

## 失血性休克后下丘脑室旁核内 CRH 和 AVP 基因转录的动态变化

姜雅秋<sup>1</sup>, 姜蕾<sup>2</sup>, 孙茵<sup>1</sup>, 单忠艳<sup>1</sup>, 滕卫平<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学保健科)

**[摘要]** 目的:探讨失血性休克对下丘脑室旁核(PVN)促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)和血管加压素(AVP)基因转录的影响。方法:大鼠分别于失血后0、15、30、60、120 min 断头;RIA 法测血中激素水平;应用<sup>[35S]</sup>标识的 RNA 探针进行原位杂交实验,分析失血后 PVN 内 CRH 和 AVP 基因转录的动力学变化。结果:血中促肾上腺皮质激素(ACTH)及 AVP 于失血后 15 min 达高峰( $P < 0.01$ ),失血后 60 min 时基本恢复到基础水平;PVN 内 CRH hnRNA 在失血前几乎无表达,于失血后 15 min 表达量已显著升高( $P < 0.01$ ),30 min 达峰值( $P < 0.01$ ),120 min 内基本恢复,失血前 CRH mRNA 在 PVN 就有大量表达,于失血后 15 min 及 120 min 两次有意义升高( $P < 0.01$ );失血前 AVP hnRNA 在 PVN 的小细胞领域基本没有表达,于失血后 15 min 开始有意义增加( $P < 0.01$ ),30 min 达峰值( $P < 0.01$ )后一直持续,失血前 AVP mRNA 在该领域的表达量很少,失血后 60 min 时其表达量有意义增加( $P < 0.01$ ),并持续到失血后 120 min;失血前 AVP hnRNA 在 PVN 的大细胞领域就有大量表达,于失血后 15 min 开始显著升高( $P < 0.01$ ),并一直持续,失血前 AVP mRNA 在该领域的表达量很多,失血后其表达量没有明显变化。结论:在失血性休克时共存于小细胞领域的 CRH 和 AVP 的基因转录的动态变化不同,分别存在于大小细胞两领域的 AVP 的基因转录的动态变化不同。

**[关键词]** 失血性休克;促肾上腺皮质激素释放激素;血管加压素;基因转录

**[中图分类号]** R714.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)02-0191-03

### Variety of CRH and AVP gene transcription in paraventricular nucleus of hypothalamus after hemorrhagic shock

JIANG Ya-qiu<sup>1</sup>, JIANG Lei<sup>2</sup>, SUN Yin<sup>1</sup>, SHAN Zhong-yan<sup>1</sup>, TENG Wei-ping<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Out-patient Department)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of hemorrhagic shock on corticotropin releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) gene transcription in paraventricular nucleus (PAN) of hypothalamus. **Methods:** Rat model of hemorrhagic shock was established by drawing blood from the right atrium, and the rats were decapitated 15, 30, 60, and 120 minutes after hemorrhagic shock. In situ hybridization was performed by using <sup>[35S]</sup>-labeled riboprobes. **Results:** The plasma levels of ACTH and AVP increased rapidly, reached the peak at 15 minutes, and then gradually returned to baseline. CRH and AVP heteronuclear RNA (hnRNA) significantly increased at 15 minutes. AVP hnRNA further increased at 30 minutes and maintained relatively stable until 120 minutes. The expression of AVP hnRNA in the magnocellular division increased at 15 minutes and maintained high, but in the same division it was not different from that at baseline at any time. **Conclusion:** The dynamic changes of CRH and AVP gene transcription in the parvocellular division are different, and the dynamic changes of AVP gene transcription in the magnocellular division also differs from those in the parvocellular division.

**[Key words]** hemorrhagic shock; corticotropin releasing hormone; AVP; gene transcription

综合处理应激信息的中枢在下丘脑室旁核(para ventricular nucleus, PVN), PVN 由大细胞和小细胞两种神经细胞组成,大细胞分泌血管加压素(arginine vasopressin, AVP),小细胞主要分泌促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)。近年的研究表明人类和大鼠的 PVN 的部分小细胞也同时分泌 AVP<sup>[1]</sup>。由失血引起的循环血容量的减少和血压的降低可兴奋下丘脑-垂体-肾上腺轴,且可使 CRH mRNA 的表达增加而对 AVP mRNA 的表达没有影响<sup>[2]</sup>。hnRNA 是基因转录

