

低氧对新生大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素发育的影响*

杨生妹 杜继曾 李良成

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要 本文研究模拟高原低氧下新生和胚胎大鼠发育时,下丘脑内促肾上腺皮质激素(CRF)及垂体环磷酸腺苷(cAMP)水平的变化。结果表明:5km海拔高度抑制下丘脑CRF的发育,当发育至25天和30天时,CRF含量分别为对照组的64.8%和57.9%。此时,体重分别为47.8%和52.9%。30天时,cAMP为20.8%。本研究还显示,在7km海拔高度,已怀孕大鼠难以完成正常的妊娠和胎儿发育过程,5km海拔高度暴露17天时,胚胎脑内CRF含量高于对照。

关键词 低氧发育 促肾上腺皮质激素释放激素 环磷酸腺苷 新生大鼠 胚胎大鼠

* 下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴为机体的重要应激轴。下丘脑室旁核CRF为其中枢主控因子^[1],它通过cAMP介导使腺垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH)。常氧时,大鼠下丘脑CRF发育起始于胚胎16.5天^[2],出生后仍处于发育阶段。低氧下HPA轴的发育知之甚少。本文将通过测定低氧下发育时,不同发育阶段大鼠CRF及cAMP含量的变化,初步探讨低氧对CRF神经元及其功能发育影响。同时观察低氧对妊娠大鼠胚胎发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 交配3天后雌性大鼠,体重160g左右;出生5天新生大鼠。由本所实验动物房提供。

1.2 主要试剂 CRF及兔抗鼠CRF血清购自美国Peninsula Laboratories Inc.公司。¹²⁵I-Na及³H-cAMP药盒购自北京原子能研究所。¹²⁵I-CRF本室标记^[3]。

1.3 低氧模拟 孕鼠随机为三组:2.3km(对照组,西宁海拔高度,大气压为77.3kPa,肺泡氧分压为10.0kPa,血氧饱和度大于93%),5km,7km海拔组。每组8只。低气压舱低氧模拟10天,17天时,取胚胎。10天组取整个胚胎测CRF及cAMP含量,17天组取全脑测CRF及cAMP。新生大鼠8只与母鼠一起放入低压舱,由母鼠哺乳,模拟高度同孕鼠。模拟低氧5、10、15、20、25、30天后,取下丘脑测CRF,

取垂体测cAMP。

1.4 CRF测定 样品用1ml冷HCL(0.1N)匀浆后,10000g离心15min,取上清液真空冷冻干燥。CRF标准品或冻干样品用测定缓冲液(0.02mM磷酸盐缓冲液,pH7.4,含0.05M NaCl,0.15M抗坏血酸,0.1%BSA,0.1%Triton和0.01%NaN₃)溶解后,取100μl与100μl抗血清(滴度1:10000)室温孵育24h,加入¹²⁵I-CRF(约10000cpm)100μl孵育24h,加入羊抗兔血清(1:25)和正常兔血清(1:125)各100μl,过夜。加入500μl测定缓冲液,1700离心20min弃上清,沉淀在FJ-2003/OIB计数仪计数。

1.5 cAMP测定 样品用1m11N高氯酸匀浆,1000g离心15min,上清用20%KOH中和后,离心,上清在70℃水浴中蒸干。测定按药盒说明书进行。

1.6 数据处理 采用组间t-test。

2 结果

2.1 低氧对新生大鼠发育的影响

2.1.1 体重 7km组新生大鼠低氧一周内全部死亡。5km组生长缓慢,体重明显低于同龄对照组。尤其是20天以后,差异明显加大,低氧明显抑制新生大鼠发育(图1)。

* 中国科学院上海生理所低氧生理开放实验室资助项目
1996-1-2 收稿 1996-4-8 修回

2.1.2 下丘脑 CRF 含量 5km 低氧下发育 5、15、20 天时,CRF 与对照组无明显差别。但 25 和 30 天时,对照组 CRF 水平迅速提高,而低氧组升高缓慢。下丘脑 CRF 水平仅为对照组的 64.8% 和 57.9% (图 2)。表明新生鼠发育的关键时刻,低氧明显抑制新生鼠生长,下丘脑 CRF 神经元的生长发育也明显受到抑制。

2.1.3 垂体 cAMP 含量 5km 低氧模拟 5、10 天时的 10、15 天龄大鼠,由于垂体 cAMP 含量太低,本法检不出。15 天时才可检出。20、25 天时 cAMP 较对照组有所增加,但无明显的统计学差别,30 天时,cAMP 水平迅速下降,仅为对照组的 20.8% (图 3),低氧明显抑制 cAMP 的功能。

Tab. 1 Effect of hypoxia on the content of corticotropin-releasing factor (CRF) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in fetal rats.

