DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.013
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1161-04

论著

CRH刺激大鼠下丘脑脑片CRH及CRH1R的表达研究

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 通过CRH刺激大鼠下丘脑脑片,探讨下丘脑CRH和CRH1R在下丘脑中的分布和表达规律。方法 采用大鼠下丘脑脑片实验模型,运用免疫组织化学技术,观察CRH刺激大鼠下丘脑脑片后CRH和CRH1R在下丘脑中的分布和表达规律。结果 CRH刺激下丘脑脑片后下丘脑CRH和CRH1R含量明显增多,而CP-154526、H89可显著抑制CRH和CRH1R的增加。结论 CRH刺激下丘脑脑片后增多的CRH与CRH1R结合后进一步引起下丘脑神经元CRH和CRH1R表达增加。提示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;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:R338.27;R392.2;R977.11 文献标识码:A

Expression of corticotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in rat hypothalamic slice after stimulation with corticotropin-releasing hormone stimulation *in vitro*

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

Abstract: **Objective** To investigate the distribution and expressions of corticotropin-releasing hormone (CRH) and corticotropin-releasing hormone type 1 receptor (CRH1R) in rat hypothalamus after CRH stimulation of hypothalamic slices in rats *in vitro*. **Methods** Model of rat hypothalamic slices was employed in this study. The distribution and expressions of corticotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in rats hypothalamus after CRH stimulation of the hypothalamic slices in rats in vitro were observed by immunocytochemical method. **Results** An increased intracellular concentration of CRH and CRH1R in the hypothalamus was observed after CRH stimulation of the hypothalamic slices in rats. CP-154526 or H89 significantly inhibited the expressions of CRH and CRH1R. **Conclusion** An increased concentration of CRH conjugated with CRH1R can induce more expressions of CRH and CRH1R in rats hypothalamus after CRH stimulation of the hypothalamic slices in rats *in vitro*, suggesting that the expression of CRH in hypothalamic neuron may have regulatory effect on the ultrashort positive feedback through PKA pathway.

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

目前国内外对应激反应研究最多的是温度(热、冷)、束缚与制动、条件反射性电击足、母性行为应激(妊娠、生育、哺乳等)、疼痛、心理社会应激(如拥挤、剥夺控制权)等在体模型,应激后促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)在下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA)中发挥重要作用,它刺激垂体前叶合成和释放促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropic hormone, ACTH)[1,2]。HPA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

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:2003-10-05

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

较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。自从20世纪60年代Yamamoto等首次在嗅皮层脑片上记录到突触电位以来[3]，哺乳动物离体脑片技术有了很大发展，引起越来越多学者的关注.研究对象由早期的嗅皮层、新皮层、海马扩展到下丘脑、脑干、脊髓等部位。本研究采用离体下丘脑脑片培养技术，通过CRH刺激大鼠下丘脑脑片，探讨CRH和促肾上腺皮质激素释放激素受体(corticotropin-releasing hormone type 1 receptor，CRH1R)在下丘脑中的表达，为深入研究严重创伤后应激反应奠定较好的动物模型基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

多聚甲醛(Sigma)；二氨基联苯胺(DAB)(Sigma)；Tritonx-100(Gibco)；脱氧锇胆酸钠(Serva)；羊抗鼠CRH抗体(Santa Cruz)；羊抗鼠CRHl受体抗体(Santa Cruz)；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)；SP免疫组化试剂盒(北京中山生物技术公司)；ABC免疫组化试剂盒(北京中山生物技术公司)；CP154526(Pfizer公司，Yuhpyng Chen博士惠赠)；H89(Calbiochem)。

1.2 方法

1.2.1 脑片模型的制作[4] 选用体质量180～250 g雄性Wistar大鼠48只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)，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)饱和的人工脑脊液(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，用一种对组织无损伤的快速粘合剂将其粘于振动切片机推进台上，切片槽内倒入ACSF，浸没脑组织块，调整好切片刀的角度和振幅，沿冠状面切得约500 μm厚的脑片。

