DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.012
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0489-03

论著

大鼠严重创伤后早期下丘脑 CRH 的表达

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[1] ([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)

提 要:目的 探讨在颅脑撞击伤应激反应中下丘脑表达和分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的变化规律及其反馈调节机制。方法 应用BIM-III型多功能小型生物撞击机致伤,采用免疫组化和Western blot等技术进行检测下丘脑CRH的表达变化和分布规律。分组:对照组、撞击伤后15 min、30 min、1 h、2 h、6 h、12 h撞击伤组、撞击伤治疗组,治疗组用CRH_1受体(CRH_1R)特异性阻滞剂CP-154526处理。结果 正常情况下,CRH少量的表达于下丘脑室旁核和视上核,撞击伤后1 h CRH表达明显增加,主要分布于室旁核和视上核,且表达呈逐渐增加的趋势,在2~6 h时相点表达明显增加,6 h后开始回落;用CP-154526治疗的大鼠,撞击伤后下丘脑CRH表达的增加明显减少。结论 在创伤性应激反应中,CRH对下丘脑合成和分泌CRH存在明显的调节作用,CRH通过与CRH_1R的结合在其中可能起着关键的作用。

关键词:CRH;严重创伤;下丘脑;CP-154526
中图法分类号:R642;R651.15;R977.11 文献标识码:A

Effect of severe traumatic injury on the expression of corticotropin releasing hormone in the hypothalamus in rats

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, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the function and expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamus in rats following severe traumatic lung injury. **Methods** Rats were traumatized by using BIM-III Multifunctional Biological Impactor and then divided into control, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h post-trauma groups and treated group. Rats were deeply anesthetized and sacrificed at 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 360 min and 720 min after traumatic lung and right femora cataclasis injury. The changes of expression and concentrations of CRH in the hypothalamus in rats were detected by immunocytochemistry and Western blot. CRH_1R specific blocker CP-154526 was used in treated group. **Results** CRH was present in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON). In response to severe traumatic lung injury onset, a significant increase in CRH mRNA level was noted at 120 min after trauma, and then gradually increased to the peak at 720 min after trauma. CP-154526 could significantly inhibit the expression of CRH. **Conclusion** In response to traumatic stress, CRH from the PVN and SON are involved in the control of the synthesis and release of CRH from hypothalamus after severe traumatic lung injury, suggesting that CRH may play an important role through the combination with CRH type 1 receptor.

Key words: CRH; traumatic injury; hypothamalus; CP-154526

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,CRH能否激活下丘脑神经元及其作用机制仍不十分清楚。本研究通过大鼠严重创伤模型,用免疫组织化学、Western blot等方法对下丘脑神经元CRH的分布及含量进行检测,以希为调控创伤性应激反应提供一定的理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物实验

选成年(4月龄)Wistar雄性大鼠,体重(240±10) g。大鼠

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,现在北京天坛医院神经外科,发表论文7篇。电话:(023)68757243
收稿日期:2002-07-10;修回日期:2002-10-24

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

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，食物和水自由摄取。饲养 1 周后，实验均在 10:00—12:00开始，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，伤情判断为重度多发伤。分别在撞击前，撞击后 15 min、30 min、1 h、2 h、6 h 和 12 h 致死动物，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 1～1.5 mm，除去脑膜及血凝块)，立即置液氮中保存。创伤治疗组在创伤前 1 h 腹腔内注射 CP-154526(10 mg/kg)，治疗对照组注射CP-154526的溶解剂 DMSO。

1.2 免疫组织化学染色

采用SABC 法，取各时相点脑片采用漂浮法，显色采用硫酸镍胺增强染色，阳性结果为紫蓝色反应物。

1.3 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，12 000 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。

1.4 统计学处理

每组数据为 3 个样本测定数值的平均值，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行 t 检验和相关分析。

2 结果

2.1 CRH 表达

正常有极少量的 CRH 分布于下丘脑 PVN、SON 神经元的胞浆，严重创伤后 2 h，大鼠下丘脑 PVN、SON 神经元 CRH 表达增加，见图 1，2。

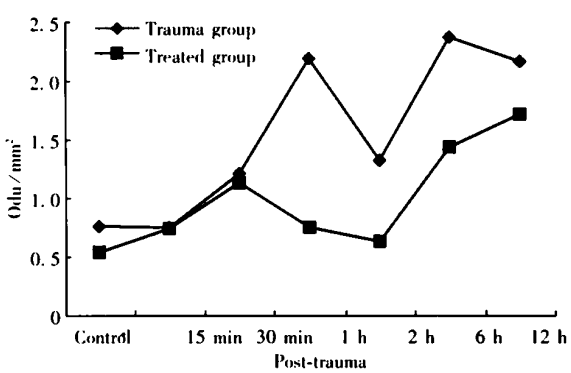


图 1 严重创伤后下丘脑 CRH 含量变化

Fig 1 Changes of CRH content in hypothalamus after severe trauma

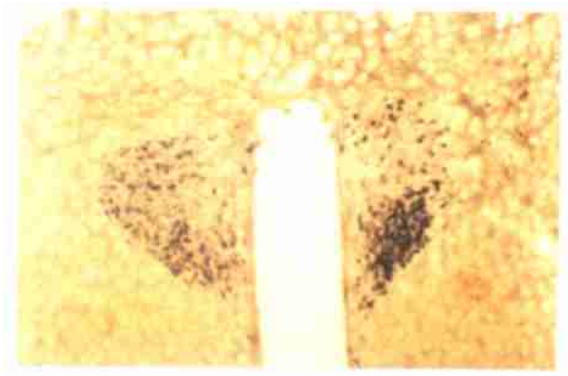


图 2 大鼠严重创伤后 2 h CRH 在下丘脑 PVN 的分布 (SABC×200)