	Altitude (km)	CRF(ng)		cAMP(pmol)	
13 day fetus , 10 day hypoxia	2.3	0.046 ±0.008	n = 7	0.50 ±0.10	n = 5
	5.0	0.070 ±0.010	n = 6	0.43 ±0.11	n = 5
20 day fetus , 17 day hypoxia	2.3	0.135 ±0.020	n = 5	2.37 ±0.50	n = 5
	5.0	0.412 ±0.070	n = 5 * *	1.43 ±0.48	n = 5

whole body for 13 days , whole brain for 20 days * *P < 0.01 vs 2.3 corresponding km

2.2 低氧对胚胎发育的影响

2.2.1 CRF 及 cAMP 含量 低氧 10 天后, 5km 组整个胚胎内 CRF 及 cAMP 含量无明显的变化。低氧 17 天后,5km 组胚胎脑内 cAMP 无变化,CRF 却明显高于对照组(表)。

2.2.2 胚胎数目及形体发育 低氧 10 天后, 5km 组孕鼠怀孕率为 100%,形体与对照组无

明显差别,平均胚胎数为 14.75 (n = 4),对照组为 11.63 (n = 3)。7km 组孕鼠怀孕率为 40% (n = 5),胚胎呈念珠状排列,数目多,形体小。低氧 17 天后,7km 组孕鼠无一怀胎,5km 组胚胎形体发育仍与对照相似,胚胎数量为 7.75 (n = 4),对照组为 10 (n = 7)。

3 讨论

曾有人提出:怀孕改变大鼠脑血管及体血管对低氧的正常反应^[4,5],低氧影响孕鼠体内的激素变化^[6]。本实验中,7km 低氧暴露 10 天后,胚胎发育滞后,17 天后胚胎全部消失,一星期内新生大鼠全部死亡,进一步说明,在严峻的低氧环境中,大鼠难以完成正常的妊娠及发育过程。相比之下,5km 组胚胎受到的应激较小,这与自然界中,在此高度仍有生物存活并繁

殖相符合。

由于低氧 10 天时,胚胎的实际年龄为 13 天,这时胚胎尚无具分泌功能的 CRF 神经元,或 CRF 神经元还很少,可能此时所测整个胚胎的 CRF 来源于母体,低氧 17 天(实际年龄 20 天)后,5km 组胚胎全脑内 CRF 含量增加,表明胎儿神经元已经发育^[2]。另本室曾有报导^[7],不同妊娠期孕鼠对低氧应激的耐受力不同。妊娠后期,胎儿体重增加,加大母体缺氧,导致母体应激增强。此时胎儿脑中 CRF 值升高也许亦与母体有关。因此时胎儿血脑屏障仍不健全^[8]。

新生大鼠暴露于 5km 低氧,体重明显低于同龄对照组。由于未断乳,不能排除部分原因是由于低氧影响母鼠摄食能力^[9],进而使产乳量降低。至于低氧对幼鼠的直接作用,可能:(1)抑制生长激素分泌。(2)降低对食物的摄取、消化、吸收及代谢能力。本室工作证明,低氧影响幼鼠肝物质代谢功能^[7]。

从图 2 可以看出,低氧 25 和 30 天时,对照组下丘脑 CRF 值呈迅速增加,而低氧组 CRF 水平明显低于对照组。本结果显示新生鼠发育至 25 和 30 天时,进入迅速发育的关键时期,此时低氧难以提供足够的氧及能量,从而使神经元发育明显受阻。其他下丘脑神经肽如 TRH 等亦在同时开始迅速发育^[10]。

激活垂体 cAMP 的因子很多,CRF 只是其中之一。低氧 20,25 天时,新生大鼠垂体 cAMP 显示增高,说明垂体发育处于关键时期。30 天时,低氧组 cAMP 降低至对照组 20%,可