人工脑脊液的成分：实验用ACSF为改良Yamamoto溶液，其中含有：NaCl 124 mmol/L，KCl 5 mmol/L，KH_2PO_4 1.24 mmol/L，$MgSO_4$ 1.3 mmol/L，$CaCl_2$ 2.1 mmol/L，$NaHCO_3$ 20 mmol/L和葡萄糖10 mmol/L.该溶液经氧(95%O_2和5%CO_2)饱和后pH为7.3～7.5。

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1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 ℃，32～35 ℃的ACSF灌流(1～1.5 ml/min)孵育60 min后，用含刺激因素的ACSF灌流；或用含拮抗因素的ACSF灌流，30 min后用含拮抗因素及刺激因素的ACSF灌流。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(KF-2，辽阳，Cole & Parmer，U.K)。温度变化速率为(1.5±0.3)℃/min。

1.2.2 动物及分组

1.2.2.1 实验动物 成年雄性Wistar大鼠20只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)，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(光照8:00～20:00)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。

1.2.2.2 分组 ①分组原则及标准：用浓度为2 500 pg/ml的外源性CRH模仿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[5]，复制严重创伤应激后下丘脑形态学变化及CRH、CRHlR表达的模型。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[6～10]。②分为4组，每组6只：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。CRH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。CRHlR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2500 pg/ml的外源性CRH的ACSF灌流240 min。PKA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H89(15 μmol/L)的ACSF灌流，30 min后用含H89(15 μmol/L)及浓度为2 500 pg/ml的外源性CRH的ACSF灌流240 min。

1.2.3 免疫组织化学[5] 培养结束后，取脑片置于10%福尔马林固定液内，4 ℃固定12 h，再入30%蔗糖液中浸泡，直至组织沉入瓶底。于恒冷冰冻切片机中切片，冠状切片，组织厚30 μm。切片漂浮于固定液中，用于免疫组化。

免疫组织化学染色：采用常规SABC法，取各组脑片采用漂浮法，显色采用硫酸镍胺增强染色，阳性结果为黄色反应物。各步骤间用PBS漂洗3次，主要步骤为：①3%H_2O_2室温孵育20 min；②1%BSA-0.3%TritonX-100 37 ℃20 min；③一抗(1∶100)37 ℃1 h，后4 ℃过夜；④二抗(Biotin-IgG，1∶100)37 ℃1 h；⑤ABC复合物(Avidin-HRP，1∶100)37 ℃1 h；⑥硫酸镍胺-TBS(0.05 mol/L，pH 7.5)显色液加入0.05%DAB-0.01%H_2O_2显色；⑦PBS终止反应，脱水，透明，封片，光镜下观察摄片。对照实验用PBS代替一抗，结果为阴性。

1.2.4 观测指标 免疫组化方法观察对照组、刺激组、CRHlR拮抗＋刺激组、PKA拮抗＋刺激组CRH和CRH1R免疫组化阳性黄色反应物在下丘脑中的表达。

2 结果

对照组、CRHlR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(图1，2)。

对照组、CRHlR拮抗＋刺激组、PKA拮抗＋刺激组有极少量CRH1R免疫组化阳性黄色反应物的分布于下丘脑神经元的胞膜；刺激组分布于下丘脑神经元胞膜的CRH1R免疫组化阳性黄色反应物的着色显著加深(图3，4)。

