DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.017

大鼠室旁核大细胞加压素神经元在烫伤应激中的变化

李泽桂* 陆振山** 蔡文琴 方一心** (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨室旁核 (PVN)的大细胞核加压素 (VP)神经元在烫伤应激中的作用。方法: 给予大鼠标准的 25% Ⅲ度皮肤烫伤,用免疫细胞化学 ABC法显示 PVN的 VP阳性神经元和正中隆起 (ME)内的 VP阳性纤维。结果: ① 烫伤大鼠 PVN代表平面 VP神经元的总面积增大,免疫染色增强,以大细胞 VP神经元增加为主。② ME内带的 VP免疫染色阳性纤维的面积密度和免疫染色强度均增加; 在 ME外带, VP阳性纤维的面积密度增加而免疫染色强度无显著性差异。结论: 烫伤应激使 PVN的 VP合成增加,特别是大细胞 VP神经元。提示大细胞 VP也参与了丘脑下部-垂体-肾上腺轴的调节,大细胞 VP可能涉及到相对高强度应激反应的调节。

关键词 烫伤; 应激; 室旁核; 大细胞加压素神经元
中图法分类号 R338.27; R644

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[1]。第一是来自室旁核和视上核 (Supraoptic nucleus, SON)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)[2]; 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)[3]。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,参与渗透压维持和水代谢平衡; 只有 PVN小细胞部的 VP才参与应激反应的调节[4]。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 VP神经元亦参与了 HPA系统的调节[5]。

烫伤使机体处于严重的失水状态,过去认为烫伤中升高的 VP只在垂体后叶释放[6]。但烫伤亦使机体进入应激状态,有理由认为 PVN大细胞产生的 VP也可能参与烫伤应激时 HPA系统的调节。为此,本实验用免疫细胞化学和图像分析技术研究急性烫伤应激反应大鼠 PVN的 VP神经元和 ME的 VP纤维含量的变化,旨在进一步探讨 VP在烫伤应激反应中的作用并为其提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

成年雄性 Wistar大鼠 20只,按随机配对的原则分为 4组。第 1组于伤后 24 h经侧脑室按 1 mg/kg注入秋水仙素,用于观察 PVN内的 VP阳性细胞; 第 3组用于观察 ME的 VP阳性纤维。第 2、4组分别为第 1、3组的对照组。动物模型制备按我校烧伤研究所提供的方法进行,即将实验组动物于清醒状态下捆绑固定背部剃毛后浸入 95℃恒温水浴锅 15 s, 造成 25% Ⅲ度皮肤烫伤,致伤时间均在上午 10~12 h进行,对照组动物捆绑固定剃毛后用温水浸泡背部。伤后 24 h取材 (秋水仙素处理组于注射后 12 h取材)。

1.2 试剂

兔抗 VP血清购自美国 ImmuneNuclear公司,工作浓度 1∶4 500,生物素化的羊抗兔 IgG购自美国 Vector公司,工作浓度 1∶200, ABC复合物购自美国 Vector公司,工作浓度 1∶10。

1.3 免疫组化程序

动物经戊巴比妥钠腹腔麻醉,经左心室插管至升主动脉,生理盐水冲洗血管, Zambonis液灌注固定。6 h后剥脑修块,入相同固定液于 4℃后固定 6~8 h, AO恒冷箱切片机切片,厚 30μm。经 PBS洗涤后入兔抗 VP血清于 37℃孵育 2.5 h,转 4℃ 33 h,然后进二抗 37℃孵育 2 h,入 ABC复合物 37℃孵育 1 h,最后于新鲜配制的 DAB-H_2O_2内显色。以上各步骤间均以

* 李泽桂,女, 46岁,副教授,博士研究生
** 华西医科大学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

PBS充分漂洗。

1.4 免疫组化对照实验

1.4.1 吸收实验 按 100μg/ml将 VP抗原加入 VP抗血清,混匀,室温静置 12 h,取上清液代替一抗孵育切片。

1.4.2 替代实验 用正常兔血清代替一抗孵育切片。

1.4.3 空白对照 用 PBS代替一抗孵育切片。

1.5 显微图象分析和统计学处理

用显微图象分析仪 (MIAS-200) 检测,每只动物每一部位从前往后测 5张切片,面积用象点数表示,免疫反应强度用灰度值表示。检测指标为:① PVN内 VP阳性细胞的平均总面积 (PVN内阳性细胞面积之和) 和平均灰度;② ME内 VP阳性纤维的平均密度 (VP纤维面积 /ME总面积)和平均灰度。PVN面积和灰度、ME面积密度和灰度用配对计量资料比较的 t检验分析。

