crh promoter[J]. Endocrinology,2007;181(3):4213-4226.

[7] Chen Y,Hatalski CG,Brunson KL,et al. Rapid phosphorylation of the CRE binding protein precedes stress-induced activation of the corticotropin releasing hormone gene in medial parvocellular hypothalamic neurons of the immature rat[J]. Brain Res Mol Brain Res,2001;96(1-2):39-49.

[8] Dimitrov EL,DeJoseph MR,Brownfield MS,et al. Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neuronal activity[J]. Endocrinology,2007;148(8):3666-3673.

[9] Bayatti N, Behl C.The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone[J]. Ageing Res Rev,2005;4(2):258-270.

[10] Boutillier AL,Gaiddon C,Lorang D,et al. Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein[J]. Pituitary,1998;1(1):33-43.

[11] Nicholson RC,King BR,Smith R. Complex regulatory interactions control CRH gene expression[J]. Bioscience,2004;1(9):32-39.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 1033 页)

tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis,2003;7(10):994-1000.

[7] Inomata S,Shijubo N,Kon S,et al. Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis[J]. Cytokine,2005;30(4):203-211.

[8] Okamoto M,Kawabe T,Iwasaki Y,et al. Evaluation of interferon-gamma,interferon-gamma-inducing cytokines,and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions[J]. J Lab Clin Med,2005;145(2):88-93.

[9] Imboden M, Nicod L, Nieters A, et al. The common G-allele of interleukin-18 single-nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for atopic asthma[J]. Clin Exp Allergy,2006;36(2):211-218.

[10] Zhang PA,Wu JM,Li Y,et al. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population[J]. World J Gastroenterol,2005;11(11):1594-1598.

[11] Harishankar M,Selvaraj P,Rajeswari DN,et al. Promoter polymorphism of IL-18 gene in pulmonary tuberculosis in South Indian population[J]. Int J Immunogenet,2007;34(5):317-320.

(责任编辑:冉明会)

本刊被美国《化学文摘》(CA)收录为来源期刊

中国高等学校自然科学学报研究会对外联络委员会、中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会近期通告,《重庆医科大学学报》已经通过美国化学文摘社《化学文摘》(CA)的评估,正式收录为来源期刊。