的中间产物,只有在基因转录进行时才能被检出,而且半衰期短,能精确地反映基因转录的变动。由于一直未能确立正确评价各领域内 AVP 含量及其基因表达量的方法,所以迄今人们无法详细探讨小细胞领域的 AVP 的变动。本研究应用分别与内含子序列和外显子序列互补的 RNA 探针来进行原位杂交实验,通过检测 CRH 和 AVP 的 mRNA 和 hnRNA 的表达量,并把相邻切片的 CRH mRNA 表达区域的轮廓与 AVP hnRNA / AVP mRNA 的数字图像相重叠,从而定量小细胞区的 AVP hnRNA 和 AVP mRNA 的表达量<sup>[4]</sup>,阐明失血性休克对 CRH 和 AVP 两基因转录的影响及失血后小细胞领域 AVP 基因转录的变化。

**[基金项目]** 辽宁省博士启动基金资助项目(20051039)

**[作者简介]** 姜雅秋(1968-),女,副教授,博士。

E-mail: jiang\_aoba@126.com

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验动物

Wister 雄性大鼠 35 只,体质量 270 ~ 320 g,饲养于 12 h/12 h 明暗循环环境中。实验前 1 周每天抚摩 5 min,以使其习惯实验者。实验前 2 日行右心房内留置导管和腹主动脉内留置导管手术。

应用清醒大鼠,实验在 8:00-12:00 内进行。5 min 内从右心房内留置的导管匀速抽出相当于循环血容量 18% 的血液(16.7 ml/kg)。并利用腹主动脉的留置导管测定清醒大鼠失血前后动脉区,实验动物分为 5 组,1 组为无失血对照组,2,3,4,5 组分别于失血后 15, 30,60,120 min 后断头,迅速取出脑组织,于 -40℃ 异戊烷中快速冷冻,保存于 -70℃ 备用。

#### 1.2 方法

1.2.1 血中激素的测定:血中促肾上腺皮质激素(adreno cortico tropic hormone,ACTH)及 AVP 应用放射免疫分析法(RIA)测定(试剂盒均购自日本三菱化学公司),具体步骤按操作说明进行。

1.2.2 原位杂交组织化学方法检测 CRH hn RNA、CRH mRNA、AVP hn RNA、AVP mRNA 的含量:从 -80℃ 取出脑组织,切 10 μ m 厚的连续组织切片,平铺于涂有多聚赖氨酸(1 mg/ml)的玻片上,保存 -70℃ 备用。冰冻切片在室温于 4% 的多聚甲醛-PBS (pH 7.4)液中固定 60 min,SSC 清洗 2 次,每次 5 min,经 0.1M (三乙醇胺)作用 5 min 后,在新配制的乙酸酐/三乙醇胺(pH 8.0)中乙酰化 10 min,乙醇脱水后室温干燥。

将质粒 DNA(CRH 外显子 2、CRH 内含子、AVP 外显子 A、AVP 内含子 1),用相应的限制性内切酶线性化,纯化线性化后的 DNA,做为 cRNA 探针标记的模板,分别用 T7 或 SP6RNA 聚合酶合成[35S]标记的 RNA 探针,标记时用[35S]UTP 和[35S]CTP (Amersham 公司)双标记。将 40 μ l 溶解了上述探针的杂交缓冲液滴加到脱水后的每个组织切片上,覆盖盖玻片,放于湿盒中(湿盒液 50% 甲酰胺 v/v; 0.3 mol/L NaCl; 1mmol/L EDTA; 10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0),在 55℃ 下杂交 12 ~ 18 h。2 × SSC 洗 3 次每次 5 min。在无 DNA 的 RNA 酶 A(20 μ g/ml)溶液中 37℃ 下孵育 60 min。分别依次用 2 × SSC 洗 5 min、1 × SSC 洗 5 min、0.5 × SSC 洗 1 min 和 70℃ 预热的 0.1 × SSC 60 min。乙醇脱水后室温干燥。

将标本用 X 线胶片(Kodak XAR)曝光,CRH mRNA、CRH hnRNA、AVP mRNA 及 AVP hnRNA 的曝光时间分别是 24、72、1、6 h。