2 结果

2.1 VP免疫反应阳性神经元在 PVN的分布及在烫伤应激中的变化

PVN各亚区的划分参照 Swanson[7]和 Armstrong[8]报道的方法。观察到 VP免疫反应阳性的神经元在 PVN的外侧亚核分布密集,见图 1,在内侧亚核分布散在,以大细胞分泌神经元为主,其间也夹有少量 VP阳性的小细胞。烫伤后 VP神经元增多,以内侧亚核增多较为明显,见图 2。可见 VP神经元发出突起向 ME方向投射。显微图像分析结果见表 1,烫伤大鼠 PVN内 VP免疫反应阳性细胞的平均总面积大于对照组,有非常显著的差异 ($P < 0.01$)。同时实验组的灰度值低于对照组 ($P < 0.05$),提示烫伤应激使 PVN合成 VP增多。

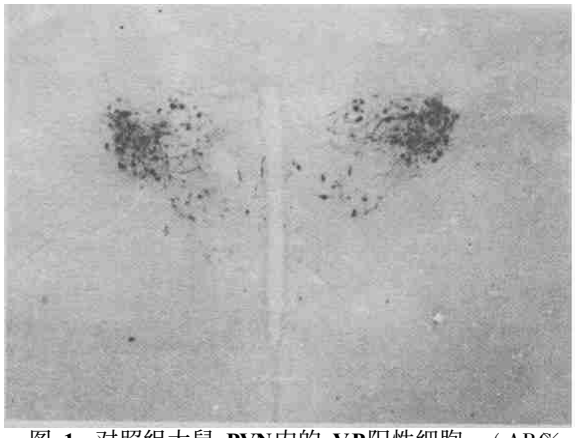


图 1 对照组大鼠 PVN内的 VP阳性细胞 (ABC× 40)

Fig 1 VP-positive cells in the PVN of the control rat (ABC× 40)

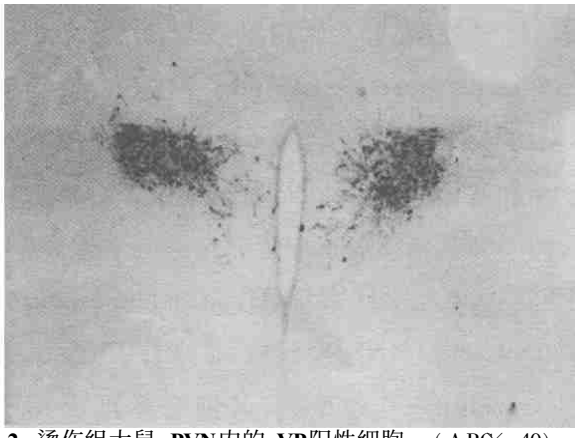


图 2 烫伤组大鼠 PVN内的 VP阳性细胞 (ABC× 40)

Fig 2 VP-positive cells in the PVN of the burnt rat (ABC× 40)

表 1 PVN内 VP阳性神经元的面积和灰度比较

Tab 1 Comparison of area and grey degree of VP-positive neurons in PVN

Animal number	Area		Grey degree	
	Burned	Control	Burned	Control
1	3470.8	2943	86.2	107.4
2	3704.6	2484	94.4	107.0
3	3057.2	2495	99.2	106.0
4	3466.2	2879	97.6	109.6
5	4068.8	2879	104.2	105.6
$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	3554± 164.5	2737± 101	96.32± 6.67	107.1± 0.7
	t= 5.144	P < 0.01	t= 3.283	P < 0.05

2.2 ME内 VP免疫反应阳性纤维的变化

观察到 VP免疫反应阳性纤维主要分布于 ME内带,在 ME外带也可观察到 VP免疫反应阳性的轴突终末。显微图象分析结果见表 2,3,实验组 ME内带和外带 VP阳性纤维的面积密度均大于对照组 ($P < 0.001$; $P < 0.005$),有非常显著的差异,见图 3,4。在 ME内带实验组的 VP免疫染色强度高于对照组 ($P < 0.01$),但在 ME外带实验组与对照组的 VP免疫染色强度无显著性差异 ($P > 0.05$),提示 VP在 ME外带的释放增多。

