

· 实验研究 ·

乌头碱对大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素含量的影响*

蔡定芳 沈自尹 陈晓红 刘彦芳

内容提要 在建立促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)放射免疫分析法的基础上,观察温补肾阳代表药物附子的重要有效成分乌头碱对正常大鼠下丘脑 CRH 含量的影响。结果表明:正常大鼠在腹腔注射乌头碱($1\mu\text{g/kg}$, $3\mu\text{g/kg}$, $10\mu\text{g/kg}$)7 天后,下丘脑 CRH 含量呈剂量依赖性增高,免疫组化法亦见:下丘脑室旁核 CRH 神经细胞及正中隆起神经纤维较对照组明显增多增深。提示温补肾阳药物改善下丘脑—垂体—肾上腺轴的可能机理之一是通过兴奋下丘脑 CRH 神经细胞。

关键词 乌头碱 促肾上腺皮质激素释放激素 放射免疫分析法

Effect of Aconitine on Content of Corticotropin-Releasing Hormone in Hypothalamus of Rats
CAI Ding-fang, SHEN Zi-yin, CHEN Xiao-hong, et al *Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

The effect of aconitine on the content of corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) in the hypothalamus of the normal rat injected with aconitine intraperitoneally was studied by means of radioimmunoassay (RIA). Aconitine is the main effective component of *Radix Aconiti Carmichaeli Praeparata*, the representative traditional Chinese herbal medicine of Warm-Supplementing Kidney-Yang (WSKY). Results showed that the content of hypothalamic CRH manifested a dose-dependent increase after 7 days intraperitoneal injection of aconitine ($1\mu\text{g/kg}$, $3\mu\text{g/kg}$ and $10\mu\text{g/kg}$). The CRH neurons in the paraventricular nucleus of hypothalamus and the neural fibers of median eminence also demonstrated increases in number and enrichment in gray tone as observed by immunohistochemical method of ABC. These results suggested that one of the possible mechanism of the WSKY drugs in improving the HPA axis might be exciting the hypothalamic CRH neurons.

Key words aconitine, corticotropin-releasing-hormone, radioimmunoassay

近年研究表明,温补肾阳能有效改善下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴功能^(1, 2)。为进一步探讨其作用部位及机理,本实验观察温补肾阳代表药物附子的主要成分乌头碱对正常大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量的影响,现报告如下。

材料与方法

1 主要试剂 ^{125}I -CRH 购自 Amersham 公司,特异性放射性比强度 74 TBq/mmol , 0.37 KBq 溶于 $100\mu\text{l}$ 0.1% 醋酸, -20°C 保存。使用时再用测定

缓冲液稀释至 $750\text{ Bq}/100\mu\text{l}$ 。兔抗人/鼠 CRH 抗体购自日本大阪肽研究所, $50\mu\text{l}$ /瓶冻干品,使用时以测定缓冲液稀释。标准人/鼠 CRH 购自 Sigma 公司。 $100\mu\text{g}$ CRH 溶于 $200\mu\text{l}$ 0.1% 醋酸, -20°C 保存,用时以测定缓冲液稀释至不同浓度。乌头碱购自 Sigma 公司, 1 mg 乌头碱溶于 0.1 ml 的 0.1 N 盐酸 -20°C 保存,使用时再以 0.9% 生理盐水稀释至不同浓度。免疫组化 ABC 试剂盒购自 Vector 公司。

2 测定缓冲液 每 1000 ml 测定缓冲液含 25 mmol/L 磷酸氢二钠/磷酸二氢钠($\text{pH } 7.4$), 15 mmol/L 氯化镁, 100 mmol/L 氯化钠, 0.1% 三硝基甲苯, 0.1% 叠氮钠, 0.1% 明胶。

* 卫生部研究基金资助课题

上海医科大学华山医院(上海 200040)

