

CP-154,526 和 verapamil 对促肾上腺皮质激素释放因子分泌水平的影响

董 静 祝益民 周文武 袁 发 张 川 董春艳 肖政辉 桂永浩 陈 超

摘 要 **目的** 探讨促肾上腺皮质激素释放因子 I 型受体 (CRF-R1) 拮抗剂 CP-154,526 (CP) 和钙离子通道拮抗剂 verapamil (VP) 对幼年大鼠在缺氧缺血 (HI) 后并放置 1 天后血浆中促肾上腺皮质激素释放因子分泌水平的影响。**方法** 80 只幼年大鼠随机分成 8 组,即对照组、假手术组、CP 对照组、VP 对照组、模型组 (HI 组)、HI + CP 组、HI + VP 组和 HI + CP + VP 组。用放射免疫法测定各组幼年大鼠血浆中 CRF 水平。**结果** 与对照组比较,HI 组、HI + CP 组和 HI + CP + VP 组血浆 CRF 水平都显著降低 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$);与假手术组比较,HI 组、HI + CP 组和 HI + CP + VP 组血浆 CRF 水平都显著降低 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$);与 CP 对照组比较,HI 组、HI + CP 组和 HI + CP + VP 组血浆 CRF 水平都显著降低 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$);与 VP 对照组比较,HI 组、HI + CP 组和 HI + CP + VP 组血浆 CRF 水平都显著降低 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$);与 HI 组比较,HI + CP 组和 HI + VP 组血浆 CRF 水平显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.001$);与 HI + CP 比较,HI + VP 组血浆 CRF 水平显著增加 ($P < 0.001$);与 HI + VP 组比较,HI + CP + VP 组血浆 CRF 水平显著降低 ($P < 0.001$)。**结论** 幼年大鼠在 HI 后并放置 1 天后血浆 CRF 水平都显著减少;可是,当幼年大鼠用 CP 或者 VP 预处理后,血浆 CRF 分泌水平在缺氧缺血下的减少能被逆转;当用 CP 和 VP 同时预处理后,血浆 CRF 分泌水平在缺氧缺血下的减少没有被改变。

关键词 缺氧缺血脑损伤 促肾上腺皮质激素释放因子 CP-154,526 Verapamil 幼年 SD 大鼠

Effects of CP-154,526 and Verapamil on Corticotrophin Releasing Factor Secreting Levels. Dong Jing, Zhu Yimin, Zhou Wenwu, Yuan Fa, Zhang Chuan, Dong Chunyan, Xiao Zhenghui, Gui Yonghao, Chen Chao. Children's Hospital of Hunan Province, Hunan 410007, China

Abstract **Objective** To explore the effects of CRF acceptor 1 (CRF-R1) antagonist CP-154,526 (CP) and Ca^{2+} pathway antagonist verapamil (VP) on plasma CRF secreting levels in the young rats after hypoxic-ischemia (HI) and after the rats were placed for one day. **Methods** Eighty young rats were randomly divided into eight groups, which were the control groups, sham operated groups, CP control groups, VP control groups, model groups (HI groups), HI + CP groups, HI + VP groups and HI + CP + VP groups. Plasma CRF levels of the young rats in all groups were measured by radioimmunoassay. **Results** Compared with the control groups, plasma CRF levels in the HI groups, HI + CP groups and HI + CP + VP groups all significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). Compared with the sham operated groups, plasma CRF levels in the HI groups, HI + CP groups and HI + CP + VP groups all significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). Compared with the CP control groups, plasma CRF levels in the HI groups, HI + CP groups and HI + CP + VP groups all significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). Compared with the VP control groups, plasma CRF levels in the HI groups, HI + CP groups and HI + CP + VP groups all significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). Compared with the HI groups, plasma CRF levels in the HI + CP groups and HI + VP groups all significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Compared with the HI + CP groups, plasma CRF levels in the HI + VP groups significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the HI + VP groups, plasma CRF levels in the HI + CP + VP groups significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Plasma CRF levels in the young rats after HI and after the young rats were placed for one day significantly decreased. But, after the young rats were pretreated with CP or VP, the decrease of plasma CRF secreting levels under HI can be inversed. After the young rats were simultaneously pretreated with CP and VP, the decrease of plasma CRF secreting levels under HI was not changed.