2.3 第三脑室室管内的 VP阳性触液神经元

观察到烫伤大鼠第三脑室室管膜内有含 VP的触液神经元,见图 5,但不如含 CCK的触液神经元多[9]。在对照组未观察到含 VP的触液神经元。

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

表 2　ME内带 VP阳性纤维的面积密度和灰度比较

Tab 2　Comparison of area density and grey degree of VP-positive neurites in ME internal zone

Animal number	Area density		Grey degree	
	Burned	Control	Burned	Control
1	0.6761	0.4544	32.3	52.0
2	0.6200	0.4680	31.7	48.8
3	0.6437	0.4552	46.5	49.8
4	0.6223	0.4505	46.0	55.2
5	0.5896	0.4136	39.0	53.2
$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	0.6303± 0.014	0.4483± 0.02	39.±3.2	51.8± 1.2
	t= 15.71	P <0.001	t= 4.32	P <0.02

表 3　ME外带 VP阳性纤维的面积密度和灰度比较

Tab 3　Comparison of area density and grey degree of VP-positive neurites in ME external zone

Animal number	Area density		Grey degree	
	Burned	Control	Burned	Control
1	0.2669	0.1670	79.0	107.3
2	0.3740	0.1629	95.0	87.8
3	0.3135	0.2321	96.8	81.3
4	0.3596	0.1699	87.4	84.2
5	0.2788	0.1972	89.0	84.4
$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	0.3192± 0.02	0.1858± 0.01	89.4± 3.1	88.99± 4.7
	t= 5.698	P <0.005	t= 0.059	P > 0.05

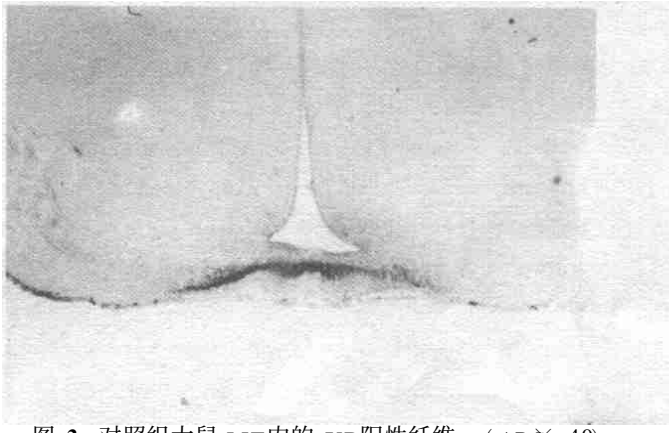


图 3　对照组大鼠 ME内的 VP阳性纤维　(ABC× 40)

Fig 3　VP-positive neurites in median eminence of the control　(ABC× 40)

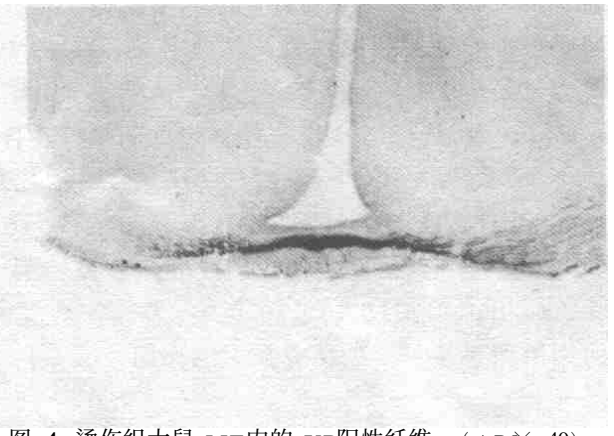


图 4　烫伤组大鼠 ME内的 VP阳性纤维　(ABC× 40)

Fig 4　VP-positive neurites in median eminence of the burnt rat　(ABC× 40)



图 5　烫伤大鼠第三脑室室管膜内 VP阳性的触液神经元　(ABC× 400)

3V: 第三脑室

Fig 5　VP-positive CSF-CNs in the ependyma of third ventricle in the burnt rat　(ABC× 400)

3V: third ventricule

3　讨论

急性烫伤应激使丘脑下部分泌的激素发生变化[9]。文献报道,大鼠烫伤后 0~4 h PVN的 VP阳性反应物减少[6],提示烫伤使大量 VP释放入血,以至 PVN来不及合成 VP以补充释放的 VP量,故 PVN内 VP的阳性反应产物减少。本实验观察到烫伤后 24 h,大鼠 PVN内 VP神经元的总面积增加,免疫反应染色增强,而且主要是位于外侧亚核的大细胞 VP神经元增多,提示伤后 24 h PVN已合成大量 VP以供给机体在应激状态下的需要。

