文章编号:1000-5404(2003)12-1059-03

论著

CRH对培养下丘脑神经元胞浆内cAMP和Ca^{2+}变化的影响

张云东[1],朱佩芳[1],王正国[1],赵继宗[2],周继红[1],许民辉[1],邹咏文[1],黄显凯[1],粟永萍[3] ([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、神经外科,重庆 400042;[2]首都医科大学附属天坛医院神经外科,北京 100050;[3]第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone,CRH)对下丘脑神经元胞浆内cAMP浓度和Ca^{2+}的调节作用。方法 取孕17 d胎鼠下丘脑分散培养下丘脑神经元,采用PTI(Photon technology international,PTI)测量和分析外源性CRH对培养下丘脑神经元胞浆内游离钙浓度([Ca^{2+}]i)变化的影响,放射免疫方法测定神经元内cAMP含量。结果 正常对照组的下丘脑神经元[Ca^{2+}]i和cAMP含量较低,外源性CRH刺激后,[Ca^{2+}]i立即升高,神经元胞浆内cAMP生成明显增加;CP-15 4526可明显抑制CRH(10^{-6} mol/L)刺激的下丘脑神经元[Ca^{2+}]i和cAMP的生成增加。结论 CRH可通过与其1受体结合直接作用于下丘脑神经元,使神经元[Ca^{2+}]i和cAMP含量明显增加,在调节下丘脑神经元激活过程中下丘脑合成和分泌的CRH可能起了重要作用。

关键词:下丘脑神经元;促肾上腺皮质激素释放激素;cAMP
中图法分类号:R322.81;R329.2+6;R977.1 文献标识码:A

Regulation of cAMP and Ca^{2+} in rat hypothalamic neurons by exogenous corticotropin-releasing hormone

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

Abstract: Objective To study the regulatory effect of corticotropin-releasing hormone (CRH) on cAMP level and intracellular Ca^{2+} content in rat hypothalamic neurons. Methods Hypothalamic neurons in rat fetus of pregnant rats for 17 days were cultured. Effect of exogenous CRH on the changes of free [Ca^{2+}]i in the cytoplasm of the cultured hypothalamic neurons was determined and analyzed by Photon technology international (PTI). cAMP level in neurons was determined by radioimmunoassay. Results [Ca^{2+}]i and cAMP levels in hypothalamic neurons in the normal control were low but increased promptly after the stimulation of exogenous CRH. CP-154526 could remarkably inhibit the increase of [Ca^{2+}]i and cAMP levels in hypothalamic neurons stimulated by CRH. Conclusion CRH can increase cAMP and [Ca^{2+}]i levels by means of the combination of CRH with CRH type 1 receptor, suggesting that CRH plays an important role in the activation of CRH gene expression.

Key words: calcium; neuron; hypothalamic; corticotropin-releasing hormone; cAMP

在应激反应中,下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的激活对下丘脑肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-releasing hormone, CRH)表达的增加起着关键的作用。然而关于通过何种途径调控下丘脑神经元表达CRH的神经内分泌活性,CRH能否激活下丘脑神经元,以及作用机制如何,尚不十分清楚。本实验通过外源性CRH刺激培养下丘脑神经元,主要观察细胞内cAMP和[Ca^{2+}]i的变化,旨在探讨CRH直接激活下丘脑神经元的机制。

1 材料与方法

1.1 下丘脑细胞的分散培养

选孕17 d Wistar胎鼠(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物室提供),在解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1.5 mm),经D-Hank液冲洗后仔细剪碎脑组织成约1 mm×1 mm×1 mm的小块,组织块中加入1.25 g/L胰蛋白酶溶液(D-Hank液配制,pH 7.4~7.6),37 ℃下消化30 min,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/Hams F12(Sigma)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(0.1 mg/ml)的盖玻片上,置于30 mm培养板中,置37 ℃、5 %的CO_2

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,主要从事神经外科损伤和治疗方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68757243
收稿日期:2003-01-04;修回日期:2003-04-10

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

培养箱孵育。分组:① CRH 刺激组:用终浓度为 10^{-6} mol/L 的 CRH 刺激培养的下丘脑神经元;②拮抗剂处理组:预先用 CP-154526(500 μmol/L)处理再用终浓度为 10^{-6} mol/L CRH 刺激组;③对照组:用溶解 CRH 的等渗盐水刺激。

1.2 胞浆内钙离子的测定[1~3]

取出培养 7 d 的下丘脑神经元培养板,去除培养液,用 PSS(NaCl 118 mmol/L; KCl 4.75 mmol/L; $NaHCO_3$ 25 mmol/L; $MgSO_4$ 1.2 mmol/L; $CaCl_2$ 1.8 mmol/L; KH_2PO_4 1.2 mmol/L; Glucose 11 mmol/L)冲洗 2 次;每孔加入 1 ml PSS 并加入 4 μmol/L Fura-2/AM 和 0.2 g/L Pluronic F-127,置入 37 ℃孵箱中孵育 1 h,弃除后再用 PSS 冲洗两次,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(Olympus),用 PTI 荧光成像系统进行测定,持续时间约 300 s。钙荧光的激发波波长为 340/380 nm,发射波波长为 510 nm,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之比比率(比率的升高代表 $[Ca^{2+}]i$ 的升高)。

