DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.004

大鼠室旁核 CRF神经元在烫伤应激中的变化

李泽桂* 陆振山** 蔡文琴 方 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: 探讨丘脑下部室旁核(PVN)促肾上腺皮质释放因子(CRF)在烫伤应激中的作用。方法: 在大鼠清醒状态下给予标准的 25% Ⅲ度皮肤烫伤,伤后 24 h杀动物,用免疫细胞化学 ABC法显示 PVN的 CRF阳性神经元和正中隆起内的 CRF阳性纤维,结果用显微图像分析技术处理。结果:① 烫伤大鼠 PVN代表平面 CRF神经元的总面积增大,免疫染色增强。② 正中隆起的 CRF免疫染色阳性纤维的面积密度和免疫染色强度差异无显著性。③ 烫伤大鼠第三脑室室管膜内出现少量含 CRF的触液神经元。结论: 烫伤应激使 CRF在胞体的合成和末梢的释放均增加,这些增加的 CRF可在正中隆起释放入血或可能通过触液神经元释放入脑脊液,参与丘脑下部-垂体-肾上腺轴的调节。

关键词 大鼠;下丘脑室旁核;促肾上腺皮质素释放激素;烧伤;应激
中图法分类号 R363

促肾上腺皮质释放因子(Corticotropin-releasing factor, CRF)是含 41个氨基酸残基的多肽,与内分泌、神经化学、行为等多种生理反应有关,因而不难解释分布于中枢神经系统的 CRF神经元是异质性的。但在遍布中枢的 CRF神经元群体中,仅有少数与应激(Stress)有关,其中丘脑下部室旁核(Paraventricular nucleus, PVN)的 CRF神经元就是各种应激反应的主要调节者[1]。PVN内 CRF的增高或降低,取决于应激反应的类型。Rivest等[2]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。PVN的 CRF胞体发出突起投射到正中隆起,将激素释放入垂体门脉系统,调节前叶腺细胞合成和分泌促肾上腺皮质激素(ACTH)。

烫伤对机体是一种急性的损伤性应激反应,作为神经内分泌中枢的丘脑下部必定受到刺激而产生形态结构的可塑性变化,其中室旁核的 CRF神经元在烫伤应激中的变化鲜见文献报道。我们先前的工作也证实了烫伤应激使大鼠室旁核合成加压素(Vasopressin, VP)和胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)增多[3]。在此基础上本实验用免疫组化和图像分析技术检测 PVN的 CRF神经元和正中隆起的 CRF纤维在烫伤应激中的变化,旨在为 CRF参与神经内分泌调节提供形态学依据。

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和第三脑室室管膜内的 CRF阳性细胞;第 3组不经秋水仙素处理,用于观察 ME的 CRF阳性纤维。第 2、4组分别为第 1、3组的对照组。动物模型制备按第三军医大学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 10:00~12:00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 CRF血清购自美国 Immune Nuclear公司,工作浓度 1:2 500,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 1:100。

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 30 μm。经 PBS洗涤后入兔抗 CRF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显色。以上各步骤间均以 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 CRF抗原加入 CRF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 显微图像分析和统计学处理

用显微图像分析仪(MIAS-200)检测,每只动物每一部位

* 李泽桂,女,46岁,副教授,硕士
** 华西医科大学组织学与胚胎学教研室 成都, 610000

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

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 CRF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 CRF阳性纤维的平均密度(CRF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 CRF免疫反应阳性神经元在 PVN的分布及在烫伤应激中的变化

CRF只存在于 PVN小细胞部,主要分布于内侧亚核和后部亚核。以双极或梭形细胞为主,亦可见多极细胞,胞浆内免疫反应产物较淡,分布均匀。显微图像分析结果显示,见表 1,烫伤大鼠 PVN内 CRF免疫反应阳性细胞的平均总面积大于对照组,见图 1、2,有高度差异显著($P < 0.002$)。同时实验组的灰度值低于对照组($P < 0.005$),提示烫伤应激使 PVN合成 CRF增多。另外在第三脑室室管膜内还观察到少量含 CRF的触液神经元,见图 3