传统的神经解剖学认为 PVN的大细胞 VP神经元是经室旁垂体束投射到垂体后叶的,文献亦报道烫伤后 VP主要在垂体后叶释放入血[6],参与烫伤后渗透压的调节和维持机体的水代谢平衡。但烫伤不仅使机体处于失水状态,同时也导致急性损伤性应激的发生。在此过程中,我们已发现除 VP外,CCK[9]和 CRF也是增加的。已知 VP有协同 CRF促进 ACTH分泌的作用[10]。随着应激时间的增长,VP促进 ACTH分泌的作用甚至大于 CRF[11,12],这是由于血中持续升高的皮质酮使 ACTH对 CRF的反应减弱,从而导致 VP

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

升高以补偿 CRF的作用[5]。本实验已给烫伤大鼠补充了适量的生理盐水,目的是尽可能减轻失水对 VP的影响。但我们观察到 PVN和 ME的 VP量仍然很高,提示烫伤后 PVN合成的 VP除输送到垂体后叶外,也可能到达垂体前叶参与 HPA轴的调节。本实验观察到 ME外带 VP纤维免疫反应强度在实验组没有相应的增强,也支持 VP在此部位释放入垂体门脉系统。

综合本实验结果和文献报道[5],我们认为参与 HPA轴调节的不仅有 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[13],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,烫伤应激是一种高强度的损伤应激,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。本实验结果再次提示 VP在应激中可能起了很重要的作用。而在过去的 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。

参考文献

1 Sofroniew M V. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brian and spinal cord. Trends Neurosci, 1983, 6(5): 467

2 Hatton G I. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brian: The hypothalamo-neurohypophysial system. Prog Neurobiol, 1990, 34(6): 437

3 Alonso G, Assenmacher I. Radioautogyaphic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. Cell Tissue Res, 1981, 219(3): 525

4 Antoni F A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. Front Neuroendocrinol, 1993, 14(2): 76

5 Nakase S, Kitayama I, Soya H, *et al*. Increased expression of magnocellular argine vasopressin mRNA in paraventricular nucleus of stress-induced depression-model rats. Life Sci, 1998, 63(1): 23

6 范溥生,何润昌.烫伤对大鼠下丘脑 AVP阳性细胞的影响.解剖学杂志, 1990, 13(2): 106

7 Swanson L W, Kuypers H G J M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitecture subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling method. J Comp Neurol, 1980, 194(3): 555

8 Armstrong W E, Warach S, Hatton G I, *et al*. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: A cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. Neuroscience, 1980, 5(11): 1931

9 李泽桂,陆振山,方一心,等.烫伤大鼠室旁核和触液神经元中胆囊收缩素的变化.解剖学报, 1999, 30(1): 15

10 Suda T, Tozawa F, Ushiyama T, *et al*. Effects of protein kinase-C-related adrenocortictropin secretagogues and interleukin-1 on proopiomelanocortin gene expression in rat anterior pituitary cells. Endocrinology, 1989, 124(3): 1444

11 Makino S, Smith M A, Gold P W, *et al*. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: Association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. Endocrinology, 1995, 136(8): 3299

12 Herman J P, Adams D, Prewitt C, *et al*. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced a variable stress paradigm. Neuroendocrinology, 1995, 61(2): 180

13 Holmes M C, Antoni F A, Aguilera G, *et al*. Magnocellular axon in passage though the median eminence release vasopressin. Nature, 1986, 319(6051): 326

(收稿: 1999-01-15;修回: 1999-07-20)

(编辑 汪勤俭)

Changes of magnocellular vasopressin neurons in paraventricular nucleus after scalding in rats

Li Zegui, Lu Zhenshan, Cai Wenqin, Fang Yixin (Department of Histology and Embryology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the role of magnocellular vasopressin (VP) neurons in paraventricular nucleus (PVN) during scalding stress. **Methods**: Adult male Wistar rats were inflicted with 25% TBSA full-thickness scalding. They were sacrificed at the 24th h after scalding. Then the ABC immunohistochemistry and optical microscopy were used to observe the VP-positive neurons in PVN and median eminence (ME). **Results**: The area and immunostaining intensity of VP-positive neurons in PVN were larger and heavier, and

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