3 分离液 每 1000 ml 分离液含聚乙二醇(PEG 6000)300 g, 0.2 mol/L 硼酸, pH8.4, 牛血清白蛋白 5 g。

4 动物分组 雄性 Wistar 大鼠 40 只, 8 周龄, 体重 200 ± 20 g, 由上海中医药大学动物室提供。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照与黑暗时间为每 12 h 更替(光照时间上午 7:00~下午 7:00)。动物随机分为对照组和不同剂量乌头碱组($1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $3 \mu\text{g}/\text{kg}$, $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重), 共 4 组, 每组各 10 只。乌头碱组每天上午 8:30~9:00 腹腔注射不同浓度乌头碱 $100 \mu\text{l}$, 对照组以等体积 0.9% 氯化钠代替乌头碱。动物自由饮食饮水。

5 大鼠下丘脑室旁核与正中隆起标本制备 实验第 7 天上午 10:00, 所有动物用 0.5% 戊巴比妥钠 0.3 ml 腹腔麻醉后, 10% 甲醛心脏灌注内固定, 按文献^[3,4]方法, 取下丘脑室旁核与正中隆起作 CRH 放免测定。下丘脑从前至后, 在 6.7 mm、7.7 mm 处冠状面各切 1 刀, 得约 1 mm 厚的脑组织。再于距脑底 2.0 mm, 距第三脑室 0.5 mm 处, 用内径 1.0 mm 的穿刺针穿刺, 即可得到室旁核; 距脑底 0.3 mm, 距第三脑室 0.5 mm 处各切 1 刀, 即可得正中隆起。将得到的室旁核移至盛有 0.1 N 盐酸:2 N 醋酸=1:1 的 0.2 ml 溶液的试管中, 正中隆起移至同样比例溶液 1 ml 的试管中。组织匀浆器 4000 g 匀浆 20 s, 煮沸加热 3 min, 离心 20 min, 取上清液保存于 -20°C 待测。

6 大鼠下丘脑 CRH 免疫组织化学染色 0.5% 戊巴比妥钠 0.3 ml 腹腔注射麻醉动物后, 无冰醋酸 Bouin 液 200 ml 心脏灌注内固定, 取下丘脑置无冰醋酸 Bouin 液中, 4°C 过夜。室温下 50%~100% 乙醇梯度脱水, 氯仿透明, 石蜡包埋, 从视交叉起至正中隆起止作冠状连续切片, 每片厚 $10 \mu\text{m}$, 依次分置于 10 张载玻片上, 各组取相同序号片作免疫组化染色。用二甲苯、乙醇脱蜡后, 每片加 1:1000 稀释度的抗血清 0.5 ml , 4°C 过夜, 蒸馏水漂洗 15 min, 加生物素标记的 1:200 稀释度羊抗兔 IgG 0.5 ml , 37°C 1 h, 加抗生物素蛋白:生物素=1:1 的复合液体 1 ml , 37°C 1 h, 蒸馏水漂洗 15 min, DAB 显色^[5]。Olympus BH-2 系列显微镜观察结果。

结 果

1 抗 CRH 血清的浓度选择 为了选择工作液的最佳稀释度, 我们检测了 CRH 抗血清的最佳稀释度。将 CRH 抗血清稀释成 1:25, 1:50, 1:

100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 每浓度加入 $750 \text{ Bq } ^{125}\text{I}-\text{CRH}$, 4°C 冰箱中平衡 24 h, 30% PEG 分离, γ 计数器测 cpm, 计算不同稀释度抗血清结合标记 CRH 的百分率(B/T%)。以结合百分率为纵坐标, 抗血清的稀释度为横坐标, 得 CRH 抗血清稀释度曲线(见图 1)。

