DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.012
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0965-03

论著

大鼠严重创伤后早期下丘脑 c-fos 和 CRH mRNA 的表达

张云东[1],朱佩芳[1],王正国[1],周继红[1],许民辉[1],邹咏文[1],黄显凯[1],粟永萍[1],赵继宗[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042;[2]首都医科大学附属天坛医院神经外科,北京 100050)

提 要:目的 探讨严重创伤后下丘脑 c-fos 蛋白和 CRH mRNA 表达变化的关系。方法 以大鼠右肺中部重度撞击伤加右股骨中段骨折为模型,采用 Western 印迹和 RT-PCR 方法观察大鼠下丘脑组织内 c-fos 蛋白和 CRH mRNA 表达变化。结果 伤后下丘脑 c-fos 含量 30 min 达高峰,以后迅速下降;CRH mRNA 表达的变化明显迟于 c-fos 的变化,创伤后下丘脑 CRH mRNA 含量于 2 h 增加最为明显,然后持续增加,12 h 达最高。结论 严重创伤后早期下丘脑迅速增加的 c-fos 对 CRH mRNA 的上调可能起关键的作用。

关键词:c-fos;促肾上腺皮质激素释放激素;下丘脑
中图法分类号:R338.27;R394.2;R642.02 文献标识码:A

Effect of severe traumatic injury on expression of c-fos and corticotropin-releasing hormone in the hypothalamus of rat

ZHANG Yun-dong, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, ZHOU Ji-hong, XU Min-hui, ZOU Yong-wen, HUANG Xian-kai, SU Yong-ping, ZHAO Ji-zong (Department 4, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relation between the expression of c-fos and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (CRH mRNA) in the hypothalamus after severe traumatic lung injury in rats. **Methods** Rats were deeply anesthetized and sacrificed before (control) and at 15, 30 min and 1, 2, 6 and 12 h after traumatic lung and right femora cataclasis injury. Changes of c-fos protein and CRH mRNA concentrations in the hypothalamus of male Wistar rats were examined by Western blot and RT-PCR. **Results** Rapid induction (15 min) of c-fos protein was noted in the hypothalamus after severe traumatic lung injury onset. The level of c-fos protein peaked at 30 min, and then gradually decreased to the control level within 2 h after the beginning of trauma. On the other hand, the time course of c-fos protein expression was obviously earlier than that of CRH mRNA expression. A significant increase in CRH mRNA level was noted 2 h after trauma, and then gradually increased to the peak at 12 h after trauma. **Conclusion** The rapidly increased c-fos protein in the hypothamalus following severe traumatic lung injury plays an important role in the up-regulation of the expression of CRH mRNA.

Key words: c-fos; corticotropin-releasing hormone; hypothamalus

促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone, CRH)在严重创伤后应激反应中的重要作用虽已为人们所共识,但关于下丘脑 CRH mRNA 的表达及其调节机制等,尚不十分清楚。文献报道,创伤应激反应可引起下丘脑 c-fos 的表达,在应激反应中下丘脑 c-fos 和 CRH 之间存在什么关系,现知之甚少。为此,以大鼠右肺中部重度撞击伤合并右股骨中段骨折为模型,探讨严重创伤后大鼠下丘脑 CRH 与 c-fos 蛋白表达变化,为严重创伤后应激反应的进一步研究和防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物实验

选成年(4月)Wistar 雄性大鼠 70 只,体质量(240±10) g,随机分笼饲养(3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,实验均在 10:00—12:00 开始,用质量浓度为 3%戊巴比妥钠腹腔注射(20 mg/kg),BIM-Ⅲ型生物撞击机撞击大鼠右胸第 4 肋,计算机调节高压气舱压力 500 kPa,动物右胸部距弹道出口 1 cm,撞击后立即用台钳折断右侧股骨中段。参照人多发伤标准,此伤情为重度多发伤。