1.2.3 应用 NIH Image 软件系统进行图像解析:放射自显影图像用数码照相机(Sony-XC-77)摄入计算机,应用 NIH Image 软件系统解析。为了定量小细胞内的 AVP hnRNA 或 AVP mRNA,把相邻切片的 CRH mRNA 表达区域的轮廓与 AVP hnRNA 或 AVP mRNA 的数字图像相重叠,此区域内的 CD 的总和为小细胞领域的信号。重叠以视交叉、视神经轮廓、脑室轮廓为指标进行,以达准确重叠(图 1)。

#### 1.3 统计学方法

所有数据以 statview 软件进行统计分析。血中激素水平及基因表达的动态变化过程用单因素方差分析检验组间总差异,组间两两比较应用 post-hoc 中的 Sheffe F 检验。

### 2 结果

#### 2.1 血中 ACTH 及 AVP 的变化

血浆 ACTH 的基础值是 89.5 pg/ml,失血后 15 min 显著增加与基础值比较(P < 0.01),60 min 后基本恢复。血浆 AVP 的基础值是 0.423 pg/ml,失血后 15 min 显著增加达高峰与基础值比较(P < 0.01),与 ACTH 的动态变化过程基本一致。

#### 2.2 PVN 内 CRH hnRNA、CRH mRNA、AVP hnRNA、AVP mRNA 的变化

失血前 CRH hnRNA 在 PVN 内仅有微量表达,失血后 15 min 较基础值明显增加(P < 0.01),30 min 达最高值(P < 0.01)后表达量减少,2 h 内恢复到基础状态;失血前 CRH mRNA 在 PVN 内就有大量表达,失血后 15 min 增加显著(P < 0.01)后表达量下降,于 120 min 表达量再次增加(P < 0.01);失血前 AVP hnRNA 在 PVN 的小细胞区内表达量很少,失血后 15 min 增加显著(P < 0.01),30 min 时是基础值的

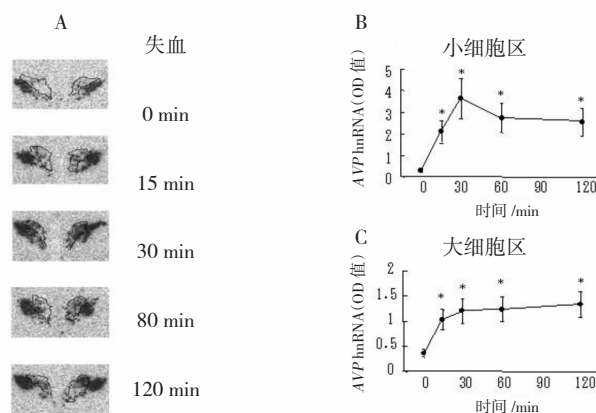


图 1 失血后 PVN 大细胞及小细胞内 AVP hnRNA 的动态变化  
Fig.1 Dynamic change of AVP hnRNA expression in parvocellular and magnocellular of PVN after hemorrhagic shock

7.5 倍达高峰,此增加一直持续到失血后 120 min(图 1A,B)。大细胞区的 AVPhnRNA 在失血前就有强烈表达(图 1A),失血后其表达量急速(15 min)增加( $P < 0.01$ ),30 min 达最大值( $P < 0.01$ ),并持续到失血后 120 min( $P < 0.01$ )(图 1A,C);失血前 AVP mR-N A 在 PVN 内小细胞区的表达量也很少(图 2A),失血后 60 min 增加( $P < 0.01$ )并持续到失血后 120 min(图 2A,B)。大细胞区的 AVP mRNA 在失血前就有极强的表达(图 2A),其表达量在失血后没有明显变化(图 2A,C)。

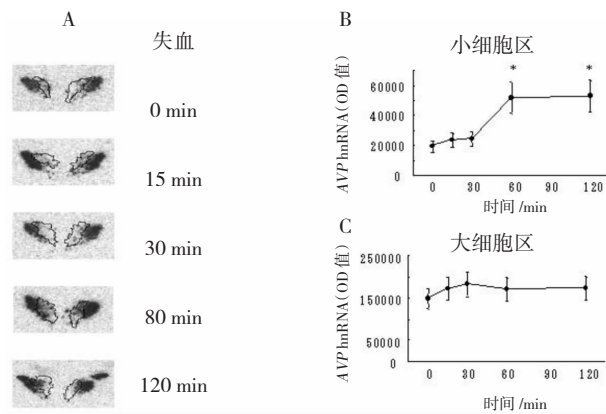


图2 失血后 PVN 大细胞及小细胞内 AVP mRNA 的动态变化  
Fig.2 Dynamic change of AVP mRNA expression in parvocellular and magnocellular of PVN after hemorrhagic shock

