DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.020
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jua. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0138-03

NMDA受体对烫伤应激大鼠海马糖皮质激素受体基因表达的影响

陆建华[1],党 健[2],黎海蒂[1],高京生[3],熊 加祥[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 观察烫伤应激后海马糖皮质激素受体(GR)基因表达的变化,探讨N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体在这种变化中的作用。方法 利用RT-PCR技术,检测烫伤前腹腔注射NMDA受体拮抗剂MK-801及激动剂NMDA对烫伤应激后2 h GR mRNA水平的影响。结果 烫伤应激后2 h海马GR mRNA水平明显降低($P<0.01$);应激前腹腔注射MK-801使烫伤后降低的GR mRNA水平明显恢复($P<0.01$),注射NMDA使其进一步降低($P<0.05$),注射生理盐水无明显变化。结论 NMDA受体介导了烫伤应激导致的海马GR转录水平基因表达的下降。

关键词:烧伤;应激;海马;NMDA受体;糖皮质激素受体;基因表达
中图法分类号:R392.11;R392.13;R644 文献标识码:A

Effects of NMDA receptor on glucocorticoid receptor mRNA levels in hippocampus of rats after scald burn stress

LU Jian-hua, DANG Jian, LI Hai-di, GAO Jing-sheng, XIONG Jia-xiang (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of glucocorticoid receptor (GR) gene expression in the hippocampus of rats following scald burn stress and the role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in this change. Methods Adult male Wistar rats inflicted with 30% TBSA full thickness scalding were applied as severe scalding stress model. GR mRNA levels in the hippocampus were detected with RT-PCR. Results A significant decrease of GR mRNA levels was observed in the hippocampus 2 h after the scalding stress. The decrease could be inhibited when MK-801, an NMDA-receptor antagonist, was administered prior to stress, and be augmented with the administration of NMDA, an NMDA-receptor agonist, but not be affected by normal saline. Conclusion NMDA receptors are involved in the scalding stress-induced down-regulation of GR gene expression in the rat hippocampus.

Key words: burns; stress; hippocampus; NMDA receptors; glucocorticoid receptors; gene expression

创伤后应激失调的一个重要方面是糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)水平下降,GR水平下降可能是创伤休克乃至于系统性炎性反应综合征的重要原因[1~4],因此,研究创伤后机体GR的变化并设法对其调控有助于创伤救治,然而,目前严重创伤如烫伤后GR的研究报道主要集中于外周脏器,而脑GR的报道很少,实质上,脑内海马是GR的高分布区域,海马GR可维持机体的稳态,终止过度的应激反应,防止机体神经-内分泌-免疫功能紊乱[5],为此,我们观察了预先阻断或激活N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体对烫伤后海马GR mRNA水平的影响,以期寻找创伤后海马GR的有效调节手段。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

MK-801、NMDA为Sigma公司产品,*Taq* DNA聚合酶为Promega公司产品,M-Mulv逆转录酶、Oligo(dT)$_{15}$、dNTP、RNase抑制剂、PCR Marker为MBI公司产品。

1.2 动物分组及处理

成年Wistar大鼠共40只,体重200~250 g,分为5组(每组8只):①对照组;②烫伤组,动物行烫伤应激但不给予药物预处理;③烫伤+MK-801组,烫伤应激前30 min腹腔注射足量MK-801(3 mg/kg溶于0.4 ml生理盐水),④烫伤+NMDA组,烫伤应激前30 min腹腔注射NMDA(5 mg/kg溶于0.4 ml生理盐水),⑤烫伤+盐水组,烫伤应激前30 min经腹腔注射生理盐水0.4 ml。动物背部剃毛,浸入90℃热水10 s造成30% TBSA Ⅲ度烫伤作为严重烫伤应激模型,以浸入温水10 s作为对照,于浸水后(伤后)2 h取材。

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:2002-01-22;修回日期:2002-06-14

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

1.3　引物设计

参考文献[6]设计出的 GR 上下游引物序列为: 5′-GTGAAATGGGCAAAGGCGATAC-3′ 和 5′-GAAGAGAAACGAGCAAGCATAG-3′, 扩增片段 1 157 bp; 内参照为β-actin, 扩增片段为 630 bp。以上引物皆由上海生物工程公司合成。

1.4　RT-PCR

各组动物活杀断头取海马, 按常规方法提取 RNA。取 RNA 4 μg 用 DEPC-DW 补至 10.5 μl, 70℃ 5 min, 各逆转录体依次加入: RNase 抑制剂 0.5 μl, dNTP 2.0 μl, Oligo(dT)$_{15}$ 2.0 μl, 5× Buffer 4.0 μl, DEPC-DW 0.5 μl, 逆转录酶 1.0 μl, 37℃ 1 h; 70℃ 10 min 合成 cDNA。在 0.5 ml Eppendorf 管中依次加入: cDNA 4 μl, 10× Buffer 5 μl, dNTP 1 μl, 目的上下游引物各 1 μl, β-actin 上下游引物各 1 μl (12.5 pmol/μl), ddH_2O 32.5 μl, $MgCl_2$ 3 μl, *Taq* 酶 0.5 μl, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 进行 30 循环, 72℃延伸 5 min。PCR 产物在 1.7% 琼脂凝胶中电泳。

