Cancer Res, 1996, 56(3): 544
11 Wundealich V M, Schutt M B, Oraffi A. Preferential alkylation of mitochondrial deoxyribonucleic acid by N-methyl-N-nitrosourea. Biochem J, 1970, 118(2): 99
12 Coller H A, Khrapko K, Torres A, *et al*. Mutational spectra of a 100-base pair mitochondrial DNA target sequense in bronchial epithelial cells: A comparison of smoking and nonsmoking twins. Cancer Res, 1998, 58(6): 1268
13 Niranjan B G, Bhat N K, Avadhani N G, *et al*. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. Science, 1982, 215(3): 73
14 Boultwood J, Fidler C, Mills K I, *et al*. Amplification of mitochondrial DNA in acute myeloid leukaemia [see comments] Br J Haematol, 1996, 95(2): 426
15 Liang Bc, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. Cancer Lett, 1996, 105(2): 167
16 Varma V A, Cerjan C M, Abbott K L, *et al*. Non-isotopic in situ hybridization method for mitochondria in oncocytes. J Histochem Cytochem. 1994, 42(2): 273
17 Ivanova R, Lepage V, Loste M N, *et al*. Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells. Int J Cancer, 1998, 76(4): 495
18 Alonso A, Martin P, Albarran C, *et al*. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. Electrophoresis, 1997, 18(5): 682
19 Cavalli L R, Varella G M, Liang B C, *et al*. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. Cell Growth Differ, 1997, 8(11): 1189
20 Morais R, Zinkewich K, Parent M, *et al*. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. Cancer Res, 1994, 54(14): 3889
21 Zullos A. Mitochondrial D-loop sequences are integrated in the rat nuclear genome. J Mol Biol, 1991, 211(2): 1223
22 Dombroshi B A. Isolation of an active human transposable element. Science, 1991, 254(3): 1805
23 Shay J W. Hela TG cells have mitochondrial DNA inserted into the c-myc oncogene. Oncogene, 1991, 6(2): 1869
24 Liang B C. Evidence for association of mitochondrial DNA sequence amplification and nuclear localization in human low-grade gliomas. Mutat Res, 1996, 354(1): 27

(收稿: 1999-05-06;修回: 1999-08-23)
(编辑 汪勤俭)

应激与神经肽

Stress and neuropeptides

李泽桂* 综述 陆振山** 蔡文琴 审校 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 400038

第一个将应激(Stress)一词用于生物学和医学的是 Selye, 他对 Stress的解释是,"机体在受到各种有害刺激后,产生的可使机体特异性抵抗力增强的非特异性反应"。以后有人认为给 Stress作如下的定义更为合适,即"应激是机体受到强烈刺激后发生的,以交感神经-肾上腺髓质和垂体-肾上腺皮质功能增强为主要特点的非特异性反应"。此时,① 丘脑下部大量分泌促肾上腺皮质激素释放因子(Corticotropin-releasing factor, CRF)和血管加压素(Vasopressin, VP)为主的生物活性肽。② 垂体前叶分泌促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotropin hormone, ACTH)。③ 肾上腺皮质分泌大量的糖皮质激素(Glucocorticoid)。④ 交感神经和肾上腺髓质释放儿茶酚胺(Catecholamine)增加。上述激素加上其它神经肽的协同作用[1],共同调节心血管系统,免疫系统和能量代谢系统,以提高机体在紧急情况下,通过改变内环境来适应外界变化的能力。早在 19世纪,生理学家 Bernard首次提出机体有一个维持内环境平衡的调节机制。本世纪初,Walteer从一系列设计严密的实验中发现,在上述机体维持内环境的调节机制中,交感肾上腺髓质系统起重要作用。他观察到应激时组织产生一种称为"Sympathin"的物质,后来被证实为是肾上腺素(Epinephrine)和去甲肾上腺素(Norepinephrine)。在以后的 30年中,许多学者发现各种应激都刺激了垂体前叶细胞释放 ACTH, ACTH又刺激糖皮质激素从肾上腺皮质分泌入血,血中升高的皮质激素又反过来抑制 ACTH在前叶的释放。另外,儿茶酚胺也通过与神经肽的关系间接影响 ACTH的分泌。近年来,随着神经内分泌学的进展,特别是分子生物学技术的建立,通过对血中,组织中应激激素及其受体的超微量测定,已经发现了许多神经肽在应激中发生变化。本文主要介绍 CRF和 VP在应激反应中的变化。