分别在撞击前、后 15、30 min、1、2、6、12 h 处死动物,在解剖显微镜下分离下丘脑(视交叉、乳头体为前、后界,左右下丘脑沟为侧界,深约 1.5 mm,除去脑膜及血凝块),立即置液氮中保存。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:张云东(1968—),男,山东省阳谷县人,博士,主治医师,讲师,主要从事中枢神经损伤机制及治疗方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)68757243
收稿日期:2002-11-20;修回日期:2003-03-18

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

1.2 免疫印迹(Western blot)

提取大鼠下丘脑组织蛋白,并定量。自液氮中取出组织分装于 EP 管中,每克组织加缓冲液 1 ml。－20 ℃冻存组织 20 min后,以 1.2×10^4 r/min,4 ℃离心20 min。上清液移至另一 EP 管(100 μl/管)中,置 100 ℃水中,6 min。于试管中加考马斯亮蓝染液 3 ml和蛋白上清液 5 μl,混匀后测定蛋白浓度。每 EP 管加等量加样缓冲液(100 μl),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 40 μg 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。

1.3 RT-PCR

1.3.1 总 RNA 的提取 按异硫氰酸胍一步法参照 Abood 等[1]的方法进行。

1.3.2 PCR引物设计 依据Genbank 中大鼠的 CRH cDNA 序列[2],按照引物的设计原则设计引物,其序列为:P1 5′-CCG CAG CCG TTG AAT TTC TTG-3′,P2 5′-AGA TAT CGC TAT AAA GAC ACT-3′,产物长度 720 bp。由上海生物工程公司纯化合成,用无菌去离子水配制,使用液浓度为 25 pmol/μl。

1.3.3 PCR循环参数 煮沸变性 10 min,立即冰浴 5 min,加 Taq 酶 0.8 μl(4 U),置 PCR 仪内,先 95 ℃变性 2 min,按下列循环条件进行扩增:94 ℃变性 1.5 min→55 ℃退火 1 min→72 ℃延伸 1 min,循环 35 次。最后在 72 ℃延伸 10 min,取出反应管置 4 ℃ 10 min,进行琼脂糖(1.5%)凝胶电泳,并照相或扫入凝胶成像系统进行分析,计算 CRH 与β-actin 扩增条带积分吸光度比值。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行 t 检验。

2 结果

撞击伤后的大鼠均出现呼吸停止,心动过速,心率大于 200 次/min,立即行胸外心脏按压,45%的死亡率。大体解剖显示:大鼠右上、中肺、右下肺上部广泛出血;左侧肺也有局部出血;部分动物有局部心包腔出血;股骨中段骨折并形成血肿。

2.1 Western blot 结果经凝胶成像系统分析光密度值(Odu/mm^2)

下丘脑 c-fos 蛋白含量在正常对照组含量较低,伤后 30 min、1 h 各组 c-fos 蛋白含量与此对组比较差异非常显著($P<0.01$),见图 1、2。



Lanes 1－7: Represent the change of c-fos in control and that at 15, 30 min and 1, 2 and 12 h after traumatic injury, respectively

图 1 创伤后大鼠下丘脑 c-fos 蛋白含量变化

Fig 1 Expressions of c-fos in the hypothalamus after severe traumatic injury

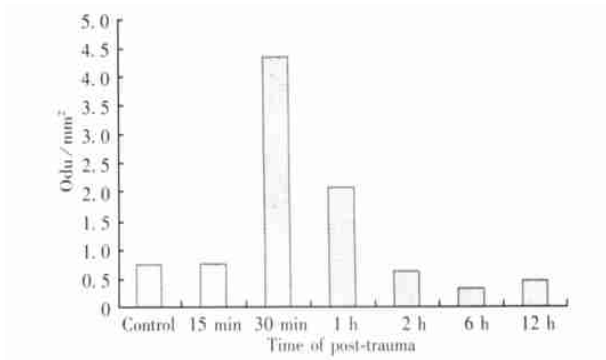
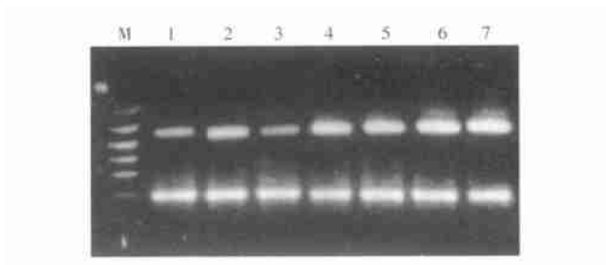