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

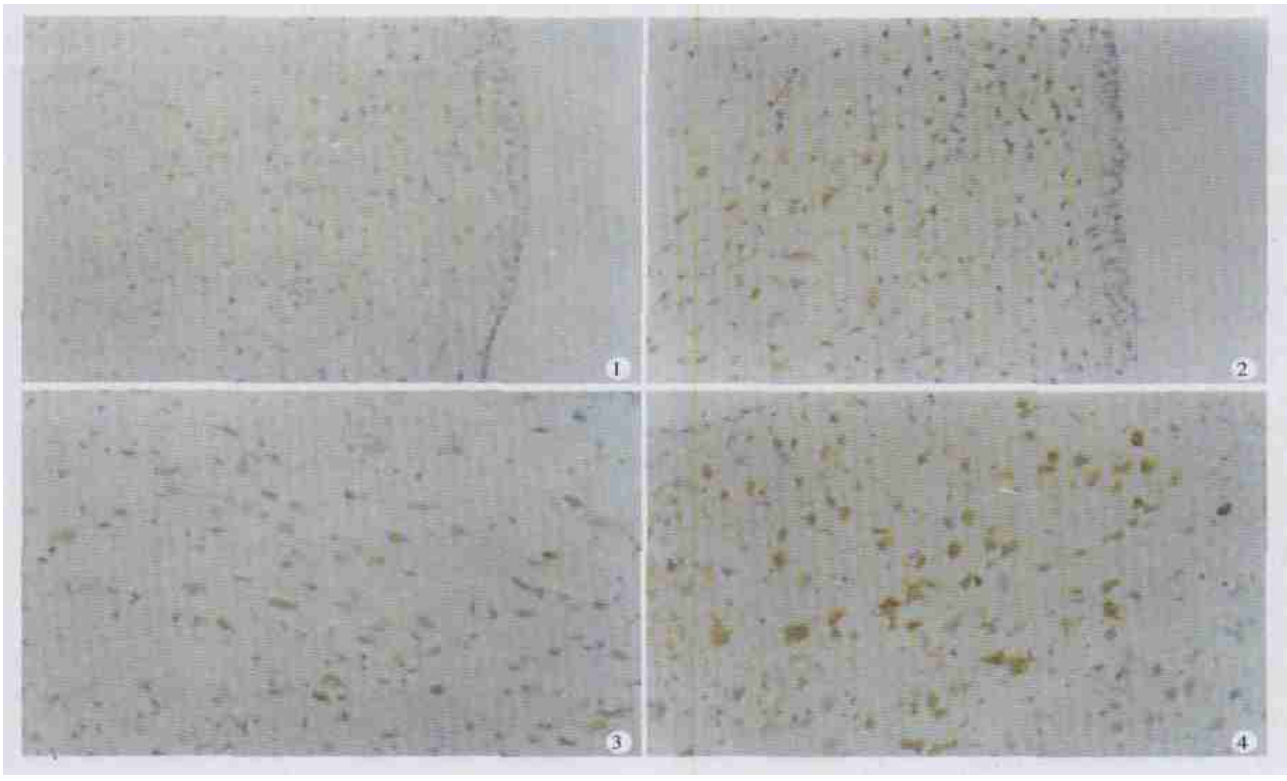


图 1　对照组 CRH 少量的分布于下丘脑神经元的胞浆　(SABC× 200)

Fig 1　Small amount of CRH distributed in the cytoplasm of hypothalamic neurons in the control group　(SABC× 200)

图 2　CRH 刺激下丘脑脑片 4 h 后, CRH 在下丘脑神经元的表达显著增加　(SABC× 200)

Fig 2　Significantly increased CRH expression in hypothalamic neurons at 4 h after CRH stimulation of the hypothalamic slices　(SABC× 200)

图 3　对照组有少量的 CRH1R 分布于下丘脑神经元的胞浆　(SABC× 200)

Fig 3　Small amount of CRH1R distributed in the cytoplasm of hypothalamic neurons in the control group　(SABC× 200)

图 4　CRH 刺激下丘脑脑片 4 h 后, CRH1R 在下丘脑神经元的表达显著增加　(SABC× 200)

Fig 4　Significantly increased CRH1R expression in hypothalamic neurons at 4 h after CRH stimulation of the hypothalamic slices　(SABC× 200)

3　讨论

3.1　CRH 刺激下丘脑脑片 CRH 的表达变化

虽然 CRH 广泛表达于中枢神经系统(CNS), 但在急性应激后仅在下丘脑表现 CRH 转录活性增加[11]。在应激反应中, CRH 是下丘脑释放的对 HPA 轴调节的最主要的神经分泌物, CRH 作为下丘脑激素在 HPA 轴中发挥着重要作用。

在体创伤应激及脑室注射 CRH 后, 下丘脑神经元 CRH 表达显著升高, 而预先并持续给予 CRH1R 拮抗剂 CP-154526 或 PKA 拮抗剂 H89, 下丘脑神经元 CRH 表达显著降低[8]。本实验结果表明, 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 免疫组化阳性黄色反应物的着色显著加深, 下丘脑 PVN 表达 CRH 的神经细胞明显增多, 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。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[7], 从而使下丘脑 PVN 合成和分泌的 CRH 增加。