1 应激与 CRF

促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)是应激反应的主要调节者[2],通过控制丘脑下部-垂体-肾上腺轴发挥作用[3]。Saffran和 Guillemin在体外实验中,首次发现丘脑下部提取物能使垂

* 李泽桂,女,46岁,副教授,博士研究生
** 华西医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室 成都, 610041

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

体前叶细胞释放 ACTH 以后的许多实验证实 ACTH的释放是受控于丘脑下部及其产生的 CRF 但是直到 1981年,Vale等[3]才从羊脑中分离提纯了 CRF,并证明其分子结构是含 41个氨基酸残基的多肽,且进行了人工合成。文献报道 CRF胞体主要分布于室旁核 (Paraventricular nucleus, PVN),视上核 (Supraoptic nucleus),内侧和室周视前核 (Medial and periventricular preoptic),乳头体前核 (Premammillary nucleus)及丘脑下部以外的脑区,如终纹床核 (Bed nuclei of the stria terminalis),中央杏仁核 (Central amydaloid nucleus),嗅球、蓝斑等。在丘脑下部正中隆起 (Median eminence, ME)。CRF免疫反应阳性的神经终末密集存在于外带,内带较稀[4]。除此之外,CRF免疫阳性纤维还出现在背侧迷走复合体和脊髓[5]。

广泛分布于脑内的 CRF与内分泌,神经化学,行为等多种生理反应有关,但在遍布中枢的 CRF神经元群体中,仅有少数与应激 (Stress)有关,其中丘脑下部 PVN的 CRF神经元就是各种应激反应的主要调节者[6],这是一些较小的梭形细胞,它们发出纤维,经正中隆起外带释放入血,到垂体前叶调节 ACTH的分泌。PVN内 CRF的增高或降低,取决于应激反应的类型。Rivest等[7]的研究显示,在免疫应激 (Immunogenic stress)时,脑内所有的 CRF表达区域中,仅 PVN显示增加了 CRF的转录活性。

生理学研究显示,在应激早期鼠丘脑下部正中隆起的 CRF量呈现双相变化,即从应激开始 2~ 20 min, CRF呈现迅速升高而又下降的第一个高峰,称为快相期 (Rapid phase);从 40~ 80 min,出现缓慢上升而下降的第二个高峰,称为慢相期 (Slow phase)。Moldow认为快相期的出现是由于应激开始时,应激源刺激 CRF量增多,使 ACTH分泌增多而导致肾上腺皮质激素升高,以后升高的皮质激素反馈抑制 CRF的分泌,故出现 CRF的下降。慢相期的出现是由于应激源的继续作用,引起 CRF量第二次升高。其它的实验又证明,在应激早期,CRF经历了一个先降低后增高的过程[8],提示先降低是由于应激使其迅速释放,而后升高是由于增加了合成。上述实验得到不完全一致的结果是由于应激源的不同和检测方法的差异。而在应激的晚期,丘脑下部 CRF量均是增高的。CRF可被秋水仙素和蛋白质合成抑制剂阻断,提示应激使 CRF量的合成、运输和释放均增加。

免疫电镜显示,大鼠正中隆起存在两种类型的 CRF轴突[9],一种是含血管加压素 (VP)的 CRF轴突,一种是不含 VP的 CRF轴突,二者各占 50%,这两类不同的轴突群反映 CRF神经元是两个不同的调节系统,不同的刺激使不同比例的 CRF释放入血。这种调节的差异性与在不同应激状态下垂体门脉血中不同的 CRF VP比例有关。一般生理条件下,由丘脑下部室旁核产生的 CRF,经 ME外带入血。但我们的实验观察到,某些应激动物的室管膜出现含 CRF免疫产物的伸长细胞 (Tanycyte),提示在应激状态下,经正中隆起外带的通路是否有超负荷现象,因而有较多的 CRF由伸长细胞转运入脑脊液,再经位于正中隆起方向的伸长细胞转运入垂体门脉血。