1.3 细胞内 cAMP 测定[4]

①cAMP 提取:取出培养下丘脑神经元(7 d)的培养板,加入 CRH 刺激 30 min 后,去除培养液,加入 3 倍量冰冷的乙醇终止反应;用细胞刮除器刮下细胞,超声波破碎细胞 DNA,每管 30 s×3 次;5 000× g,离心 10 min,弃去沉淀的细胞碎片;上清液置真空离心干燥机中离心干燥;用 0.2 ml TE 缓冲液悬浮干燥物。②测定 cAMP:cAMP 放免药盒(中国原子能科学院产品)测定按说明书进行。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,分别进行 t 检验和方差分析。

2 结果

正常对照组下丘脑神经元 $[Ca^{2+}]i$ 含量较低,为(156±8) nmol/L。外源性 CRH 刺激后,下丘脑神经元内游离钙/结合钙比率明显增加,持续在较高水平,说明 CRH 能明显刺激下丘脑神经元 $[Ca^{2+}]i$ 增加,见图 1A;拮抗剂处理组比率的增加可明显被抑制,见图 1B。

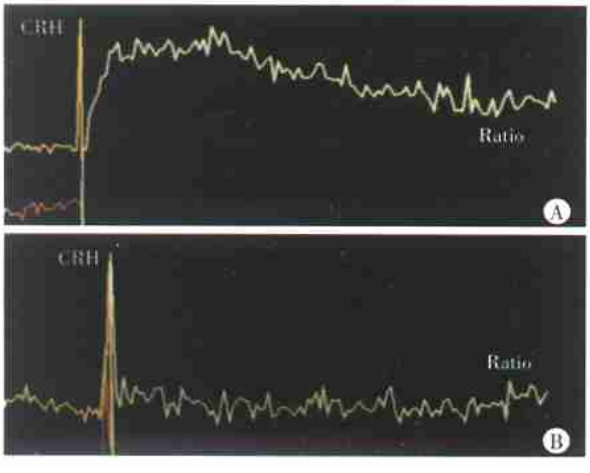


图 1 CRH(A)、CRH+CP-154526(B)刺激下丘脑神经元胞浆内游离钙/结合钙(Ratio)的变化

Fig 1 Changes of ratio in the hypothalamic neurons after administration of CRH(A) and CRH+CP-154526(B)

CRH 刺激下丘脑神经元后,神经元细胞内 cAMP 生成明显增加,刺激组(3.26±0.19) pmol/ml 与对照组(0.44±0.02) pmol/ml 相比,有非常显著性差异($P<0.01$)。CP-154526 可明显抑制 CRH(10^{-6} mol/L)刺激下丘脑神经元 cAMP 的生成增加(2.33±0.21) pmol/ml,CRH 刺激组与正常对照组及拮抗剂处理组相比较有非常显著差异($P<0.01$)。

3 讨论

应激反应的主要特征是以下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA)的激活为核心的生理和心理反应。HPA 轴激活的中枢控制十分复杂,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(CRH)起着关键的作用,它控制着 HPA 轴的兴奋水平。1985 年,Ono 等提出在应激反应中可能存在超短正反馈调节机制,调节下丘脑神经元分泌 CRH。研究表明,在下丘脑含 CRH 的轴突可与合成 CRH 的神经元形成突轴联系,且下丘脑神经元可表达 CRH 受体,从形态学方面推测可能存在超短反馈调节机制[5]。

本实验结果显示,CRH 刺激培养下丘脑神经元后,$[Ca^{2+}]i$ 立即显著增高,并持续在较高水平;而预先用 CRH1 受体特异性拮抗剂 CP-154526 处理的神经元再用 CRH 刺激,$[Ca^{2+}]i$ 的增加明显减少,说明 CRH 可直接触发下丘脑神经元能使 $[Ca^{2+}]i$ 迅速上升。许多细胞活动,如神经递质的释放、膜对特定离子的通透性的调节、膜的稳定性、轴浆流动,以及多种酶的活性变化等,都是由细胞内或膜内外钙离子分布的改变来调节的,提示可能 CRH 通过调节 $[Ca^{2+}]i$ 变化与下丘脑神经细胞内分泌、生理机能、神经化学和行为反应有关[6]。

CRH 引起下丘脑神经元内第二信使 Ca^{2+} 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。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。

本研究也证实 10^{-6} mol/L 的 CRH 刺激下丘脑神经元后,细胞内 cAMP 含量明显增加,CP-154526 可明显抑制 CRH 刺激下丘脑神经元胞内 cAMP 的生成,说明 CRH 与细胞膜 G 蛋白受体结合后可激活腺苷酸环化酶(AC),催化 ATP 形成 cAMP,CRH 能引起下丘脑神经元胞内 cAMP 增加。一些化学信息分子与细胞膜表面受体结合后,通过 AC 的作用,将信息传入细胞内。AC 位于细胞膜的内侧面,催化 ATP 形成 cAMP。现已证明许多的肽类激素都能影响其靶细胞中的 cAMP 浓度,说明激素引起 cAMP 生成具有普遍性。

CRH 是通过引起细胞内 cAMP 增加和 $[Ca^{2+}]i$ 的

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

变化而影响神经元内分泌功能的。研究显示，cAMP 和 Ca^{2+} 是调节神经细胞功能最重要的两种细胞内信使。与 G 蛋白受体相关的 AC 的激活及 Ca^{2+} 的内流都可引起神经兴奋性增高，而且这两种信使可通过细胞内转录因子调节相关基因表达[7]。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] Zhu Z M, Zhang S H, Wagner C, *et al*. Angiotension AT1b receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice[J]. Hypertension, 1998, 31(5): 1171—1177.

