DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.014

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0216-03

海马NMDA受体在大鼠严重烫伤后HPA轴兴奋性变化中的作用

陆建华[1],宋艳玲[2],黎海蒂[1],高京生[3],赵邦云[1] ([1]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]兰州军区乌鲁木齐总医院干部病房,乌鲁木齐 830000;[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 研究海马N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA受体,NR)在创伤导致的HPA轴过度兴奋中的作用。方法 以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,分别观察海马内微量注射NR的拮抗剂MK-801或NR的功能受体NR1的反义寡核酸(Oligodeoxynucleotide,ODN)对烫伤后2 h血清ACTH及皮质醇浓度的影响。结果 严重烫伤后2 h,血清ACTH及皮质醇浓度明显升高;与烫伤组相比,海马内微量注射生理盐水,没有明显改变烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度;海马内微量注射MK-801 6 μg可明显降低烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度;注射MK-801 12 μg可进一步降低血清ACTH及皮质醇浓度;注射NR1反义ODN 10 nmol/L可明显降低烫伤后血ACTH及皮质醇浓度;注射20 nmol/L可进一步降低血清ACTH及皮质醇浓度。结论 海马NR参与了烫伤HPA轴的过度激活。

关键词:烧伤;应激;海马;NMDA受体;HPA轴

中图法分类号:R338-2;R392.11;R644.02 文献标识码:A

Effects of hippocampal NMDA receptor on HPA axis activity following severe burn

LU Jian-hua, SONG Yan-ling, LI Hai-di, GAO Jing-sheng, ZHAO Bang-yun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of HPA axis activity following scald stress and to elucidate if NMDA receptor is involved in this change. Methods Adult male Wistar rats were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding burn, which was applied as severe trauma stress model. Using this model, we detected the changes of serum cortisol and ACTH concentration in scald rats pretreated with intrahippocampal microinjection of NMDA receptor antagonist MK801 or NMDA receptor 1 antisense oligodeoxynucleotide. Results Intrahippocampal microinjection of MK-801 6 μg resulted in an significant decrease of serum cortisol and ACTH concentration at 2 h after burn, and microinjection of MK-801 12 μg resulted in a more significant decrease of these values. In accordance with microinjection of MK-801, intrahippocampal microinjection of NMDA receptor 1 antisense oligodeoxynucleotide of 10 nmol/L and 20 nmol/L also resulted in a significant and a more significant decrease of serum cortisol and ACTH concentration after burn. Conclusion Hippocampal NMDA receptor plays an important role in over excitation of HPA axis following burn.

Key words: burn; stress; hippocampus; NMDA receptor; HPA axis

严重创伤往往导致过度的应激反应,其主要表现形式之一就是下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamo-pituitary-adrenal axis HPA轴)的亢进。HPA轴的亢进可导致机体免疫麻痹,诱发系统性炎性反应综合症(Systemic inflammatory response syndrome,SIRS)。近年的研究表明,海马是控制应激时HPA轴兴奋性的主要脑区[1,2],因此,海马功能的改变可能会影响其神经冲动的传导从而影响HPA轴。海马功能的改变尤其是海马的损伤又往往与NMDA受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NR)密切相关,为此,我们设想:严重创伤时HPA轴的过度兴奋可能与海马NMDA受体有关。基于以上设想,我们以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,分别观察了海马内微量注射NR的拮抗剂MK-801或NR的功能受体NR1的反义寡核酸(Oligodeoxynucleotide,ODN)对烫伤HPA轴的影响,以了解海马NR在烫伤导致的HPA轴过度兴奋中的作用。

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:陆建华(1966-),男,江苏省南通市人,博士,主治医师,主要从事创伤应激不良发生机制方面的研究。电话:(023)68752254
通信作者:黎海蒂,电话:(023)68752253
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-11-16