Key words Hypoxic-ischemia brain injury; Corticotrophin releasing factor; CP-154,526; Verapamil; Young SD rat

基金项目:湖南省科技厅基金资助项目(2008RS4029)

作者单位:410007 长沙,湖南省儿童医院(董静、祝益民、周文武、袁发、张川、董春艳、肖政辉);21102 上海,复旦大学儿科医院(桂永浩、陈超)

通讯作者:祝益民,电子信箱:cszhuyimin@163.com

促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophic releasing factor, CRF)是由下丘脑室旁核的神经元合成和释放的,是一种与机体内、外应激密切相关的神经内分泌肽^[1]。我们前期研究发现低氧应激能显著增加大鼠下丘脑 CRF 神经元分泌 CRF^[2]。我们还发现缺

氧缺血影响幼年大鼠血浆中 CRF 水平,且 CRF 水平高低与缺氧缺血性脑损伤程度存在内在联系(数据待发表)。国外学者 Craighead 等^[3]发现 CRF 增加大鼠皮质神经元损伤。因此,在缺氧缺血应激下,进一步探索影响下丘脑 CRF 神经元分泌 CRF 水平的机制具有重要意义。本研究旨在探讨促肾上腺皮质激素释放因子 I 型受体(CRF - R1)拮抗剂 CP - 154,526 (CP)和钙离子通道阻断剂 verapamil (VP)对缺氧缺血性脑损伤幼年大鼠血浆中促肾上腺皮质激素释放因子分泌水平的影响。

材料与方法

1. 动物与分组:清洁级 24 日龄的 Sprague - dawley 雄性大鼠 80 只(从湖南省长沙市东创实验动物科技服务部购买),体重为 68.9 ± 8.1 g,随机分成 8 组(每组由 10 只幼年大鼠组成),人工控制光照(L:D = 12:12)和温度 20 ± 2℃,在动物实验室饲养 6 天后被用于实验。

我们设立幼年大鼠在 HI 后并放置 1 天后的对照组、假手术组、CP 对照组(以便消除 CRF - R1 拮抗剂本身的影响)、VP 对照组(以便消除钙离子通道拮抗剂本身的影响)、模型组(即 HI 组)、HI + CP 组、HI + VP 组和 HI + CP + VP 组作为我们实验观察组。

2. 幼年大鼠缺氧缺血性脑损伤模型的建立:参考已有的 HIBD 模型方法,建立本研究的幼年大鼠 HIBD 模型^[4-7]。

3. 假手术方法:首先用 75% 乙醇消毒幼年大鼠颈部,剪开颈正中皮肤 2 ~ 3cm,不结扎胸锁乳突肌内侧深部左颈总动脉血管,然后将切口全部消毒后,用 3-0 号丝线缝合切口,术中用医用棉止血,最后放回原笼中休息。

4. 幼年大鼠缺氧缺血处理与血浆制取:对模型组(即 HI 组)、HI + CP 组、HI + VP 组和 HI + CP + VP 组的幼年大鼠先进行左颈总动脉结扎,后放回原笼中休息 2 ~ 3h,待苏醒后置于通以混合气体(8% 氧气 + 92% 氮气)的缺氧密闭容器中,以 1.5 ~ 2L/min 的流量持续通气 2.5h 制成幼年大鼠 HIBD 模型。从低氧结束后开始算起,这 4 组幼年大鼠都放置 1 天后并在第 2 天上午 11:00 ~ 11:30 时间段将动物立即用断头牺牲方法取颈断面流出来的血和剥离脑组织(用于免疫组化检测)。对照组、假手术组、CP 对照组和 VP 对照组也都在每天上午同样时间段被立即用断头牺牲方法取颈断面流出来的血和剥离脑组织,都取 10 ml 血放在事先加了肝素钠 15 ml 离心管中,然后离心(4℃,3000g,20min),得到血浆,最后分装放在 - 80℃ 冰箱保存备用。

5. CP - 154,526 和 verapamil 处理幼年大鼠:根据连俊兰等^[4]在幼年大鼠缺氧缺血性脑病动物模型的研究时发现在缺氧缺血后并放置 24h 后脑损伤病变明显,我们将幼年大鼠缺氧缺血后放置 24h(即 1 天)后作为我们研究促肾上腺皮质激素释放因子 I 型受体拮抗剂和钙离子通道阻断剂调控的时间点。促肾上腺皮质激素释放因子 I 型受体拮抗剂(CP - 154,

