

低氧对 CRF、AVP 和 NE 刺激体外培养 腺垂体细胞生成 cAMP 的影响*

陈 志 杜继曾¹

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ¹浙江大学生物科学与技术系)

摘要 本文探讨了 CRF、AVP 及 NE 对体外培养大鼠腺垂体细胞生成 cAMP 的作用。CRF 刺激体外培养大鼠腺垂体细胞内 cAMP 的生成, 且浓度与效应正相关。AVP 未引起细胞内 cAMP 差异性变化 ($P > 0.5$)。NE 使培养腺垂体细胞内 cAMP 水平降低。低氧使 CRF 刺激 cAMP 生成的作用降低。而 AVP 及 NE 可能是通过其它胞内信息通路。

关键词 低氧 促肾上腺皮质激素释放激素 培养腺垂体细胞 环磷酸腺苷

* 下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质轴在动物应激以及适应生存环境中起着重要的生理功能。在体内外 AVP 在腺垂体均对 CRF 调节 ACTH 有协同加强作用^[1], 我们曾证明大鼠肾上腺切除 (ADX), 下丘脑正中隆起处 (ME) CRF 生物活性增加是由于 AVP 增加所致。在应激与非应激动物体上, 给予 CRF 抗体并不能有效地抑制 ACTH 及皮质酮的分泌^[2,3]。1986年 Hom les 等证明下丘脑 AVP 胞体的轴突投射至门脉, 从而说明 AVP 也是下丘脑分泌并在腺垂体调控 ACTH 的因子之一。在 ACTH 的调节中, 杜继曾等证明脑室注入 NE 可引起高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 下丘脑 CRF 分泌。NE 在下丘脑内作为 CRF 分泌的中枢兴奋性递质。在应激动物, 交感-肾上腺髓质参与, 血浆中 NE 升高, 它可能参与腺垂体 ACTH 调控。cAMP 作为细胞内第二信使, 它是细胞中激素作用的主要机制之一; 因此, 本文目的旨在研究 CRF、AVP 及 NE 对体外培养大鼠腺垂体细胞生成 cAMP 的作用; 从而探究 CRF、AVP 和 NE 在腺垂体调控 ACTH 分泌中胞内信使 cAMP 的参与作用, 以及低氧的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

实验动物为成年雄性 SD 大鼠 (140-160g)。CRF 购于美国 Peninsula Laboratories, Inc。AVP 由中国科学院上海生物化学研究所杜雨苍教授惠赠。胰蛋白酶为 Difco 产品; 培养基 DM EM 为 Gibco 产品; NE 为 Sigma 产品。其余试剂均为分析纯。

1.2 腺垂体细胞的制备

大鼠颈颈椎处死, 将头部置入 70% 酒精浸泡 5s

消毒后断头。在无茵条件下, 摘取腺垂体置入 HEPES (n-2-hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid) 缓冲液 (NaCl 137mmol, KCl 5mmol, Na₂HPO₄ 0.7mmol, HEPES 25mmol, Glucose 10mmol, CaCl₂ 360mmol, pH 7.2) 中分成四份, 并用 HEPES 缓冲液冲洗四次, 除去 HEPES 缓冲液后, 再用无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液洗二次, 垂体块置于无 Ca²⁺、Mg²⁺ 0.25% 胰蛋白酶的 Hanks 液, 入 37 培养箱消化 20min, 每隔 5min 摇动一次。而后去除消化液, 并用含 0.3% 牛血清白蛋白的 Hanks 液洗两次, 将组织块置入 5ml Hanks 液, 用 10ml 巴氏移液管轻轻吹打 50 余次, 用 200 目的尼龙网过滤, 滤后将未消化的组织再按上法消化处理。滤液合并, 450 × g 离心 6min, 去除上清液, 用 Hanks 液洗涤两次后用不含小牛血清的 DM EM 液洗一次以及含 15% 小牛血清 DM EM 洗一次。用含 15% 小牛血清 DM EM 制成细胞悬液进行培养, 内含 50000U/L 青霉素, 50mg/L 链霉素; 2.5mg/L 制霉菌素。

1.3 细胞计数

取 0.1ml 上述细胞悬液, 加 0.2ml 0.1mol/L 的柠檬酸溶液, 摇动数秒再加入 0.2ml 2% 龙胆紫溶液, 摇匀, 在血球计数板上计数。同时用 0.1% 中性红检查细胞存活率, 其存活率为 96%。

1.4 细胞贴壁培养

计数后稀释至 4×10^8 个细胞/L, 吹匀。每个培养孔 2ml, 入 37 含 5% CO₂, 95% 空气的培养箱培养 (常氧培养, 实际是以 2.3km 西宁地区为标准)。培

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39170332)