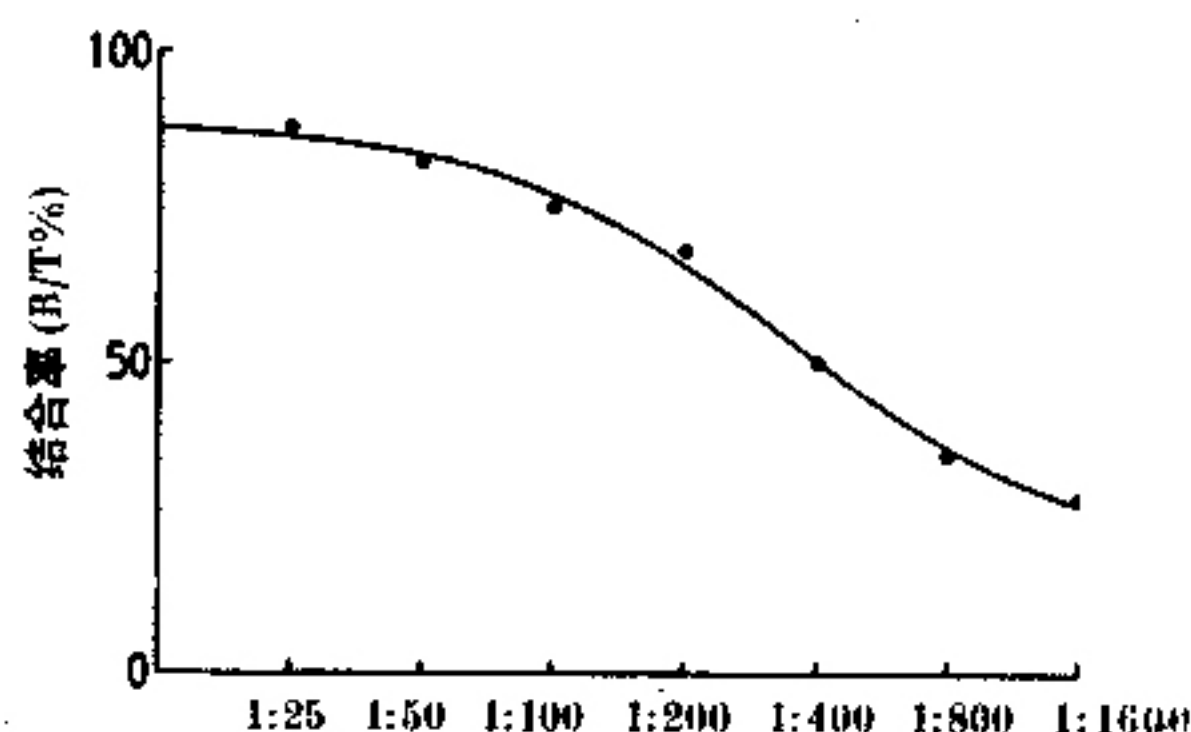


图 1 CRH 抗血清滴度曲线

2 CRH 放射免疫检测的标准曲线 所有玻璃制品如试管等均需硅化。试管内依次加入测定缓冲液 $100 \mu\text{l}$, 待测样品 $100 \mu\text{l}$, 抗血清 $100 \mu\text{l}$ 1:400, $^{125}\text{I}-\text{CRH}$ $100 \mu\text{l}$, 标准 CRH 用测定缓冲液稀释成 $2 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$, $20 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$, $200 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$, $2000 \text{ fmol}/100 \mu\text{l}$ 4 个浓度, 代替待测样品作为标准曲线。震荡混匀器混匀 30 s, 置 4°C 冰箱孵育 24 h, 每管加入 30%PEG 分离液 1 ml , 2000 g 离心 30 min, 弃上清, γ 射线计数器测定 cpm(见图 2)。