3.2　CRH 刺激下丘脑脑片 CRH1R 的表达变化

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。尽管 CRH1R 主要分布于 CNS, CRH2aR 和 CRH2bR 主要分布于外周组织, 但后两种受体在脑组织中都有表达, 且都以 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

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

肌)也有 CRH1R 表达。在生理条件下,大鼠 CRH1R mRNA 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,但慢性应激低于急性应激、ADX+CORT、CRH,反复给予 LPS 后下丘脑 PVN 区 CRH1R 的表达明显低于单次给予 LPS,在炎症诱导过程中对急性应激表现为双相反应:炎症诱导过程中的第 7 天 PVN 中 CRH、CRH1R 的表达水平升高,在炎症反应高峰的第 14 天 PVN 中 CRH、CRH1R 的表达升高水平被削弱;大剂量 GC 及饥饿对下丘脑 PVN 区 CRH1R 的表达有抑制作用[6~10]。

在体实验提示下丘脑 CRH1R 蛋白的表达在应激后 1 h 逐渐增多,但于 12 h 开始回落,而预先并持续给予 CRH1R 拮抗剂 CP-154526 或 PKA 拮抗剂 H89 处理后,明显减少应激引起下丘脑 CRH1R 的表达[11]。本实验表明,对照组,在下丘脑 PVN 有一定量的 CRH1R 表达,可检测到少量和散在的 CRH1R 免疫组化阳性黄色反应物,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 PVN 表达 CRH1R 的神经细胞明显增多,且染色加深,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。而在体实验随后出现的 CRH1R 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[12]。

3.3 下丘脑脑片动物模型的建立

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。对应激反应进行深入研究有重要的理论意义和临床实用价值。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仿在体创伤应激反应。

在本研究中成功建立了下丘脑脑片培养模型,并有如下优点:①可以根据实验需要切取不同部位的脑片,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、P 物质、γ-氨基丁酸和阿片肽类物质均、神经递质乙酰胆碱、5-羟色胺、肾上腺素、去甲肾上腺素及多肽类激素如血管升压素、血管紧张素-Ⅱ、神经肽 Y、儿茶酚胺通路等因素影响,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,包括灌流液的温度、理化性质和离子成分及其浓度。但在实践过程中脑片技术仍有一些局限性:①由于脑片切断了上、下的神经联络,故不能用来研究神经元之间的回路联系。②技术难度大,许多环节都可影响脑片的存活。尽管如此,脑片技术仍不失为一种简便可行的研究手段.在电生理学、药理学和分子生物学等领域获得愈来愈广泛的应用。也为创伤应激的研究提供了一种较理想的实验模型。

综上所述,下丘脑脑片模型的建立,可避免体内复杂的核团、众多因子的干扰,是对创伤应激动物模型的一大深入,是在体研究的有价值的补充。用浓度为2 500 pg/ml 的外源性 CRH 模仿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 CRH、CRH1R 表达的模型,为深入研究下丘脑表达 CRH 的中枢信号调控机制奠定了动物模型基础,必将会给创伤救治领域注入新的活力。

参考文献:

[1] Theoharides T C, Spanos C, Pang X, *et al*. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: A corticotropin-releasing hormone-mediated effect [J]. Endocrinology, 1995, 136(12): 5745-5750.

[2] 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.

[3] 吴焕英, 杨丽明. 离体脑片技术在下丘脑电生理研究中的应用[J]. 河北医学院学报, 1994, 15(3): 142-143.

[4] 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, 2 104(1-3): 97-103.

[5] 蔡文琴, 王伯?云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版杜, 1994. 121-124.

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

[7] Cone R D. The Corticotropin-releasing hormone system and feeding behavior-A complex web begins to unravel[J]. Endocrinology, 2000, 141(8): 2713-2714.

[8] Imaki T, Katasumata 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.

[9] Makino S, Kaneda T, Nishiyama M, *et al*. Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation[J]. Neuroendocrinology, 2001, 74(2): 120-128.

[10] 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 Neuroendocrinology, 2001, 13(8): 711-723.

[11] Potter E, Sutton S, Donaldson C, *et al*. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 8777-8781.

[12] Bonaz B, Rivest S. Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain[J]. Am J Physiol, 1998, 275(5 Pt 2): R1438-1449.

(编辑 栾 嘉)

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