526,从 Tocris cookson Inc,USA 购买)以 30mg/kg 体重计量在低氧前 12h 经皮下注射到幼年大鼠体内;钙离子通道阻断剂(verapamil,从 Tocris cookson Inc,USA 购买)以 2.0mg/kg 体重计量在低氧前 45min 皮下注射到幼年大鼠体内。

6. 幼年大鼠血浆中 CRF 水平检测:用放射免疫法试剂盒测定幼年大鼠血浆中 CRF 水平,该试剂盒由中国人民解放军第二军医大神经生物学教研室生产(批号:031020)并由教研室工作人员测定。

7. 统计学分析:用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组样本均数比较采用 *F* 检验;多组样本均数比较采用单因素方差分析(*one - way ANOVA*),*P* < 0.05 为差异有显著性。

结 果

与对照组比较,HI 组(*P* < 0.001)、HI + CP 组(*P* < 0.001)和 HI + CP + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著降低。与假手术组比较,HI 组(*P* < 0.001)、HI + CP 组(*P* < 0.001)和 HI + CP + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著降低。与 CP 对照组比较,HI 组(*P* < 0.001)、HI + CP 组(*P* < 0.001)和 HI + CP + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著降低。与 VP 对照组比较,HI 组(*P* < 0.001)、HI + CP 组(*P* < 0.001)和 HI + CP + VP(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著降低。与 HI 组比较,HI + CP 组(*P* < 0.05)和 HI + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著增加。与 HI + CP 比较,HI + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著增加。与 HI + VP 组比较,HI + CP + VP 组(*P* < 0.001)血浆 CRF 水平显著降低,见表 1。

表 1 幼年大鼠血浆中促肾上腺皮质激素释放因子水平($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	幼年大鼠血浆中促肾上腺皮质激素释放因子水平
对照组	10	37.2 ± 3.1
假手术组	10	36.6 ± 2.9
CP 对照组	10	34.4 ± 4.3
VP 对照组	10	34.4 ± 4.4
HI 组(模型组)	10	23.1 ± 2.2 ^{abcd}
HI + CP 组	10	26.7 ± 3.6 ^{abcde}
HI + VP 组	10	36.1 ± 5.8 ^{fm}
HI + CP + VP 组	10	24.7 ± 2.8 ^{abcdn}
<i>F</i>		22.730
<i>P</i>		< 0.001

与对照组比较,^a*P* < 0.001;与假手术组比较,^b*P* < 0.001;与 CP 对照组比较,^c*P* < 0.001;与 VP 对照组比较,^d*P* < 0.001;与 HI 对照组比较,^e*P* < 0.05,^f*P* < 0.001;与 HI + CP 对照组比较,^m*P* < 0.001;与 HI + VP 对照组比较,ⁿ*P* < 0.001

讨 论

Craighead 等^[3]发现 CRF 增加大鼠皮质神经元损伤, Takuma 等^[8]研究证明 CRF 通过 CRF 受体增加星形胶质细胞 Ca^{2+} 内流, Vannucci 等^[9]研究证实钙在神经细胞损害中具有特别重要的意义并且钙超载是导致神经细胞死亡的最后共同通路, 这些说明 CRF 与脑损伤存在内在联系, 这些都是在细胞水平上的研究神经细胞死亡。低氧是一种刺激原, 它可激活 HPA 轴, 并刺激位于下丘脑室旁核 (PVN) 的小细胞 (parvocellular) 区合成和分泌 CRF, 于是血液中的 CRF 水平就发生了变化, 脑损伤的严重程度可能随之发生变化^[10,11]。吴雁等^[12]研究发现低氧暴露 2h、24h 后正中隆起处分泌的 CRF 明显增加, 随着低氧暴露时间的延长 (5 天), 低氧引起的这种变化减弱, 至低氧暴露 15 天时 CRF 分泌与对照组相比已无显著变化。研究表明, 在急性低氧暴露后, 下丘脑 PVN 区 CRF 的 mRNA 表达无明显变化, 低氧暴露 2~5 天后的 CRF 的 mRNA 合成明显增加, 10~30 天后的 CRF 的 mRNA 合成恢复至对照水平。目前的研究是从动物水平上探讨幼年大鼠在缺氧缺血后并放置 1 天后血浆中促肾上腺皮质激素释放因子水平的变化, 并探讨促肾上腺皮质激素释放因子 I 型受体拮抗剂 CP-154,526 和钙离子通道阻断剂 verapamil 对幼年大鼠在缺氧缺血后并放置 1 天后血浆中促肾上腺皮质激素释放因子分泌水平的影响, 这在国内外目前还没有见报道。