1996- 7- 15 收稿 1997- 3- 20 修回

养4d后,开始CRF等刺激实验。低氧条件是在常氧培养4d后,供给5%CO₂,8%O₂的N₂混合气(气体混合仪混合),8h后再进行CRF等刺激实验。细胞在开始CRF等刺激实验前进行存活率随机检查,每六孔抽查一孔,其存活率为93%。

1.5 CRF、AVP和NE对培养细胞刺激实验

5%CO₂,95%空气37℃培养4d以及低氧8h的培养细胞,吸除DMEM,分别加入含不同浓度CRF、AVP和NE的Hanks液1ml,对照组只加1ml Hanks液。加入30分钟后吸尽培养皿中液体,用Hanks液洗两次后,用橡皮擦下贴壁细胞并加入1ml 1mol/L HClO₄液冲洗,取0.9ml冲洗液在3000rpm/min离心10min,取上清液800μl,用20% KOH溶液中和至pH=7,以3000rpm/min离心

10min,取全部上清液置于真空干燥箱,在60℃,72kPa(540mmHg)真空条件下蒸干。上述给药30min后吸出的培养皿中液体以及用Hanks液洗两次后的液体合并,按上述方法的条件蒸干待测胞外cAMP。

1.6 环磷酸腺苷测定

按北京原子能所生产的药盒测定。

数据均经 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性采用t检验。

2 结果

2.1 体外培养的SD大鼠腺垂体细胞对CRF、AVP及NE的反应

随CRF浓度升高,培养细胞内cAMP含量显著升高;胞外释出水平也显著增加,而AVP并不改

Tab 1. Effects of CRF, AVP and NE on cAMP formation in cultured rat anterior pituitary cells during normoxia and hypoxia ($\bar{x} \pm s$) (n= 4dishes)

CRF stimulation			AVP stimulation			NE Stimulation		
Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)	Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)	Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)
Nomoxia	0	0.44 ± 0.02						
Hypoxia	0	0.53 ± 0.03						
Nomoxia	10 ⁻¹⁰	0.83 ± 0.09**	Nomoxia	10 ⁻⁸	0.45 ± 0.09	Nomoxia	10 ⁻⁸	0.45 ± 0.06
Hypoxia	10 ⁻¹⁰	0.78 ± 0.05**	Hypoxia	10 ⁻⁸	0.56 ± 0.03	Hypoxia	10 ⁻⁸	0.45 ± 0.04*
Nomoxia	10 ⁻⁹	2.89 ± 0.10***	Nomoxia	10 ⁻⁷	0.43 ± 0.03	Nomoxia	10 ⁻⁷	0.36 ± 0.04*
Hypoxia	10 ⁻⁹	1.64 ± 0.10***	Hypoxia	10 ⁻⁷	0.54 ± 0.03	Hypoxia	10 ⁻⁷	0.46 ± 0.02*
Nomoxia	10 ⁻⁸	3.25 ± 0.10***	Nomoxia	10 ⁻⁶	0.43 ± 0.04	Nomoxia	10 ⁻⁶	0.29 ± 0.03**
Hypoxia	10 ⁻⁸	1.97 ± 0.11***	Hypoxia	10 ⁻⁶	0.57 ± 0.04	Hypoxia	10 ⁻⁶	0.33 ± 0.05**

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, compared with control group.

Tab 2. Effects of CRF, AVP and NE on cAMP released from cultured rat anterior pituitary cells during normoxia and hypoxia ($\bar{x} \pm s$) (n= 4dishes)

CRF stimulation			AVP stimulation			NE Stimulation		
Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)	Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)	Group	Dose (nmol)	cAMP (pmol/dish)
Nomoxia	0	0.29 ± 0.01						
Hypoxia	0	0.26 ± 0.03						
Nomoxia	10 ⁻¹⁰	1.25 ± 0.09***	Nomoxia	10 ⁻⁸	0.32 ± 0.08	Nomoxia	10 ⁻⁸	0.31 ± 0.03
Hypoxia	10 ⁻¹⁰	1.00 ± 0.02***	Hypoxia	10 ⁻⁸	0.25 ± 0.01	Hypoxia	10 ⁻⁸	0.29 ± 0.04
Nomoxia	10 ⁻⁹	2.54 ± 0.07***	Nomoxia	10 ⁻⁷	0.39 ± 0.04	Nomoxia	10 ⁻⁷	0.38 ± 0.07
Hypoxia	10 ⁻⁹	1.79 ± 0.08***	Hypoxia	10 ⁻⁷	0.27 ± 0.04	Hypoxia	10 ⁻⁷	0.34 ± 0.07
Nomoxia	10 ⁻⁸	4.18 ± 0.09***	Nomoxia	10 ⁻⁶	0.27 ± 0.05	Nomoxia	10 ⁻⁶	0.36 ± 0.02
Hypoxia	10 ⁻⁸	2.81 ± 0.01***	Hypoxia	10 ⁻⁶	0.25 ± 0.01	Hypoxia	10 ⁻⁶	0.31 ± 0.02