### 3 讨论

目前认为失血时主动脉弓和颈动脉窦内的压力感受器将接收到的信号经迷走神经和舌咽神经输送到延髓孤束核,再从孤束核上行至 PVN,从而兴奋 CRH 和 / 或 AVP 神经元<sup>[2]</sup>,从而影响肾上腺轴的功能。

本研究发现血中 ACTH 的浓度在失血后即刻增加后恢复。PVN 内 CRH hnRNA 的量也在失血后即刻明显增加,两者在失血后的动力学变化曲线大致相同,提示 CRH 的基因转录和 CRH 的分泌释放反应是大致平行进行的。而与 CRH 共存于小细胞区的 AVP hnRNA 的量在失血后 15 min 开始增加,30 min 达峰值后仍维持较高水平直至 120 min。实验结果说明失血后同是小细胞分泌的 CRH 和 AVP,其基因转录的动态变化是不同的。我们认为这种在失血后快速的 AVP 基因转录的活化是由已存在于细胞内的转录调节蛋白,如 cAMP 反应元件结合蛋白等的磷酸化引起<sup>[3]</sup>;转录因子 AP-1 是由 *c-jun* 和 *c-fos* 基因编码产物组成的同源或异源二聚体<sup>[6]</sup>。持续到失血后较晚期的 AVP 基因转录的活性化可能与新合成的 AP-1 有关。

存在于 PVN 的大细胞区域内的 AVPhnRNA 的量也是失血后 15 min 开始增加并持续到失血后 120 min,但是与小细胞区域内的 AVPhnRNA 不同的是大细胞区域内的 AVPhnRNA 在失血前既有强烈的表达,而且失血后其增加的比率明显小于小细胞区域内的 AVPhnRNA。可见分别由大细胞和小细胞合成分泌的 AVP 的基因转录的动力学变化在失血性休克的应激状态下是不同的,提示在处理应激信息的过程中不同细胞分泌的 AVP 可能发挥不同的作用。

PVN 的小细胞区域内的 AVP mRNA 的量在失血后 60 min 开始增加,我们认为这正是转录反应中新合成的 hnRNA 去除内含子后而成为成熟的 mR-N A 所需的时间,大细胞区域内 AVP mRNA 失血后没有明显的变动,我们考虑这可能是由于大细胞的细胞质内存在着极大量的 AVP mRNA,失血后新合成的量相对于这个量来说却很小的原因。

本研究失血性休克时与 CRH 共存于小细胞领域的 AVP 基因转录的动态过程和 CRH 不同,提示同由小细胞分泌的 CRH 和 AVP 基因转录的细胞内调节机制不同。而且分别存在于大细胞和小细胞两种神经元内的 AVP 基因转录的动力学变化并不一致,提示分别由具有不同生理作用的 PVN 大细胞和小细胞产生的 AVP 的基因转录的调节机制不同。

### 参考文献:

- [1] MOURI T, ITOI K, TAKAHASHI K, et al. Colocalization of corticotrophin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus [J]. *Neuroendocrinology*, 1993, 57(1): 34-39.
- [2] BULLER KM, SMITH DW, DAY TA. Differential recruitment of hypothalamic neuroendocrine and ventrolateral medulla catecholamine cells by non-hypotensive and hypotensive hemorrhages [J]. *Brain Res*, 1999, 834: 42-54.
- [3] ITOI K, JIANG YQ, IWASAKI Y, et al. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus [J]. *J Neuroendocrinol*, 2004, 16(4): 348-355.
- [4] JIANG Y Q, KAWASHIMA H, UCHIDA K, et al. Differential effects of forced swim-stress on the corticotrophin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the parvocellular division of the paraventricular nucleus of rat hypothalamus [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 358: 201-204.
- [5] LI Y, HU J, VITA R, et al. SPAK kinase is a substrate and target of PKC $\theta$  in T2cell receptor-induced AP21 activation pathway [J]. *EMBO J*, 2004, 23 (5): 1112-1122.

[收稿日期] 2006-11-29