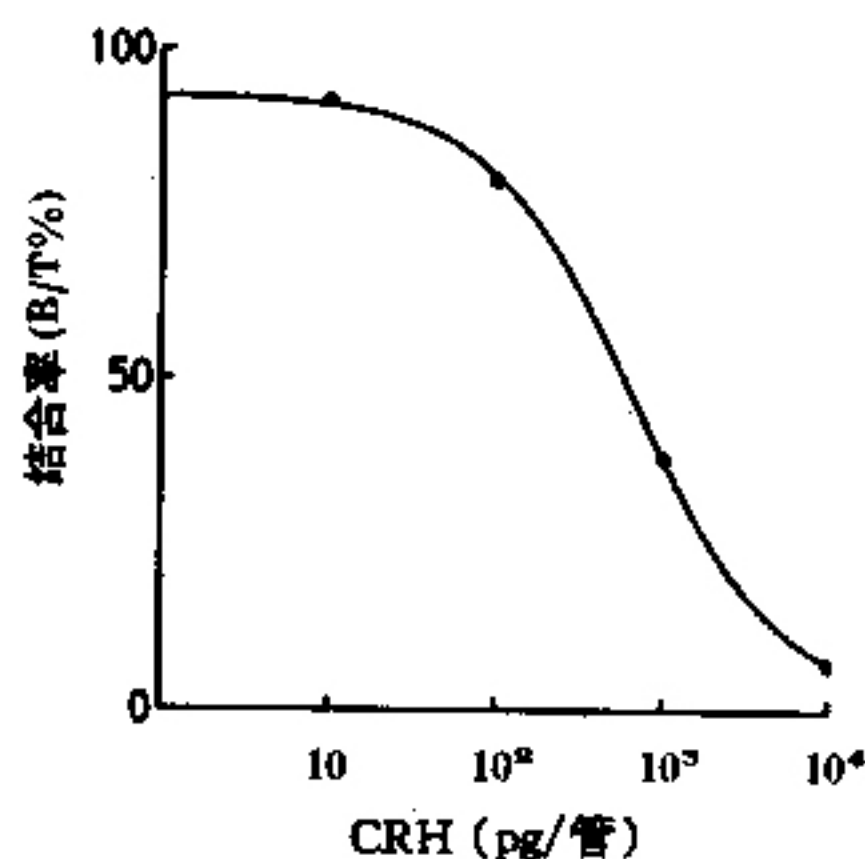


图 2 CRH 标准曲线

3 乌头碱对大鼠下丘脑 CRH 含量的影响 见附表, 乌头碱能有效增高正常大鼠下丘脑 CRH 的含量, 随着药物浓度的增加其含量亦增高, 提示乌头碱可能直接兴奋下丘脑 CRH 的合成与分泌。

附表 乌头碱对大鼠下丘脑 CRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	正中隆起 (ng)	室旁核 (pg)
对照	10	1.24 ± 0.18	128.50 ± 17.00
乌头碱 1 μg	10	1.53 ± 0.24	179.00 ± 22.10*
3 μg	10	1.85 ± 0.27*	239.20 ± 37.80*
10 μg	10	1.70 ± 0.30*	207.10 ± 27.50*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

4 乌头碱对大鼠下丘脑 CRH 免疫组化染色的影响 免疫组化研究表明, 对照组大鼠下丘脑室旁核 CRH 阳性神经细胞及正中隆起 CRH 阳性神经纤维染色较淡较少; 乌头碱组则明显增多增深, 3 个不同剂量组中, 以 3 μg 组为最明显。提示乌头碱能有效促进正常大鼠下丘脑室旁核 CRH 的合成与分泌。

讨 论

1981 年 Vela 等从羊下丘脑提取 CRH 并阐明其分子结构是由 41 个氨基酸构成的多肽物质⁽⁶⁾。人的 CRH 氨基酸序列与大鼠完全相同⁽⁷⁾。CRH 主要由下丘脑室旁核小神经细胞合成与分泌, 其神经纤维投射到正中隆起, 在此处释放后经垂体门脉到达垂体前叶, 与该处分泌促肾上腺皮质激素 (ACTH) 细胞上的 CRH 受体结合, 通过 cAMP 介导刺激 ACTH 分泌和释放, 因而在应激或下丘脑—垂体—肾上腺 (HPA) 轴中起重要作用。