*** P < 0.001, compared with control group.

变胞内及胞外cAMP含量(P > 0.5)。当NE浓度升高时,胞内cAMP水平降低;而胞外水平无差异性

变化(见表1,表2)。

2.2 低氧下CRF、AVP及NE对cAMP的作用



低氧具有抑制CRF刺激cAMP生成和向胞外释放的作用。CRF浓度为 10^{-10} mol时,胞内cAMP的形成增高只有47%;而非低氧下增高则为88%,CRF浓度为 10^{-8} mol时,胞内cAMP的形成增高为272%;而非低氧下增高则为638%。在低氧下,AVP未改变胞内及胞外cAMP含量;而低氧下NE抑制胞内cAMP生成;而对胞外cAMP无影响(见表1,表2)。

3 讨论

当生物机体受到各种环境因子刺激时,血浆中ACTH浓度立即增加,皮质酮亦相应增多^[9],这是一种机体对环境的应激作用,是由下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质轴来完成的,下丘脑肽CRF和AVP通过腺垂体门脉系统调控腺垂体ACTH的合成与分泌。

CRF在体内均促使ACTH分泌^[5]。在我们以往的实验中,脑室注射CRF,血浆中皮质酮和腺垂体cAMP均随CRF剂量增加而升高^[6]。本研究证明随CRF浓度升高,体外培养的腺垂体细胞内cAMP含量显著升高。因此,cAMP是CRF刺激腺垂体ACTH细胞分泌ACTH的第二信使,AVP可协同CRF在腺垂体促使ACTH分泌,但是AVP不能单独刺激离体培养的腺垂体细胞生成cAMP,可见AVP的协同作用没有通过cAMP系统。NE在腺垂体能促使ACTH分泌,但体外培养腺垂体细胞,胞内cAMP却随NE浓度升高而降低,其促ACTH分泌机制可能与CRF和AVP相异。NE浓度升高时,胞内cAMP水平降低;然而脑室注射NE可促使下丘脑CRF分泌增加,血浆皮质酮升高^[3],因此,NE激活HPA轴的机制主要是通过NE激活了下丘脑

CRF而实现的。

体外培养腺垂体细胞受低氧刺激后,其对CRF刺激生成cAMP作用显著降低,低氧使体外培养腺垂体细胞cAMP的生成受到抑制。可见低氧通过调节CRF而对腺垂体细胞cAMP产生作用外,低氧还直接对腺垂体细胞cAMP生成的细胞过程有抑制作用,其深入机制待研究。

4 参考文献

1. Gillies G F, Linton E A, Lowry P J. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 1982; 229: 355- 357
2. Kenneth A G, Udelman R, Listwak S, et al. Effects of immune neutralization of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin and β endorphin in the surgically stressed rat. *Endocrinology* 1988; 122: 306- 310
3. Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibition of adrenocorticotropin secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* 1982; 218: 377- 378
4. Kant G J, Meyerhoff J L, Bunnell B N, et al. Cyclic AMP and cyclic GMP response to stress in brain and pituitary: stress elevates pituitary cyclic AMP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1982; 17: 1067- 1072
5. 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
6. Chen Zhi, Du Jizeng. Hypoxia effects on hypothalamic corticotropin-releasing hormone and anterior pituitary cAMP. *Acta Pharmacologica Sinica* 1996; 17(6): 489 - 492

EFFECT OF CRF, AVP AND NE ON cAMP IN CULTURED RAT ANTERIOR PITUITARY CELLS DURING HYPOXIA

Chen Zhi Du Jizeng¹

(Northwestern Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences,

Xining 810001; ¹Department of Biology, Zhejiang University)

ABSTRACT

In the study, the effect of CRF (corticotropin-releasing factor), AVP (arginin pressin) and NE (norepinephrine) on cAMP formation in cultured rat anterior pituitary cells *in vitro* was examined and the effect

of cAMP formation between normoxia and hypoxia (8% O₂) was compared. CRF stimulated the formation of cAMP levels which was correlated with the concentration of CRF in medium. The cAMP levels in medium increased. The intracellular cAMP in cultured anterior pituitary cells was not changed by AVP. The concentration of intracellular cAMP was decreased by NE, but the content of extracellular cAMP was not changed. Hypoxia decreased the stimulating effects of CRF on the cAMP formation in cultured anterior pituitary cells.