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

1　材料与方法

1.1　动物分组

实验分两部分, 第一部分检测海马内微量注射 NR 拮抗剂 MK-801 对 HPA 轴兴奋性的影响: 本校实验动物中心提供的成年 Wistar 大鼠 40 只, 体重 200～250 g, 分为 5 组: ①对照组(n= 8); ②烫伤组(n= 8), 动物烫伤但不给予药物预处理; ③盐水组(n=8), 烫伤前 30 min 海马内微量注射生理盐水 5 μl; ④MK-801 6 μg 组(n= 8), 烫伤前 30 min 海马内微量注射 MK-801 6 μg (每侧 3 μg, 溶于 5 μl 生理盐水中); ⑤MK-801 12 μg 组(n= 8), 烫伤前 30 min 海马内微量注射 MK-801 12 μg(每侧 6 μg, 溶于 5 μl 生理盐水中)。各组于烫伤后 2 h 测定血皮质醇浓度及促肾上腺皮质激素(ACTH)浓度。烫伤组动物背部剃毛, 以剃毛区浸入 90℃水 10 s 造成 30%TBSA Ⅲ度烫伤; 对照组动物背部剃毛后浸入 37℃温水 10 s 作为对照。

第二部分检测海马内微量注射 NR 的功能受体 NR1 的反义寡核酸(Antisense oligodeoxynucleotides, 反义 ODN)对 HPA 轴兴奋性的影响: ①对照组; ②烫伤组, 动物烫伤但不给予药物预处理; ③盐水组, 烫伤前 30 min 海马内微量注射生理盐水 5 μl; ④正义链(Sense)组, 烫伤前 3 d 海马内微量注射 NR1 的正义链 20 nmol/l; ⑤反义链(Antisense)10 nmol/L 组, 烫伤前 3 d 海马内微量注射 NR1 反义链 10 nmol/L(每侧 5 nmol/l, 溶于 5 μl 生理盐水中); ⑥反义链 20 nmol/L 组, 烫伤前 3 d 海马内微量注射 NR1 反义链 20 nmol/L(每侧 10 nmol/l, 溶于 5 μl 生理盐水中)。③、④、⑤注射药物 3 d 后随机选取动物通过 Western blot 方法测定海马 NR1 蛋白水平的变化, 以此检验 NR1 反义 ODN 抑制 NR1 表达的效果。

1.2　海马内微量注射方法

戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 固定于脑立体定位仪上, 根据 Bures 图谱, 于双侧背海马(P: 3.0, LR: 2.0, H: 3.5)分别埋置不锈钢导管(外径 0.7 mm, 内径 0.4 mm), 以牙托粉固定于颅骨上。术后 3 d 开始实验。进行脑内注射时, 将清醒大鼠固定于敞式装置上, 在埋植的导管中插入注射内管, 注射时间不少于 5 min。

1.3　血清 ACTH 及皮质醇浓度的检测

动物断头处死, 收集血液, 通过离心分离血清, ACTH 测定采用美国 DPC 公司的 ACTH 放免检验药盒检测, 皮质醇测定采用 Amersham 公司的皮质醇放免检验药盒检测。

1.4　NR1 反义 ODN 的设计

根据文献[3]设计针对 NR1 mRNA 的反义 ODN, 序列为: 5′-G CAG GTG CAT GGT GCT CAT G-3′。实验中以盐水及 NR1 的正义链作为对照, 正义链序列[4]为: 5′-C ATG AGC ACC ATG CAC CTG G-3′。正义链和反义链均经过硫磷修饰, 由上海生物工程公司合成。

1.5　Western blot 方法测定 NR1 反义 ODN 对 NR1 蛋白水平的影响

动物断头活杀, 取海马按 1∶10 加入匀浆缓冲液(mmol/L: 50 MOPS, 0.2 DTT, 100 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 0.5 Na_3VO_4, 0.1 EDTA, 1 EGTA, 0.5 ou abain, 以及 50 μg/ml Leupeptin, 5 μg/ml pepstain 和 0.32 mol/L sucrose)高速匀浆(10 s×6 次), 800×g 离心 10 min, 取上清液, Lowry 法蛋白定量, 40 μg 总蛋白上样, SDS-PAGE 电泳分离后, 以湿转法电转移至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜浸入封闭液, 4℃过夜, 加入用封闭液稀释的一抗(兔抗 NR1, Santacruz 公司), Buffer A 洗膜 10 min×3 次, 加入二抗(1∶300 的生物素标记的羊抗兔 IgG, 北京中山), 37℃孵育 30 min, 洗膜 3 次, 加入 3 抗(1∶300 辣根酶标记链酶卵白素, 北京中山), Buffer A 洗膜 3 次, 最后将膜放入 DAB 溶液中显色, 目的蛋白条带在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统上分析处理。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 利用 SPSS 10.0 统计软件对组间数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　MK-801 对 HPA 轴兴奋性的影响