外周血的 CRH 浓度极低, 几乎测不出。因此, 多数研究都是测定动物的下丘脑组织含量或正中隆起处的灌流液, 垂体门脉血及组织/细胞的培养上清液。本研究表明正常成年 Wistar 大鼠的正中隆起和室旁核 CRH 含量与文献报道极为接近^(8,9)。有些研究用测定下丘脑组织的蛋白以表示每毫克蛋白所含的量, 但我们的研究提示 CRH 含量更多地与下丘脑的部位有关, 而与蛋白含量关系不大, 如以蛋白浓度决定其含量则其数据相差较大, 如有的文献报告下丘脑每毫克蛋白含 200 pg 左右⁽⁴⁾, 而有的文献则报告为 1~4 ng⁽¹⁰⁾, 这可能与所取组织大小有关。所以我们认为以核团为单位似更为合理。

附子为温补肾阳的代表药物。30 多年的中西医结合肾本质研究提示补肾可提高下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴功能。但温肾药究竟通过何种途径促进下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺 (HPAT) 轴尚未清楚。本研究表明附子的有效成份乌头碱能促进正常大鼠下丘脑 CRH 的含量, 提示温肾可以通过作用在下丘脑来提高 HPA 轴的功能。至于乌头碱作用于下丘脑的机

理, 我们认为有可能通过兴奋中枢儿茶酚胺系统, 因为最近研究提示乙酰胆碱等刺激 CRH 分泌是通过激活室旁核儿茶酚胺^(11,12), 有关这方面的研究目前正在进行中。

(本研究部分工作为在日本富山医科药科大学完成, 谨向精心指导工作的木村正康教授、木村郁子副教授表示衷心感谢)

参 考 文 献

1. 蔡定芳, 小岛 晓, 沈白尹. 右归饮对大鼠下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴抑制模型的影响. 中国免疫学杂志 1994; 10(4): 236—239.
2. 蔡定芳, 小岛 晓, 沈白尹. 右归饮对皮质酮大鼠细胞免疫及细胞因子的影响. 中国免疫学杂志 1995; 11(4): 248—251.
3. Palkovits M, Brownstein M. Maps and guide to microdissection of the rat brain. New York Elsevier Science Publishing Co. Inc 1988: 100—120.
4. Bingaman EW, Magnuson DJ, Gray RS, et al. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing-hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadectomy. Neuroendocrinology 1994; 52: 228—234.
5. Thind KK, Goldsmith PC. Corticotropin-Releasing factor neurons innervate dopamine neurons in the periventricular hypothalamus of juvenile macaques. Neuroendocrinology 1980; 50: 351—358.
6. Vale W, Spiess J, Rivier C, et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β endorphin. Science 1981; 213: 1394—1397.
7. Shivahara S, Morimoto Y, Furutani Y, et al. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. E.M.B.O. Journal 1983; 2: 775—779.
8. Ixart P, Siard G, Barbanel M, et al. Circadian variations in the amplitude of corticotropin-releasing hormone 41 (CRH41) episodic release measured in vivo in male rats: Correlations with diurnal fluctuations in hypothalamic and median eminence CRH41 contents. Journal of Biological Rhythms 1983; 8(4): 297—309.
9. Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R. Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. Neuroendocrinology 1994; 59: 110—112.
10. Bruhn TO, Mason RT, Vale WW. Presence of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor in rat brain and extrabrain tissue. Program Abstracts of the 14th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 1984; 140: 11.
11. Okuda H, Shioda S, Nakai Y, et al. Immunocytochemical localization of nicotinic acetylcholine receptor in rat hypothalamus. Brain research 1993; 625: 145—151.
12. Matta SG, McCoy JG, Foster CA, et al. Nicotinic agonists administered into the fourth ventricle stimulate norepinephrine secretion on the hypothalamic paraventricular nucleus: An in vivo microdialysis study. Neuroendocrinology 1985; 61: 383—392.

(收稿: 1996-01-15 修回: 1996-04-25)