研究发现,应激情况下 CRF参与调节垂体 ACTH的根据是:① 中枢内 CRF的主要合成部位是 PVN的小细胞部,CRF的主要释放部位是正中隆起的外带。提示 CRF主要经垂体门脉系统到腺垂体调节 ACTH分泌。② 在应激中 PVN内 CRF升高的同时伴随有 CRF mRNA的升高[10],提示应激使 CRF合成增加。③ 中和 CRF的作用或用 CRF受体的拮抗剂处理,可降低 ACTH的分泌。④ 有高亲合力的 CRF受体分布于垂体前叶的 ACTH分泌细胞[11]。关于 CRF调节 ACTH分泌的机制,文献报道 CRF能作用于 ACTH分泌的两个环节,一是 CRF能刺激腺苷酸环化酶 (Adenylate cyclase)的活性从而使 cAMP生成增多;二是作用于依赖 cAMP的蛋白激酶使 ACTH释放。还有研究显示,CRF的活性受到肾上腺素的调节。当抑制脑内苯乙胺-N-甲基转移酶 (Phenyle-theholumine N-methyltransferase, PNMT)的活性时,室旁核 CRF神经元的免疫组化染色增强。因为 PNMT作用于去甲肾上腺素转变为肾上腺素,提示肾上腺素可能对室旁核 CRF神经元的分泌有调节作用[1]。

文献报道 CRF受体有两型,CRF-1型受体[12]和 CRF-2型受体[13,14]。CRF-1受体主要分布于中枢,而 CRF-2受体主要在周围组织表达[15]。一个有趣的现象是,正常情况下 CRF含量较高的 PVN内 CRF-1受体 mRNA却很低甚至检测不到[16],但在应激条件下,PVN的 CRF-1受体 mRNA才明显升高[17]提示应激中升高的 CRF可能激活了自身的受体。在 PVN内这种 CRF自身激活的现象称为 CRF自身调节的超短阳性反馈回路 (Ultra-short positive feedback loop)[18]。形态学研究也显示 PVN内 CRF胞体与 CRF终末形成突触连系[19]。我们观察到第三脑室室管膜内含有 CRF阳性的触液神经元,推测其可将 CRF释放入脑脊液;而伸长细胞可将释放入脑脊液中的 CRF转运入脑实质,通过超短阳性反馈回路加强 CRF自身的合成和分泌。从而在应激条件下发挥经济高效的作用,以使机体在应激源的不断刺激下,不断合成 CRF以达到新的内环境平衡。

2 应激与血管加压素 (VP)

在哺乳动物脑内,9肽精氨酸加压素 (Nonapeptides arginine vasopressin, AVP or VP)来自丘脑下部两个不同的神经元系统[20]。第一是来自室旁核和视上核的大细胞部 (Magnocellular portion),其轴突经正中隆起投射到垂体后叶,属于丘脑下部-神经垂体系统 (Hypothalamic-neurohypophysial system, HNS)[21];第二是来自 PVN的小细胞部 (Parvocellular portion),其轴突终止于 ME外带,在此释放 VP入垂体门脉系统,作用于前叶细胞分泌促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotropic hormone, ACTH),属于丘脑下部-垂体-肾上腺系统 (Hypothalamic-pituitary adrenal system, HPA)。Holmes等[22]也证实,正中隆起存在两种类型的 VP神经纤维,来源于室旁核的小细胞的纤维呈膨体状,在外带围绕垂体门脉有孔毛细胞血管,并在此释放入血调节前叶多种激素主要是 ACTH的分泌。来自室旁核和视上核大细胞的突起经正中隆起内带到垂体

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

后叶,主要的功能是维持血压和调节水代谢。

VP是第一个被发现具有 CRF作用的神经肽,能作用于垂体前叶细胞释放 ACTH。整个丘脑下部提取物刺激 ACTH分泌的作用比任何单一的促 ACTH分泌因子的作用强,在垂体前叶细胞的原代培养中,加入 VP和 CRF对 ACRH的释放作用大于单加 CRF的作用,提示 VP能增强 CRF的作用。早期曾认为,血中 VP量增高可作为应激的指标之一。但近来发现,不是每一种应激源都可直接引起血中 VP量的变化。因而推测应激源刺激 VP升高的部位在中枢。Norhite[23]用精氨酸加压素(AVP)抗血清于大鼠接受应激前就注入第三脑室,发现经 AVP抗血清处理的应激大鼠,其血中本该升高的 ACTH和黄体生成素(LH)比对照动物低,而在体外实验中则无此种作用。提示 VP发生作用的部位在中枢。即在丘脑下部水平,由于 AVP抗血清结合了 AVP,从而阻碍了 AVP对 CRF的增强作用,而导致 ACTH下降,同时也阻断了 AVP对黄体生成素释放激素(LHRH)的刺激作用而导致 LH下降。