1.5　RT-PCR 半定量

将电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统上分析, 以 GR 与β-actin 的光密度比值表示最终结果。

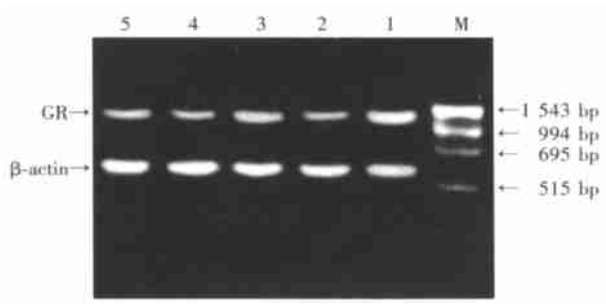
1.6　统计学处理

单因素用方差分析检验组间数据差异的显著性。

2　结果

2.1　PCR 扩增产物

利用 RT-PCR 技术和设计的引物, 在上述选定的实验条件下, 分别得到了上述 5 组海马 GR 的扩增产物, 见图 1。



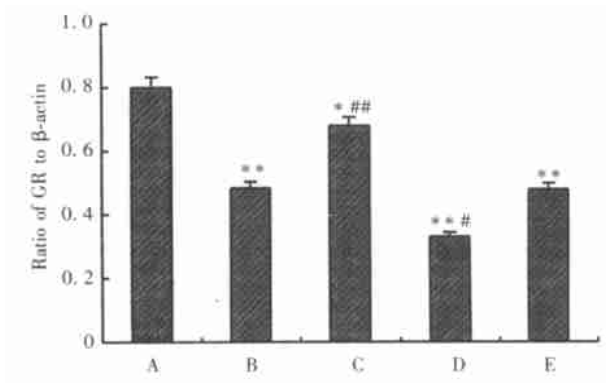
M: PCR marker; 1: Control; 2: Burn rats; 3: Burn rats with MK-801 injection; 4: Burn rats with NMDA injection; 5: Burn rats with normal saline injection

图 1　各组大鼠海马 **GR mRNA RT-PCR** 产物的电泳图谱

Fig 1　Electrophoresis of GR mRNA RT—PCR products

2.2　凝胶图像分析

将电泳凝胶上的条带置于 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统分析, 发现 PCR 目的产物量/β-actin 产物量的比值最终结果出现如下变化: ①烫伤组 GR mRNA 水平明显降低, 为对照组的 60.5% ($P<0.01$)。②烫伤+MK-801 组 GR mRNA 水平低于对照组($P<0.05$), 但明显高于烫伤组, 为烫伤组的 140.1% ($P<0.01$)。③烫伤+NMDA 组 GR mRNA 显著低于对照组, 为对照组的 41.4% ($P<0.01$), 也显著低于烫伤组($P<0.05$)。④烫伤+盐水组 GR mRNA 水平与烫伤组相比无明显变化, 见图 2。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Burn; A: Control; B: Burn; C: Burn+MK-801; D: Burn+NMDA; E: Burn+saline

图 2　腹腔注射 **NMDA** 受体阻断剂及激动剂对烫伤后大鼠海马 **GR mRNA** 水平的影响

Fig 2　GR mRNA levels in the hippocampus of the 5 different groups of rats

3　讨论

海马神经细胞中富含肾上腺皮质激素的两种受体: 盐皮质激素受体(MR)、糖皮质激素受体(GR), 两种受体的平衡对神经细胞的兴奋性、应激反应、行为适应起非常重要的作用。MR 主要参与基础水平的 HPA 轴的调节, GR 则抑制应激条件下 HPA 轴的过度反应[5]。

最近的一些研究表明, 慢性应激可导致海马 GR 结合力及 GR mRNA 水平下降[7], 但是, 急性应激尤其是脑以外器官的创伤应激对海马 GR 功能及 GR 水平的影响仍不明确, 我们的研究表明: 作为一种强烈的伤害性应激, 背部 30%TBSA III度烫伤可导致远隔器官—海马 GR mRNA 水平的下降。

海马 GR 存在自我调节, 还可能受到神经递质的影响。NMDA 受体是兴奋性神经递质谷氨酸的离子型受体, 通道开放时, 主要介导阳离子内流, 尤其是 Ca^{2+} 的内流。NMDA 受体参与兴奋性突触传递、神经递质释放、突触长时程增强等生理活动[8], NMDA 受体的过度激活还参与体内的许多病理生理反应。我们的研究显示: 应激前腹腔注射 MK-801 阻断 NMDA 受体可明显抑制烫伤所致的 GR mRNA 水平的下降, 注射 NMDA 进一步激活 NMDA 受体可使烫伤所致的 GR mRNA 水平进一步降低($P<0.05$), 注射生理盐水对烫伤后下降的 GR mRNA 无明显影响, 这些结果证明烫伤应激时海马 GR 转录水平的基因表达受到 NMDA 受体的调控。