图 2 严重创伤后大鼠下丘脑 c-fos 含量变化

Fig 2 Expressions of c-fos in the hypothalamus after severe traumatic injury in rats

2.2 创伤后下丘脑 CRH mRNA 的含量变化

下丘脑 CRH mRNA 在正常情况下有一定量的表达,严重创伤后 1 h CRH mRNA 含量的变化不明显,创伤后 2 h 开始明显增加,至 12 h 仍维持在较高水平,见图 3,4。与对照组比较,伤后 15 min 组差异显著($P<0.05$),创伤后 1、2、6、12 h 比较差异非常显著($P<0.01$)。



M: Marker; Lanes 1－7: Represent the expression of CRH mRNA in control and that at 15, 30 min and 1, 2, 6 and 12 h after traumatic injury, respectively

图 3 创伤后下丘脑 CRH mRNA 的表达变化

Fig 3 Expressions of CRH mRNA in the hypothalamus after severe traumatic injury in rats

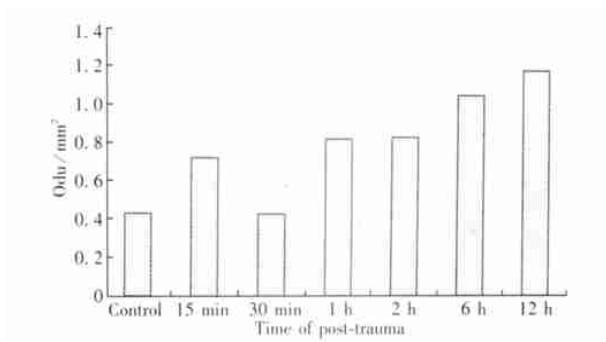


图 4 严重创伤后下丘脑 CRH mRNA 含量变化

Fig 4 Expressions of CRH mRNA in the hypothalamus after severe traumatic injury in rats

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

3　讨论

CRH 是一种含 41 个氨基酸的肽, 与机体的内分泌、生理机能、神经化学和行为反应密切相关。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[3]。急性应激引起杏仁核(CeA)和室旁核(PVN)的 CRH mRNA 增加[4], 而慢性应激则明显增加 Barrington' s 核和 PVN 的 CRH mRNA 含量[5]。PVN 神经元发出的 CRH 神经纤维分别经内侧、中间和后侧通路, 经后穹隆和中间穹隆到腹侧进入视束, 然后平行抵达下丘脑基底面, 终止于正中隆起, 触发腺垂体合成和释放 ACTH。

c-fos 属于早期快速激活反应基因, c-fos 可作为细胞代谢水平的标志, 可激活神经元, c-fos mRNA 编码核蛋白 fos, 调节靶基因的转录[6], 认为 c-fos 在神经元功能持续激活中起重要作用。c-fos 的表达和目的基因是否有直接的因果关系依赖于在基因的激活区是否都有一功能一致的序列。神经递质、神经生长因子、钡、钾引起培养细胞去极化都可快速诱导 c-fos 表达[7], 而在动物实验中, 如: 出血、高渗钠注射后, c-fos 表达也表现为迅速的增加及随后快速的回落, 推测可能是由于 c-fos 表达的增加对其自身的基因表达有抑制作用, 因此, c-fos 的诱导作用是快速和短暂的。新近的研究表明, 在调节 CRH 基因表达的促进剂中, 存在几种 AP-1 序列, 而 Fos/ Jun 结合和调节这些基因[8]。实际上, 应激后许多其它编码基因的表达, 如: 酶、受体或其它蛋白等, 可能也受 c-fos 的调节。以往的实验表明在脑室内注射 CRH 后 c-fos mRNA 阳性表达可激活神经细胞, 在下丘脑选择性的上调 CRH 基因的表达[9]。