[2] Krsmanovic L Z, Stojilkovic S S, Merelli F, *et al*. Calcium signaling and episodic secretion of gocadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(18): 8462—8466.

[3] 赵吉清，吴 强，王仁丽，等. 缺氧复合梭曼中毒 PC_{12} 细胞中 [Ca^{2+}]、CAMP、CaM 和 Ca^{2+}/CaM-pk Ⅱ的变化[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(2): 169—171.

[4] Blake A D. Somatostatin receptor subtype 1 (sst(1)) regulates intracellular 3′, 5′-cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat embryonic cortical neurons: evidence with L-797, 591, an sst(1)-subtype-selective nonpeptidyl agonist[J]. Neuropharmacology, 2001, 40(4): 590—596.

[5] 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.

[6] Seutin V, Mkahli F, Massotte L, *et al*. Calcium release from internal stores is required for the generation of spontaneous hyperpolarizations in dopaminergic neurons of neonatal rats[J]. J Neurophysiol, 2000, 83(1): 192—197.

[7] Kuryshev Y A, Childs G V, Ritchie A K. Corticotropin-releasing hormone stimulates Ca^{2+} entry through L- and P-type Ca^{2+} channels in rat corticotropes[J]. Endocrinology, 1996, 137(6): 2269—2277.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)12-1061-01

个案与短篇

腹腔镜切除直肠前壁畸胎瘤 1 例

A case report of anterior rectal wall teratoma resected by laparoscopy

吴凤英，陈 勇，梁志清 （第三军医大学附属西南医院妇产科，重庆 400038）

患者，女，35 岁，因下腹痛 4 个月入院。患者近 4 个月出现下腹部胀痛，以右侧为主，大便正常。患者 20 岁结婚，孕 5 产 4 流 1，节育环避孕 5 年，月经史无特殊。查体：一般情况良好，心、肺、腹部无阳性体征。妇科检查：外阴发育正常，阴道壁光滑；宫颈轻度糜烂；宫体前位，正常大小，无压痛；右侧附件增厚，压痛，右附件后方近子宫处可触及一包块，约 5 cm×4 cm×3 cm 大小，囊性感，压痛，活动差。B 超检查子宫后方有一约 3.4 cm×3.2 cm 低回声团块，考虑为右侧卵巢肿瘤；CT 检查示：子宫后方直肠前间隙内一类圆形低密度影，约为 3.0 cm×3.5 cm，边缘光滑，内部密度均匀，考虑为盆腔内脂肪瘤。

全麻下行腹腔镜探查，术中见：子宫大小正常，双侧卵巢及输卵管未见异常，直肠前壁浆膜下可见一约 4 cm×4 cm×3 cm 大小包块，切开囊壁后见咖啡色液体流出，吸尽囊液后，可见皮脂及毛发，完整剥离囊壁，送病理检查。手术顺利，术后患者恢复良好，术后 3 d 出院。术后病理诊断：直肠前壁良性囊性畸胎瘤。

作者简介：吴凤英(1972—)，女，重庆市人，护师。电话：(023)68754412
收稿日期：2003-04-28；修回日期：2003-05-03

讨论

畸胎瘤是妇科一种常见肿瘤，良性多见，常发生于卵巢，也见于睾丸、腹膜后、骶尾部、纵隔、颈部、脑、松果体等处，发生于直肠的很少见，国内目前仅见 2 例个案报道。畸胎瘤发生于直肠时，多有下腹胀痛等表现，有时可出现血便及大便变形等[1]。由于畸胎瘤在影像学上表现多种多样，因此较容易误诊为其它疾病[2]，本例 B 超与 CT 诊断亦不统一，经腹腔镜检查才得以确诊，及时实施镜下手术使其痊愈出院。本病例提示：下腹痛，妇科检查扪及盆腔包块患者，B 超、CT 等辅助检查不一致时，建议作腹腔镜检查，进一步明确诊断。

关键词：直肠肿瘤；畸胎瘤；腹腔镜术
中图法分类号：R730.269；R735.3+7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘玉刚，关夕红，张晓瑜，等. 直肠畸胎瘤 1 例报告[J]. 山东医药，1999, 39(12): 25.

[2] 马钦凤，张玉英，宋书邦. 36 例畸胎瘤的声像图分析[J]. 青海医药杂志，1999, 29(6): 23—24.

（编辑 薛国文）

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