KEY WORDS hypoxia; corticotropin-releasing factor (CRF); cultured rat anterior pituitary cells; cAMP

X 射线诱导小鼠脑组织一氧化氮合酶活性的变化

沈文梅 王成彬 汪德清 张道强 谷 峰

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

我们用小鼠为实验对象, 观察不同剂量 X 射线全身照射后其脑组织中一氧化氮合酶 NOS 的活性变化, 探讨辐射所致脑损伤的可能机制, 同时还观察黄芪总黄酮 TFA 对辐射过程中 NOS 活性变化的影响。

1 材料与与方法

18-20g 雌雄各半的 C57 小鼠 44 只随机分成 5 组: 对照组 8 只, 4Gy 照射组 8 只, 8Gy 照射组 10 只, 12Gy 照射组 10 只以及 TFA 预防组 8 只, 即在 8Gy 照射前 1h 腹腔注射 TFA (本实验室从蒙古黄芪中提取, 军事医学科学院二所鉴定) 0.4ml (2mg/ml)。

用美国产 1800 型直线加速器进行 X 射线照射, 9MeV、400cGy/min、面积 35×35cm、距离 100cm 条件下全身均匀照射。

小鼠于照射后 72h 断头, 快速分离整个脑组织, 50mmol/L pH 7.4 tris 缓冲液冲洗 3 次, 置入玻璃匀浆器中, 加适量同上 tris 缓冲液在冰浴中匀浆。匀浆液 10000g, 0-4 离心 30min, 收集上清液放到 -40℃ 冰箱中备用。

NOS 活性测定 在含有 NOS 底物左旋精氨酸 (L-Arg) 1mmol/L, 辅助因子: 还原性辅酶 II (NADPH) 0.1mmol/L、四氢生物喋呤 (BH₄) 50μmol/L、黄素单核苷酸 (FMN) 10μmol/L、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 10μmol/L 及二硫苏糖醇 (DDT) 1mmol/L, CaCl₂ 1mmol/L, MgCl₂ 0.1mmol/L, 钙调蛋白 5μg 组成的酶反应体系中, 加入小鼠脑组织匀浆上清液 50μl, 37℃ 避光温育 80min, 应用对氨基苯磺酸-N-(1-萘基)-乙二胺重氮、偶氮反应, 测定反应体系中 NO 稳定代谢产物 NO₂⁻ 生成量, 作为 NOS 活性测定方法。用 1mg 蛋白质在酶反应体系中一分钟产生的 NO₂⁻ 量, 作为 NOS 活性表示。

2 结果与讨论

不同剂量 X 射线照射组与对照组比较, 小鼠脑组织中 NOS 活性呈现下降趋势, 其中 12Gy 组差异显著 ($P < 0.05$)。TFA 预防组的 NOS 活性高于同剂量照射组, 但尚无统计学差异 (见附表)。

Tab. NOS activity in mice brain after various doses of x-ray irradiation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NOS activity pmol NO ₂ ⁻ (min*mg protein)
Control	8	16.89 ± 8.18
4Gy	8	15.01 ± 8.11
8Gy	10	12.74 ± 5.75
12Gy	10	9.59 ± 4.61*
TFA + 8Gy	8	15.18 ± 6.89

* $P < 0.05$, compared with control group

脑组织虽要在大剂量 (数百 Gy) 贯穿辐射作用下才会发生死亡, 但其功能变化则只需不大的剂量即可引起。一般认为全身照射对脑功能的影响主要通过两种途径: 射线直接作用于神经元、胶质细胞; 射线引起脑微循环障碍, 导致神经细胞二次损伤。本实验结果提示: 以上两种途径可能通过

近年来发现的新的神经传导介质和血管舒张因子——NO 介导。兴奋性氨基酸受体被活化后可产生大量 cGMP, 目前认为主要是由于 Ca²⁺ 通道开放, NOS 被激活产生 NO 激活鸟苷酸环化酶的结果。脑组织中 cGMP 含量以小脑最高, NOS 活性在小脑的颗粒细胞层最为丰富, 而小脑颗粒细胞对实验条件下的辐射最为敏感。NO 具有很强的舒张血管和抑制血小板聚集和粘附的功能, 在放射性脑血管损伤中常出现中等大小动脉管腔缩小, 微血管中血栓形成而引起脑的微循环障碍, 这可能也与 NOS 活性下降, NO 产生不足有关。

实验研究表明, 黄芪具有抗炎、降压、改善微循环、降低组织氧耗量及清除自由基等功效。辐射损伤的机理十分复杂, 辐射造成的脑组织中 NOS 活性下降及 TFA 对其防护作用还有待于更进一步的研究。

解放军总医院放疗科协助完成本实验谨此致谢。

(1997- 1- 16 收稿 1997- 4- 15 修回)