能是低氧应激反应在此龄鼠内迅速发展起来的缘故。

4 参考文献

1. Levin N, M Blum, J L Roberts. Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expressing by vasopressin in rat anterior pituitary *Endocrinology* 1989;125:2957 - 2966
2. Shigeo D, Yoshihito T, Masahiko M. Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res* 1984;248:539 - 544
3. Du J Z, You Z B. A radio immunoassay of corticotropin releasing factor of hypothalamus in *Ochotona curzonlae*. *Acta Theriologica Sinica* 1992;12(3):223 - 229
4. Harrison GL, Moor L G. Systemic vascular reactivity during high-altitude pregnancy. *J Appl Physiol* 1990;69:201 - 206
5. Andrew D H, Lawrence D L, et al. Pregnancy alters cerebrovascular adaptation to high altitude hypoxia. *Am J Physiology* 1994;266:R765 - R772
6. Sobrevilla L A, Romero I, et al. Esteriol levels of cord blood, maternal venous blood and amniotic fluid at delivery at high altitude. *Am J Obstet Gynecol* 1971;110:596 - 597
7. 尤治秉, 李庆芬, 陈晓光, 等. 不同发育年龄大鼠肝细胞及其溶酶体对急性低氧的应答. *中国应用生理学杂志* 1989;5(1):15 - 21
8. Reinis S, Goldman J M. The development of the brain. Charles C. Thomas, Springfield, IL 1980; 400pp
9. Octavi M, Amadea G, et al. Direct evidence for chronic stress induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stress. *Neuroendocrinology* 1994;60:1 - 7
10. Lamberton R P, Lechan R M, Jackson M D. Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone and histidyl proline diketopiperazine in the rat central nervous system and pancreas. *Endocrinology* 1984;115:2400 - 2405

EFFECT OF HYPOXIA ON THE DEVELOPMENT OF HYPOTHALAMIC CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR OF NEONATAL RATS

Yang Shengmei, Du Jizeng, Li Liangcheng

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences; Xining 810001)

ABSTRACT

Changes of the development of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) and pituitary

cAMP of neonatal and fetal rats exposed to simulated altitude hypoxia in hypobaric chamber were studied the results showed that when the animals were exposed to 5km altitude for 10, 15, 20, 25 and 30 days, their body weight increased with age but more slowly than control group (2.3km). The hypothalamic CRF was also developed with age and still lower than control, especially on 30 and 35 days (exposed for 25 and 30 days), just 64.8% and 57.9% of the control group. Meanwhile, the pituitary cAMP was higher but not significant than control when exposed for 20 and 25 days, and decreased rapidly for 30 days, only 20.8% of the control group. It was also found that pregnant rats could not complete their pregnancy, thus, their fetus could not develop well at 7km altitude. The CRF of 20-day-old fetus (exposed for 17 days) was higher than control group at 5km altitude. The development of hypothalamic CRF was markedly inhibited when neonatal rats were exposed to 5km altitude for 25 and 30 days, suggesting that this may be the key stage of development and hypoxia could not provide enough oxygen and energy for their metabolism.

KEY WORDS hypoxia development; corticotropin-releasing factor; cyclic adenosine monophosphate; neonatal rats; fetal rats

不同海拔高度居住 1 年血液流变性和微循环的变化

张西洲 张新宇 何富文 张素萍 郑延安
(新疆军区高山病研究所, 新疆叶城 844900)

我们在喀喇昆仑山海拔 1400(30 人)、3700(30 人)、4300(20 人)、5070(25 人)和 5380m(25 人)对驻守该地区 1 年的 130 名青年士兵同时进行了血液流变学和结膜微循环的检测,并对二者作了相关分析。

Tab. 1 Hemorrheology of the young men lived at different altitudes for one year (稯 ±s).

altitude (m)	n	HCT (vol)	b (mPa. s)	r (mPa. s)	p (mPa. s)	PFC (g/L)	TK	VAI	MST (s)	TFL
1400	30	0.42 ±0.03	3.94 ±0.69	6.62 ±0.98	1.55 ±0.18	2.78 ±0.73	0.80 ±0.15	0.59 ±0.22	17.07 ±9.72	0.66 ±0.01
3700	30	0.62* ±0.07	4.88 ±1.96	7.40* ±0.75	1.59 ±0.01	2.99 ±0.45	1.40* ±0.19	0.82* ±0.22	25.11* ±12.07	0.87* ±0.26
4300	20	0.63 ±0.07	5.66 ±0.07	7.48 ±0.76	1.69* ±0.09	3.41* ±0.38	1.46 ±0.21	0.84 ±0.17	31.45 ±9.85	1.06* ±0.19
5070	25	0.67 ±0.06	5.92 ±0.87	7.54 ±0.56	1.82* ±0.13	3.93* ±0.53	1.48 ±0.28	0.86 ±0.23	35.22 ±12.07	1.21 ±0.28
5380	25	0.73* ±0.05	6.83* ±0.40	7.89 ±0.54	1.94* ±0.09	4.45* ±0.40	1.72* ±0.10	1.01* ±0.11	49.29* ±11.20	1.55* ±0.17

$P < 0.05$, * $P < 0.01$, compared downward with adjacent altitude

(下转 363 页)