2.2 ME内 CRF免疫反应阳性纤维的变化

观察到 CRF免疫反应阳性纤维主要分布于 ME外带,见图 4 显微图像分析结果显示,见表 2,实验组 ME内 CRF阳性纤维的面积密度和免疫反应强度均与对照组差异无显著性($P > 0.05$),提示烫伤后 PVN合成的 CRF又在 ME外带被迅速释放。



图 1 对照大鼠 PVN内的 CRF阳性细胞 (ABC× 100)

Fig 1 The CRF-positive cells in the PVN of the control rat (ABC× 100)

图 2 烫伤大鼠 PVN内的 CRF阳性细胞 (ABC× 100)

Fig 2 The CRF-positive cells in the PVN of the burnt rat (ABC× 100)

图 3 烫伤大鼠第三脑室室管膜内 CRF阳性的 CSF-CNs (ABC× 400)

Fig 3 The CRF-positive CSF-CNs in the ependyma of the rat third ventricle (ABC× 400)

图 4 大鼠正中隆起内 CRF阳性神经纤维 (ABC× 100)

3v: 第三脑室

Fig 4 The CRF-positive neurites in median eminence (ABC× 100)

3v: third ventricle

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

表 1 PVN内 CRF阳性神经元的面积和灰度比较

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

Animal number	Area		Grey degree	
	Burned	Control	Burned	Control
1	4783	2942	103.0	111.4
2	4459	2696	97.8	105.0
3	5039	2443	99.8	103.4
4	3969	2656	103.8	113.2
5	4796	3392	87.0	98.8
$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	4609± 184.6	2826± 161.8	98.3± 3.0	106.4± 2.7
	t= 7.849	P <0.002	t= 5.979	P <0.005

表 2 ME内 CRF阳性纤维的面积密度和灰度比较

Tab 2 Comparison of area density and grey degree of CRF-positive reurites in ME

Animal number	Area density		Grey degree	
	Burned	Control	Burned	Control
1	0.7007	0.7201	64	62
2	0.7470	0.6598	56	55
3	0.7203	0.6960	50	44
4	0.6580	0.7567	70	55
5	0.6672	0.6269	73	51
$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	0.6986± 0.017	0.6919± 0.023	62.7± 4.31	53.2± 2.92
	t= 0.213	P> 0.05	t= 2.324	P> 0.05

3 讨论

本观察到烫伤应激大鼠 PVN内 CRF的总面积增大,免疫反应染色增强。提示应激中 PVN内合成大量的 CRF以适应机体调节的需要。在正中隆起,烫伤大鼠与对照大鼠的 CRF阳性纤维的面积密度与染色强度差异无显著性,提示在 PVN合成的 CRF在正中隆起又被迅速释放,参与丘脑下部-垂体-肾上腺轴的调节。

综合本实验结果和其它文献报道,我们认为烫伤应激情况下 CRF参与了垂体 ACTH的调节。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[4]。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[5]。

研究发现,CRF受体有两型,CRF-1型受体[6]和 CRF-2型受体[7]。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[8]。一个有趣的现象是,正常情况下 CRF含量较高的 PVN,CRF-1受体 mRNA却很低甚至检测不到,但在应激条件下,PVN的 CRF-1受体 mRNA才明显升高[9]。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)[10]。形态学研究也显示 PVN内 CRF胞体与 CRF终末形成突触连系。本实验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。

参考文献

1 Hwang B H, Guntz J M. Downregulation of corticotropin-releasing factor mRNA, but not Vasopressin mRNA, in the paraventricular hypothalamic mucleus of rats following nutritional stress. Brain Res Bull, 1997, 43(5): 509

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

3 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, 1993, 30(1): 15

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

5 De Souza E B. C R F receptors: physiology, phamacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. Psychoneuroendocrinology, 1995, 20(6): 789

6 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

7 Liaw C W, Lovenberg T W, Barry G, *et al*. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. Endocrinology, 1996, 137(1): 72

8 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,

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

1996, 50(5): 1103
9 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
10 Mansi J A, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1(CRF1) receptor mRNA in the paravetricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. Endocrino, 1996, 37(11): 4619

(收稿: 1998-09-15;修回: 1999-02-05)
(编辑　汪勤俭)

Changes of corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus after scalding in rats