在本实验中证明严重创伤后 c-fos 蛋白迅速变化和 CRH mRNA 随后持续性增加。Western blot 结果显示, 大鼠严重创伤应激后立即引起下丘脑组织内 c-fos 蛋白表达增加, 伤后 30 min 达高峰, 以后逐渐下降; CRH mRNA 含量逐渐增加, 1 h 增加最为明显, 然后持续增加, 12 h 达最高。此实验提供了 c-fos 和 CRH mRNA 表达变化的时间过程, 在大鼠肺部受到严重创伤和股骨骨折伤后 30 min, c-fos 蛋白水平迅速回落, 稍后 CRH mRNA 含量增加。c-fos 蛋白表达的增加以及随后 CRH mRNA 表达增加的关系表明 c-fos 可能参与调节 CRH 基因的表达。

在创伤后应激反应中, CRH 在调节内分泌、生理机能和行为反应中发挥关键作用。虽然在创伤后应激反应中下丘脑 CRH 表达明显增加, 但对创伤后下丘脑 c-fos 和 CRH 表达之间的相互关系知之甚少。因此, 本研究探讨了创伤后下丘脑 c-fos 与 CRH mRNA 表达及变化关系, 结果显示, 创伤后应激早期下丘脑 c-fos 快速表达, 在 30 min 达高峰, 而 CRH 的表达迟于 c-fos 的表达过程, 说明创伤应激反应中下丘脑早期表达的 c-fos 可能起激活 CRH 基因表达的作用。

本研究结果为进一步探讨严重创伤后下丘脑早期快反应基因与应激反应相关激素表达的相互关系奠定了基础, 也为临床通过干预应激激素的表达、分泌, 调控应激反应提供了实验依据。

参考文献:

[1] Abood M E, Eberwine J H, Erdelyi E, *et al*. Regulation of both pre-proenkephalin mRNA and its derived opioids by haloperidol—a method for measurement of peptides and mRNA in the same tissue extract[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1990, 8(3): 243—248.

[2] Thompson R C, Seasholtz A F, and Herbert E. Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue specific expression[J]. Mol Endocrinol, 1987, 1(5): 363—370.

[3] Rivest S, Laflamme N. Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats[J]. J Neuroendocrinol, 1995, 7(7): 501—525.

[4] Jezova D, Ochedalski T, Glickman M, *et al*. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal acrivity during stress[J]. Neuroscience, 1999, 94(3): 797—802.

[5] Hatalski C G, Brunson K L, Tantayanubutr B, *et al*. Neuronal activity and stress differentially regulate hippocampal and hypothalamic corticotropin-releasing hormone expression in the immature rat[J]. Neuroscience, 2001, 101(3): 571—580.

[6] Curran T. Fos and Jun: Intermediary transcription factors. In: Cohen P, Foulkers JG (eds) The Hormonal Control of Regulation of Gene Transcription[M]. Elsevier Amsterdam, 1991. 295—308.

[7] Morgan J I, Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression[J]. Science, 1986, 322(6079): 552—555.

[8] Torres G, Horrowitz J M, Laflamme N, Rivest S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain[J]. Bonaz B, Rivest S Neuroscience, 1998, 87(2): 483—477.

[9] Mansi J A, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular of rat hypothalamus by exogenous CRF[J]. Endocrinology, 1996, 137(11): 4619—4629.

(编辑　刘洪娥)

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