CRF 主要是由下丘脑室旁核的神经元合成和释放的, 中央杏仁核、海马、臂旁核、终纹床核、蓝斑等脑区细胞也分泌 CRF。合成和释放的 CRF 的多少与机体内外应激因素密切相关, 也与因素种类、数量及其强度密切相关, CRF 也受分泌细胞上 CRF I 型受体和钙离子通道影响。在分泌的 CRF 中, 一部分从正中隆起处的神经血管接触处进入垂体门脉血中, 随后进入血液循环, 因而血液中有一定的 CRF 水平值; 另一部分 CRF 进到达脉垂体与腺垂体促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 细胞上的 CRF 受体结合, 通过增加 ACTH 细胞内 cAMP 与 Ca^{2+} 来促进 ACTH 的释放, 随后产生一系列生理效应。因此, 进入血液循环 CRF 的量既与 CRF 神经元合成分泌多少有关又与结合到 CRF 受体上的量的多少有关。

我们发现幼年大鼠在 HI 后并放置 1 天后血浆 CRF 水平都显著降低, 这与吴雁等研究不一样, 他们的外应激因素只有低氧, 这可能是由于在缺血和低氧

双应激下大量的 CRF 跟 CRF 受体结合了, 从而使得血浆 CRF 水平显著降低的缘故^[12]; 这种结果也可以从 CRF-R1 拮抗剂 CP 或者钙离子通道拮抗剂 VP 拮抗后能逆转在缺氧缺血下减少的 CRF 分泌水平相一致; 这种结果也可以从免疫组化上得到证实, CRF-R1 拮抗剂 CP 或者钙离子通道阻断剂 VP 拮抗或者阻断后的脑片上的 CRF 含量减少得到证实, 而 HI 后的脑片上的 CRF 含量显著增加一致 (数据待发表)。但是, 当 CP 和 VP 同时预处理后幼年大鼠后, 在缺氧缺血下减少的 CRF 分泌水平没有被改变, 这可能是 VP 和 CP 相互结合, 从而使得 CP 的拮抗功能失去的缘故, 关于这一点值得今后进一步探讨。

参考文献

- 董静, 陈超, 祝益民. 促肾上腺皮质激素释放因子与缺氧缺血性脑损伤[J]. 中国小儿急救医学杂志, 2010, 17(1): 71-74
- Chen XQ, Dong J, Niu CY, *et al.* Effects of hypoxia on glucose, insulin, glucagon, and modulation by corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(7): 3271-3278
- Craighead MW, Boutin H, Middlehurst KM, *et al.* Influence of corticotrophin releasing factor on neuronal cell death in vitro and in vivo. *Brain Res*, 2000, 881(2): 139-143
- 连俊兰, 余勤, 王艳. 幼年大鼠缺氧缺血性脑病动物模型的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, (2716): 3947-3949
- 胡志兵, 郑德枢, 陆雪芬, 等. 新生鼠缺氧缺血性脑病动物模型的建立[J]. 广州医学院学报, 1999, 27(3): 13-14
- 姜曙, 于如同, 毛伯镛, 等. 脑损伤诱导神经细胞凋亡的动物实验研究[J]. 华西医科大学学报, 2000, 31(3): 358-361
- Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats[J]. *Behav Brain Res*, 1996, 78(2): 189-194
- Takuma K, Matsuda T, Yoshikawa T, *et al.* Corticotropin-releasing factor stimulates Ca^{2+} influx in cultured rat astrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 199(3): 1103-1107
- Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. Intracellular calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 126(1): 117-120
- Gibbs DM. Measurement of hypothalamic corticotropin-releasing factors in hypophyseal portal blood[J]. *Fed Proc*, 1985, 44(1 Pt 2): 203-206
- Berkenbosch F, De Goeij DC, Tilders FJ. Hypoglycemia enhances turnover of corticotropin-releasing factor and of vasopressin in the zona externa of the rat median eminence[J]. *Endocrinology*, 1989, 125(1): 28-34
- 吴雁, 杜继曾. 低氧暴露对大鼠下丘脑 CRF 分泌的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(4): 317-319

(收稿: 2011-03-29)

(修回: 2011-06-26)