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

Abstract Objective: To study the effects of corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in the paraventricular nucleus(PVN) on the stress after scalding in rats. Methods: Adult male wistar rats were inflicted with 25% TBSA full thickness scalding. They were killed 24 h after injury. The CRF positive neurons in the PVN and the CRF-positive fibers in the median eminence were displayed with ABC immunocytochemical technique and analyzed with the microscopic image analyser system. Results: The areas and immunostaining intensity of the CRF-positive neurons in the PVN were larger and heavier in the scalded rats than in the control but no such difference was found in the CRF-positive fibers in the median eminence. A small amount of cerebrospinal fluid-contacting neurons were found in the ependyma. Conclusion: Our findings suggest that there was an increase of CRF synthesis in the neurons of the PVN and CRF releasing in the terminals of the median eminence after scalding. The increased amount of CRF may enter the capillaries in the median eminence or release into cerebrospinal fluid through the contacting neurons. Consequently, CRF participates in the modulation of the hypothalamus-pituitar-adrenal axis during scalding stress.

Key words paraventricular hypothalamic nucleus; corticotropin-releasing hormone; burns; stress; rats

(上接 159页)

动,1例经纤支镜间断吸引后坏死物消失,另 1例不能将此坏死物吸出,将活检钳伸入病灶处,张开对准坏死物,钳住后随纤支镜一起退出,钳出纤维蛋白条一条,再插入纤支镜,镜下见白色坏死物已消失,开口暴露,并能窥见下一级支气管,(此两例经送病理检查均为毛霉菌病);3例有少许血凝块;2例有新鲜血性分泌物。

病理检查: 8例经病理诊断曲霉菌菌丝 6例,毛霉菌菌团 2例。

2 治疗

住院病人中,1例行手术切除,余 3例除对症治疗外,主要应用 0.2%大扶康 100 ml 1/d ivd 在治疗后期口服斯匹仁诺 100 mg/d 其中 2例在静脉给药的同时,辅以经纤支镜病变区域支气管注 0.2%大扶康,每周 1次,每次 20 ml,共 5次。经 55~ 86 d上述治疗后,患者症状、体征消失;复查胸片病灶明显吸收;多次痰霉菌培养阴性;纤支镜下观察病变粘膜恢复正常,阻塞之气管重又通畅,纤支镜刷检霉菌培养为阴性,治愈出院。

3 讨论

肺部霉菌感染并不常见,除原发外,常继发于应用大剂量广谱抗生素和(或)免疫抑制剂(如激素)治疗后。本组 8例中有 2例抗痨或抗生素用药达 2年,其余 6例用药也在 2月至 1年以上。因患者原有基础疾病,从而掩盖了本病,造成了误诊,延误了疾病的治疗,给患者带来了严重的精神及经济负担。因此,对患有慢性呼吸系疾病,长期应用广谱抗生素或皮质激素者,应引起高度警惕,提示有肺霉菌病的存在。我们认为,有下列情况之一者,均应即时行纤支镜检查并行活检。

1)临床表现为咯血、咳嗽、咳痰的病例,X线无典型特征者。

2)虽有 X线或 CT诊断,但在较长时间应用抗生素、抗痨或激素治疗后效果不理想者。纤支镜检查取活检进行病理学检查对肺霉菌病的诊断具有决定性作用[1]。

肺霉菌病治疗以往多采用手术疗法,但随着抗霉菌药的研究和开发,亦可内科治疗。本组住院 4例病人,除 1例手术外,余 3例经 55~ 86 d内科治疗,痊愈出院。其中 2例应用 0.2%大扶康静滴,并辅于病变区域镜下直接给药,取得了良好的疗效。而且与未用此法 1例比较,明显提高了治疗效果,缩短了住院时间,减轻了病人的精神及经济负担。说明在静脉和或口服给药的同时,联合纤支镜下局部给药是治疗肺霉菌病的一个较好的方法值得临床进一步观察总结。

关键词　纤维支气管镜;霉菌
中图法分类号　R563

参考文献

1 程德云,陈文彬,戟朝明.经纤维支气管镜诊断并治疗肺曲菌病十例.中华结核与呼吸杂志, 1997, 20(5): 316

(收稿: 1998-04-21;修回: 1998-10-16)
(编辑　冷怀明)

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