作为一种离子通道受体, NMDA 受体活性具有明显的可调控性, 神经科学目前的一大热点就是通过调控 NMDA 受体的活性来调控某些病理生理反应, 根据

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

上述烫伤应激时NMDA受体对GR基因表达的影响，提示抑制NMDA受体活性可以调控海马GR，从而有助于维持机体的稳态，及时终止过度的应激反应。

NMDA受体的激活可导致细胞内Ca^{2+}浓度的上升，Ca^{2+}的上升可激活Ca^{2+}依赖的激酶，从而使环腺苷酸单磷酸反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）磷酸化，磷酸化CREB与环腺苷酸单磷酸反应元件（cAMP/Ca^{2+} response elements，CREs）的DNA的一段特殊序列结合，可调节（增加或抑制）反应基因的表达。我们实验中NMDA受体引起GR mRNA表达下调的分子机制是否是通过这种途径有待进一步证明。

参考文献：

[1] Fan J, Gong X Q, Wu J, *et al*. Effect of glucocorticoid receptor (GR) blockade on endotoxemia in rats[J]. Circ Shock, 1994, 42(2): 76—82.
[2] Reichardt H M, Umland T, Bauer, *et al*. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(23): 9009—9017.
[3] Quan N, Avitsur R, Stark J L, *et al*. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock[J]. J Neuroimmunol, 2001, 115(1—2): 36—45.
[4] Golikov P P, Kozhevnikova L M, Nikolaeva N I, *et al*. Glucocorticoid receptor function in hemorrhagic shock and its treatment by calcium antagonist [J]. Vopr Med Khim, 1997, 43(3): 139—147.
[5] 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.
[6] Beaman Hall C M, Wainer B H, Eves E, *et al*. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in an immortalized hippocampal neuronal cell line[J]. Brain Res, 1996, 726(1—2): 141—152.
[7] Gomez F, Lahmame A, de Kloet E R, *et al*. Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level[J]. Neuroendocrinology, 1996, 63(4): 327—337.
[8] LIU Yun, ZHANG Juntian. Recent development in NMDA receptors[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(10): 948—956.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)02-0140-01

脊髓亚急性联合变性6例临床分析

Clinical analysis for 6 cases of subacute combined degeneration of spinal cord

李凤鹏，郑 健 （第三军医大学附属新桥医院神经内科，重庆 400037）

随着营养卫生和医疗保健水平的提高，脊髓亚急性联合变性的发病率较以往大为降低。现将我院收治的6例脊髓亚急性联合变性的临床特点总结如下，以利共同提高对本病的认识。

1 资料分析

1.1 一般资料

男性5例，女性1例，平均年龄41岁。从发病到确诊时间平均9月。既往史有胃溃疡2例，胆汁反流性胃炎1例。

1.2 临床表现

4例表现为脊髓后索损害，4例表现为脊髓侧索损害，3例表现为括约肌功能障碍，全部患者均表现为周围神经损害。

1.3 辅助检查

1.3.1 周围血象 3例表现为大细胞低色素性贫血，其中轻度贫血1例，中度贫血2例。

1.3.2 胃泌素测定 1例行胃泌素放射免疫测定，结果明显高于正常值。本例患者存在中度贫血。

1.3.3 电生理检查 有周围神经受损临床表现的2例患者，行周围神经感觉神经传导速度检查，结果均明显减慢。

1.4 治疗与转归

在对症支持治疗的基础上，6例患者住院期间全部接受维生素B12治疗，500～1 000 μg，肌肉注射，1次/d。3例大细胞低色素性贫血的患者同时口服叶酸，10 mg，3次/d。经过2～3周的治疗，贫血均得到纠正，周围神经、括约肌损害症状改善明显，脊髓后索、脊髓侧索损害症状改善不明显。

2 讨论

本组6例患者中3例既往有胃部疾病史。另有1例尽管既往无胃病史，但胃泌素测定结果明显高于正常，提示胃酸分泌减少。表明维生素B12吸收障碍是本组患者的主要病因。

本组患者中多有脊髓后索、脊髓侧索和周围神经损害的临床表现，与以往报道的脊髓亚急性联合变性病理特点吻合[1]。对2例存在周围神经损害症状患者的检查发现感觉神经传导速度均减慢，表明感觉神经传导速度测定是判断周围神经损害的较敏感指标[2]。

本组患者经过治疗，贫血均得到纠正，周围神经、括约肌损害症状改善明显。然而，脊髓后索、脊髓侧索损害症状改善不明显，可能与其损害较重，以及未能及时接受治疗有关。本组

（下转146页）

作者简介：李凤鹏（1977— ），男，河南省新乡市人，硕士，医师，主要从事老年期痴呆方面的研究。电话：13018336268。

收稿日期：2002-01-11；修回日期：2002-07-15

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