Fig 2 Distribution of CRH in hypothalamic PVN at 2 h post-trauma in rat (SABC×200)

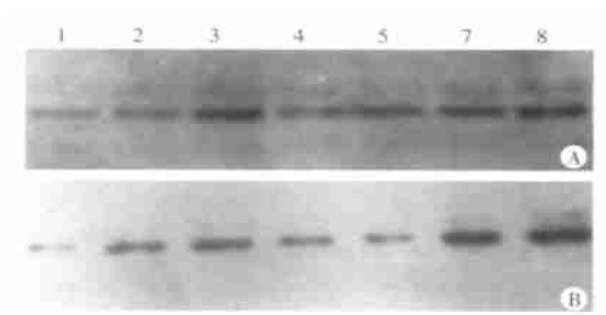
2.2 CRH 含量变化

Western blot 结果显示，严重创伤后 1 h CRH 含量明显增加，且呈逐渐增加趋势。创伤 1 h 后各时象组与对照组比较差异非常显著($P<0.01$)；使用 CP-154526 处理可明显抑制创伤后下丘脑神经元 CRH 蛋白表达增加，创伤 1 h 后各组与对照组比较差异显著($P<0.05$)，见图 3、4。



图 3 大鼠严重创伤后 2 h CRH 在下丘脑 SON 的分布 (SABC×400)

Fig 3 Distribution of CRH in hypothalamic SON at 2 h post-trauma in rat (SABC×400)



Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7: control, groups of 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h and 12 h post-trauma

图 4 A、B 组分别为创伤组和 CP154526 处理组下丘脑 CRH 含量变化

Fig 4 A and B: changes of CRH contents in trauma group and group treated with CP154526, respectively

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

3　讨论

实验结果显示, 正常下丘脑 PVN、SON 有可检测的少量散在的 CRH 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。严重创伤后, 下丘脑 PVN 表达 CRH 的神经细胞明显增多, 且表达增强, 定量分析发现 CRH 蛋白的含量在创伤后 1 h 逐渐增多。因此认为在创伤性应激反应中, 下丘脑 CRH 的合成和分泌明显增加, 从而可能进一步调节 HPA 轴的活性。

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), 但在急性应激反应中仅在下丘脑表现 CRH 转录活性增加[1,2]。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, 释放 CRH 进入下丘脑垂体门脉系统, 触发腺垂体合成和释放 ACTH[3], 发挥其在应激反应中的重要作用。CRH 除具有下丘脑激素的功能外, 从下丘脑 PVN 范围神经末梢释放出的 CRH 还可作为神经递质发挥作用, 已证实在 PVN 产生 CRH 的小细胞区域含 CRH 的轴突与合成 CRH 的神经元之间可见有轴突-胞体突触联系, 从形态学方面证实在 PVN 区存在 CRH 对 CRH 分泌的反馈调节基础, 因此认为在应激反应中可能存在 CRH 分泌超短正反馈调节机制[4]。而且在限制性应激和脑室内注射 CRH 均可上调下丘脑 CRH 基因表达, 免疫应激和腹腔内注射高渗盐水也可增加下丘脑 PVN CRH_1R mRNA 含量[5]。

本实验观察到大鼠严重创伤后, 预先用 CRH1R 拮抗剂 CP-154526 处理的大鼠, 可明显减少创伤应激引起下丘脑 PVN、SON 的 CRH 表达增加。说明创伤应激反应可激活下丘脑神经元合成和分泌 CRH, 其机制可能是下丘脑神经元分泌的 CRH 通过与其 CRH_1R 的结合而产生的超短正反馈调节, 从而选择性的调节下丘脑神经元 CRH 基因的表达[6]。

参考文献:

[1] Dunn A J, Berridge C W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses[J]? Brain Res Brain Res Rev, 1990, 15(2): 71—100.

[2] Rivest S, Laflamme N. Neuronal activity and neuropeptide gene transcriptoin in the brains of immune-challenged rats[J]. J Neuroendocrinol, 1995, 7(7): 501—4525.

[3] Ennard D E, Eckert W A, Merchenthaler I. Corticotropin-releasing hormone neurons in the parlventricular nucleus project to the external zone of the median eminence: a study combining retrograde labeling with immunocytochemistry[J]. J Neuroendocrinol, 1993, 5(2): 175—181.

[4] Ono N, Samaon W, Mcdonald J. Effect of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing hormone on the secretion of anterior pituitary hormones[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(22): 7787—7790.

[5] Mansi J A, Rivest S, Drolet G. Regulation of Corticotropin-releasing hormone type 1 (CRFR1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF[J]. Endocrinology, 1996, 137(11): 4619—4629.

[6] 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.

(编辑　张　宁)

消　息

中国老年学学会骨质疏松委员会 2003 年度会通知

第九届全国骨质疏松年会(春季会议)定于 2003 年 5 月 18—23 日在成都召开, 征文截稿日期 3 月 20 日。

第四届国际骨质疏松研讨会(秋季会议)定于 11 月 3—8 日在桂林召开, 征文截稿日期 8 月 25 日。

征文内容: 有关骨质疏松和骨矿研究的基础、诊断、治疗、预防和中医药方面论文, 两会均设优秀论文奖及学分证书。热烈欢迎专家学者和同行, 厂家和公司参加。如需了解大会事项, 请来信、来电索取征文通知和参会通知, 也可从网上下载。

联系地址: 北京市朝阳区小营路 9 号亚运豪庭 A 座 05F 室　　邮　　编: 100101

联 系 人: 孙继荣主任　　电　　话: (010)64985881　　传　　真: (010)64936211

E-mail: 2001@china-osteofound.org;　　网址(URL): Http://www.china-osteofound.org

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