与对照组相比, 严重烫伤后 2 h, 血清 ACTH 及皮质醇浓度明显升高; 与烫伤组相比, 海马内微量注射生理盐水, 没有明显改变烫伤后血清 ACTH 及皮质醇浓度; 海马内微量注射 MK-801 6 μg 可明显降低烫伤后血清 ACTH 及皮质醇浓度; 注射 MK-801 12 μg 可进一步降低血清 ACTH 及皮质醇浓度, 见表 1。

表 1　MK-801 对烫伤后 HPA 轴兴奋性的影响($\bar{x}\pm s$)

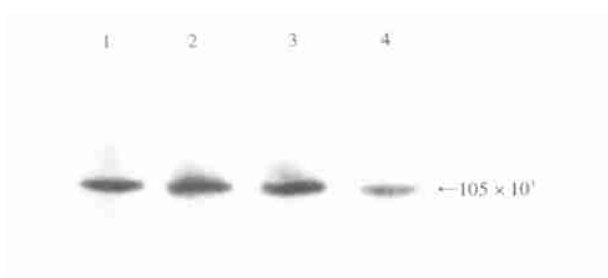
Tab 1　Effects of hippocampal injection of MK801 on serum ACTH and cortisol concentration after burn($\bar{x}\pm s$)

Group	Cortisol(ng/ml)	ACTH (pg/ml)
Control	35±2	62±8
Burn	301±43 **	200±17 **
Saline	310±36 **	209±18 **
MK-801 6 μg	102±18 **##	124±15 **##
MK-801 12 μg	72±17 **##△	105±11 **##△

**: $P<0.01$ *vs* Control; ##: $P<0.01$ *vs* Burn; △: $P<0.05$ *vs* MK-801 6 μg group

2.2　反义 ODN 对 HPA 轴兴奋性的影响

通过 Western-blot 方法, 发现海马内微量注射 NR1 反义链可显著抑制 NR1 蛋白的表达, 而海马内微量注射 NR1 正义链及生理盐水未引起 NR1 蛋白的明显变化, 见图 1。与烫伤组相比, 海马内微量注射正义链及生理盐水, 烫伤后血清 ACTH 及皮质醇浓度没有明显改变; 海马内微量注射反义链 10 nmol/L 可明显降低烫伤后血清 ACTH 及皮质醇浓度; 注射反义链 20 nmol/L 可进一步降低血清 ACTH 及皮质醇浓度, 见表 2。



1: Normal rat; 2: Rat treated with normal saline; 3: Rat treated with NR1 sense; 4: Rat treated with NR1 antisense

图 1　NR1 反义 ODN 对 NR1 蛋白水平的影响

Fig 1　Effects of NR1 ODN on NR1 protein level

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

表2 NR1反义ODN对HPA轴兴奋性的影响

Tab 2 Changes of serum ACTH and cotisol concentration in burn rats pretreated with hippocampal injection of NR1 ODN

Group	Cortisol (ng/ml)	ACTH (pg/ml)
Control	35±2	62±8
Burn	301±43 **	200±17 **
Saline	310±36 **	209±18 **
Sense	329±41 **	204±19 **
Antisense 10 nmol	189±12 **##	120±7 **##
Antisense 20 nmol	78±6 **##△△	109±9 **##△

**: $P<0.01$ *vs* Control; ##: $P<0.01$ *vs* Burn; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Antisense 10 nmol group

3 讨论

HPA轴兴奋时,促肾上腺皮质激素释放激素合成增加,刺激垂体前叶释放ACTH,进而影响肾上腺皮质,使其释放皮质激素,血清皮质激素水平是其最终表现形式。我们参考文献,使用血清ACTH及皮质醇水平的变化代表HPA轴兴奋性的变化[5]。我们的实验显示:严重烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度明显升高,说明严重烫伤导致HPA轴过度兴奋,应激反应强烈,这与文献报道是一致的。