垂体前叶 AVP的含量在各种应激状态下均增加,表明在应激状态下,AVP可到达垂体前叶,与前叶细胞受体相互作用,调节 ACTH、β-内非肽、黄体生成素等的释放,以适应机体对应激的需要。但在过去 10年中,人们一直重视 CRF的作用而忽略了 VP在应激中的作用。一般情况下,CRF是 ACRH的主要调节者,但应激时 VP可能是更重要的 ACTH的调节者。VP可在垂体水平直接作用于 ACTH的释放,也可在丘脑下部水平增强 CRF的作用而使 ACTH释放。认为 VP对 CRF的增强作用机制是提高前叶细胞的 CRF受体与腺苷酸环化酶的结合速度[1],而使 ACTH的合成和释放增加。丘脑下部 VP的分泌也受儿茶酚胺的作用,主要是去甲肾上腺素起了重要作用,文献报道是通过 α-1、α-2和 β肾上腺素受体作用于 VP的释放[24]。

长期以来,认为 PVN大细胞部产生的 VP只在垂体后叶释放入血,参与维持渗透压和水代谢平衡,只有 PVN小细胞部的 VP才参与应激反应的调节[25]。但是最近发现,一种慢性的应激反应使 PVN大细胞的 VP mRNA增高,同时伴随血中 ACTH升高,提示大细胞加压素神经元亦参与了 HPA系统的调节[26]。我们的实验结果亦提示参与 HPA轴调节不仅有 PVN的小细胞神经元,也有大细胞 VP神经元。有证据表明,PVN大细胞分泌的 VP可经 ME外带的垂体门脉血管到达垂体前叶,调节 ACTH的分泌。为什么大细胞 VP神经元亦参与 HPA调节?我们认为,当高强度的损伤应激时,能刺激 PVN产生大量 VP,在经过 ME时,高浓度的 VP足以使其进入垂体门脉系统,从而参与维持 HPA的活性。

关键词　应激;神经肽;CRF;VP
中图法分类号　R347;R363

参考文献

1 Axelrod J, Reisine T D. Stress hormones: Their interaction and regulation. Science, 1984, 224(4648): 452

2 Kant G J, Oleshansky M A, Walczak D D, *et al*. Comparison of the effects of corticotropin-releasing factor and stress on levels of pituitary cAMP and plasma ACTH *in vivo*. Peptides, 1986, 7(6): 1153

3 Vale W, Spiess J, Rivier C, *et al*. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and B-endorphin. Science, 1981, 213(4514): 1394

4 Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, *et al*. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor in rat brain. Am J Anat, 1982, 165(4): 385

5 Olschowka J A, O'donchue T L, Mueller G P, et al. Hypothalamic and extrahypothalamic distrbution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. Neuroendocrinology, 1982, 35(4): 305

6 Hwang B H, Guntz J M. Down regulation of corticotropin-releasing factor mRNA, but not vasopressin mRNA, in the paraventricular hypothalamic nucleus of rats following nutritional stress. Brain Res Bull, 1997, 43(5): 509

7 Rivest S, Laflamme N. Neuronal activity and neuropeptides gene transcription in the brains of immune-challenged rats. J Neuroendocrinol, 1995, 7(7): 501

8 Moldow R L, Kastin A J, Graf M, *et al*. Stress mediated changes in hypothalamic corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity. Life Sci, 1987, 40(4): 413

9 Whitnall M H, Smyth D, Gainer H. Vasopressin coexists in half of the CRF axons present in the external zone of the midian eminence in normal rats. Neuroendocrinology, 1987, 45(5): 420

10 Lightman S L, Harbuz M S, Knight K A, *et al*. CRF mRNA in normal and stress conditions. Ann NY Acad Sci, 1993, 697(29): 28

11 De Souza E B. CRF receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. Psychoneuroendocrinology, 1995, 20(6): 789

12 Chen R, Lewis K A, Perrin M H, *et al*. Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(19): 8967

13 Chalmers D T, Lovenbergn T W, De Souza E B, *et al*. Localization of novel corticotropin-releeasing factor-2 receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: Comparison with CRF1 receptor mRNA expression. J Neurosci, 1995, 15(10): 6340