传统的观点认为,HPA轴的兴奋,主要与下丘脑、垂体、肾上腺有关。现在普遍的观点认为:下丘脑和海马是两个最重要的调控HPA轴兴奋性的脑区,下丘脑通过HPA轴控制基础条件下HPA轴的兴奋性,而海马发放冲动控制应激导致的HPA轴的变化[6,7]。近年来,神经递质对HPA轴调控的研究倍受重视,Srivastava等[8]用制动法使大鼠应激,给不同年龄组大鼠皮下注射NMDA,结果发现,NMDA注射组的血浆LH、GnRH、ACTH和FSH均显著高于对照组。但其作用途径仍不清楚,有人认为可能直接作用于下丘脑;由于海马含浓密的NR受体,也有人认为海马可能是作用部位之一[9],因此,进一步研究具体脑区神经递质受体对HPA轴的影响很有必要。我们的实验显示,海马内微量注射生理盐水未引起严重烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度的明显变化,海马内微量注射MK-801 6 μg可明显降低烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度,注射更高浓度的MK-801则可进一步降低烫伤后血清ACTH及皮质醇浓度,说明在严重烫伤情况下,HPA轴的兴奋程度依赖于海马NR通道的激活程度,抑制海马NR的激活可抑制HPA轴的过度兴奋,初步证明海马NR参与了烫伤HPA轴的亢进。

反义ODN的效能及结果尚存在一定的争议,但大量资料表明它是一个有效抑制基因表达的手段。分子克隆显示NR有5种亚型:1种NR1、4种NR2(NR2A-2D)[10]。NR1是NR的功能单位。我们实验中设计的NR1反义ODN亦成功地抑制了海马NR1蛋白水平的表达,而正义链及生理盐水对NR1的表达无明显影响,证明我们设计采用的NR1反义ODN是有效的,可以用它来研究NR的作用。

实验中,我们将足量NR1反义链注入双侧海马,有效抑制了烫伤引起的血清ACTH及皮质醇浓度的上升,而正义链及生理盐水均未产生这样的作用,这说明NR1是烫伤HPA轴兴奋的途径之一。NR1是NR的功能受体,Ca^{2+}通过NR内流的通道就存在于NR1中,缺乏NR1的NR无法实施NR的功能。结合前面的实验,这些结果进一步证明海马NR参与了烫伤HPA轴的过度激活。

已经知道,创伤引起的HPA轴过度激活可导致机体免疫功能抑制,近期的诸多研究表明,创伤后的免疫抑制可促进感染的发生[11],从而诱发SIRS、MODS等并发症。既往人们对创伤MODS等并发症的注意力几乎都集中在致炎性介质方面,形成了抗炎性介质、抗细胞因子治疗的理论,但这样的治疗结果往往效果不佳。根据我们实验中观察到海马NR的激活是严重烫伤HPA轴亢进的重要原因,我们认为,如果通过调节NR通道的活性来调节创伤后HPA轴的兴奋、改善机体神经-内分泌-免疫功能,可能有益于创伤救治。

参考文献:

[1] De Kloet E R, Vreugdenhil E, Oitzl M S, *et al*. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease[J]. Endocr Rev, 1998, 19(3): 269—301.

[2] Korte S M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2001, 25(2): 117—142.

[3] Lai S K, Wong C K, Yang M S, *et al*. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat neostriatum after a single dose of antisense oligonucleotide specific for N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit[J]. Neuroscience, 2000, 98(3): 493—500.

[4] Standaert D G, Testa C M, Rudolf G D, *et al*. Inhibition of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit expression by antisense oligonucleotides reveals their role in striatal motor regulation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 276(1): 342—352.

[5] Duclos M, Gatta B, Corcuff J B. Fat distribution in obese women is associated with subtle alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and sensitivity to glucocorticoids[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2001, 55(4): 447—454.

[6] Gabr R W, Birkle D L, Azzaro A J. Stimulation of the amygdala by glutamate facilitates corticotropin-releasing factor release from the median eminence and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in stressed rats[J]. Neuroendocrinology, 1995, 62(4): 333—339.

[7] Spencer R L, Kim P J, Kalman B A, *et al*. Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity[J]. Endocrinology, 1998, 139(6): 2718—2726.

[8] Srivastava R K, Akinbami M A, Mann D R. Acute immobilization stress alters LH and ACTH release in response to administration of N-methyl-D, L-aspartic acid in peripubertal and adult male rats[J]. Life Sci, 1995, 56(18): 1535—1543.

[9] Altamura A C, Boin F, Maes M. HPA axis and cytokines dysregulation in schizophrenia: potential implications for the antipsychotic treatment[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 1999, 10(1): 1—4.

[10] 陆建华, 黎海蒂, 高京生. 烫伤大鼠海马N-甲基-D-天冬氨酸受体亚型基因表达的变化[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(3): 180—182.

[11] Bone R C. Sepsis, SIRS, and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1125—1128.

(编辑 汪勤俭)

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