14 Liaw C W, Lovenberg T W, Barry G, *et al*. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. En-

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

docrinology, 1996, 137(1): 72
15 Iredale P A, Terwilliger R, Widnell K L, *et al*. Differential regulation of CRF1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells. Mol Pharmacol, 1996, 50(5): 1103
16 Pottor E, Sutton S, Donaldson C, *et al*. Distributin of CRF receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. Proc Nat Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8777
17 Rivest S, Laflamme N, Nappi R E. Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. J Neurosci, 1995, 15(4): 2680
18 Mansi J A, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor mRNA in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. Endocrinology, 1996, 37(11): 4619
19 Silverman A J, Hou-Yu A, Chen W P. Corticotropin-releasing factor synapses within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Neuroendocrinology, 1989, 49(3): 291
20 Sofroniew M V. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. Trends Neurosci, 1983, 6(5): 467
21 Hatton G I. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. Prog Neurobiol, 1990, 34(6): 437
22 Holmes M C, Antoni F A, Aguilera G, *et al*. Magnocellular axon in passage through the median eminence release vasopressin. Nature, 1986, 319(6051): 326
23 Ono N, Bedran de Castro J, Khorrom O, *et al*. Role of arginine vasopressin in control of ACTH and LH release during stress. Life Sci, 1985, 36(18): 1779
24 Brooks D P, Share L, Croftron J T. Central adrenergic control of vasopressin release. Neuroendocrinology, 1986, 42(5): 416
25 Antoni F A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. Front Neuroendocriniol, 1993, 14(2): 76
26 Nakase S, Kitayama I, Soya H, *et al*. Increased expression of magnocellular arginine vasopressin mRNA in paraventricular nucleus of stress-induced depression-model rats. Life Sci, 1998, 63(1): 23

(收稿: 1999-04-12;修回: 1999-06-02)
(编辑 汪勤俭)

(上接 690页)

开展肾活检来确诊乙肝肾炎很困难,本文通过尿 HBsAg检测与血、肾小球内进行对比发现,此方法快速简便,标本来源容易,可作为难以施行肾活检儿童诊断乙肝相关性肾炎的筛检试验,并能较及时提示有无 HBV抗原对肾脏的损害。配合患儿肾脏病理组织学检查对其诊断有着重要的临床价值[4]。

肾活检资料表明,23例乙肝肾小球内、血和尿的 HBsAg阳性率分别为 78.3%、87%和 78.3%,在检测中血 HBsAg有 13%阴性即血 HBsAg阴性时,肾小球内 HBsAg 尿 HBsAg为阳性,肾活检结果可以说明,本文非乙型肝肾炎血 HBsAg 阴性的患儿中尿有 4.8% HBsAg阳性不能忽略,这可能是由于 HBV致 IC肾炎,可使 HBsAg HBeAg能通过肾小球基底膜(GBM)出现在尿中; HBV直接感染 GBM或 HBV抗原种植于 GBM形成原位 IC肾炎致尿 HBV抗原阳性而血 HBV抗原阴性;血 HBV抗原阳性与否可能受到 HBV感染的严重程度、机体的免疫状况、病程长短等影响[4]。因此对乙肝肾炎可疑患儿,尿 HBV抗原的检测,须随访半年复查三次,结合临床症状进一步诊断。

关键词 尿 HBsAg;肾活检;乙型肝炎相关性肾炎;筛检试验
中图法分类号 R446.12; R725.126.2

参考文献

1 刘湘云 主编.儿科学.上海: 上海医科大学出版社, 1992. 214~215
2 吴秀兰,葛 源,白克敏,等.乙型肝炎病毒相关性肾炎的临床与病理分析.中华儿科杂志, 1995, 33(4): 236
3 高寿征 主编.病毒肝炎防治研究.北京: 人民卫生出版社, 1993. 23~37
4 张恒言,李永柏,李 秋,等.检测尿 HBV抗原诊断乙型肝炎相关性肾炎的价值.实用儿科临床杂志, 1995, 10(6): 321
5 蔡文琴 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都: 四川科学技术出版社, 1994. 299~299

(收稿: 1999-02-16;修回: 1999-05-12)
(编辑 王 红)

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