

下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子受体 2 反义寡核苷酸在严重烧伤大鼠高代谢反应中的作用



陈忠勇 汪仕良 彭曦 王凤君 赵云 王裴

【摘要】 目的 了解下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子受体 2(CRFR2)反义寡核苷酸(ASO)在严重烧伤大鼠高代谢反应中的作用。方法 将 36 只 SD 大鼠大脑立体定位,第三脑室置管。其中 30 只烧伤后,根据脑室注入物的不同,分为烧伤对照组(注入等渗盐水 3 μL)、CRFR1 正义寡核苷酸(ODN)组(注入 CRFR1ODN 10 μg)、CRFR1ASO 组(注入 CRFR1ASO 10 μg)、CRFR2ODN 组(注入 CRFR2ODN 10 μg)、CRFR2 ASO 组(注入 CRFR2 ASO 10 μg)。每组 6 只大鼠。另取 6 只大鼠作为正常对照组,不致伤,仅在脑室内注入等渗盐水 3 μL。分别于伤后 5、6 d 在大鼠清醒状态下经脑室置管注射药物。伤后 7 d 经该管注入 20 g/L 甲紫 3 μL,当日检测大鼠静息能量消耗(REE),并取大鼠脑组织检测 CRFR2 mRNA 表达及 CRFR2 蛋白含量。结果 烧伤对照组、CRFR1ODN 组、CRFR1ASO 组、CRFR2ODN 组、CRFR2ASO 组 REE 值分别为(11 840 ± 987)、(11 133 ± 1100)、(10 733 ± 1338)、(11 123 ± 1321)、(7563 ± 890)kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹,均高于正常对照组[(6641 ± 526)kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹, P < 0.05],而 CRFR2ASO 组却明显低于 CRFR2ODN 组(P < 0.01)。烧伤对照组伤后脑组织 CRFR2 mRNA 的表达和 CRFR2 蛋白含量明显增加,而 CRFR2ASO 组 CRFR2 mRNA 表达及 CRFR2 蛋白含量却低于正常对照组(P < 0.01)。结论 中枢应用 CRFR2ASO 可下调下丘脑 CRFR2 mRNA 表达和蛋白含量,降低烧伤高代谢反应,下丘脑 CRFR2 受体可介导大鼠烧伤后高代谢反应。

【关键词】 烧伤; 高代谢反应; 促肾上腺皮质激素释放因子受体 2

Role of corticotropin releasing factor receptor 2 antisense oligodeoxynucleotide of hypothalamus in hypermetabolism in rats with severe burn CHEN Zhong-yong, WANG Shi-liang, PENG Xi, WANG Feng-jun, ZHAO Yun, WANG Pei. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To observe the role of corticotropin releasing factor receptor 2 antisense oligodeoxynucleotide (CRFR2ASO) of hypothalamus in hypermetabolism in rats with severe burn. **Methods** Stainless-steel cannula were implanted into the 3rd ventricle. According to different medicine delivered into the 3rd ventricle, 30 SD rats with 30% TBSA full-thickness burn were divided randomly into burn control group (BC, with injection of 3 μL saline), CRFR1ODN group (with injection of CRFR1ODN 10 μg), CRFR1ASO group (with injection of CRFR1ASO 10 μg), CRFR2ODN group (with injection of CRFR2ODN 10 μg), CRFR2ASO group (with injection of CRFR2ASO 10 μg), with 6 rats in each group. Another 6 rats served as normal control (NC) and they received isotonic saline 3 μL instead. Different medicines were respectively delivered into respective group on 5, 6 post injury day (PID), then 3 μL gentian violet was introduced on 7 PID. Resting energy expenditure (REE) value and the expression level of hypothalamus CRFR2 mRNA and CRFR2 protein were determined. **Results** REE value in BC, CRFR1ODN, CRFR1ASO, CRFR2ODN, CRFR2ASO groups was 11 840 ± 987, 11 133 ± 1100, 10 733 ± 1338, 11 123 ± 1321, 7563 ± 890 kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹, respectively, which were obviously higher than that in BC group [6641 ± 526 kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹, P < 0.05]. REE value in CRFR2ASO group was obviously lower than that in CRFR2ODN group (P < 0.01). The expression level of hypothalamus CRFR2 mRNA and its protein in BC group were increased after burn, which were obviously lower in CRFR2ASO group than NC group (P < 0.01). **Conclusion** Central application of CRFR2ASO can downregulate the expression level of hypothalamus CRFR2 mRNA and its protein, and reduce hypermetabolism. Hypothalamus CRFR2 may mediate hypermetabolism in burn rats.

【Key words】 Burns; Hypermetabolism; Corticotropin releasing factor receptor 2

烧伤高代谢反应是维护机体内环境稳定的重要反应之一。近年来知晓,下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF)相关肽及其受体(CRFR)在能量代谢中起重要的作用,中枢 CRF 相关肽属促分解代谢神经肽,中枢应用此肽可减少摄食,增加能量消耗^[1]。CRF 相关肽均通过与 CRFR1、CRFR2 结合起作用,有文献报道,CRFR 可能参与烧伤高代谢反应的形成^[2]。因此,我们利用反义寡核苷酸(ASO)技术,观察下调 CRFR 表达后烧伤高代谢反应的变化情况,探讨 CRFR2 受体在该反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

蛋白提取液、CRFR1 mRNA、CRFR2 mRNA、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)引物由北京赛百盛基因技术有限公司提供或合成。RNA 提取试剂(美国 Bio-Flux 公司)。RCDC 蛋白测定试剂盒、凝胶图像分析仪、Chemi Doc XRS 系统(美国 Bio-Rad 公司)。1620PH 型血气分析仪(美国 Instrumentation Laboratory 公司)。江湾 I 型 C 立体定位仪(第二军医大学神经生物所研制)。

1.2 ASO 的合成及配制

根据 GenBank 网站上的大鼠 CRFR1 mRNA (NM030999)、CRFR2 mRNA (NM022714) 序列,分别设计 CRFR1 mRNA、CRFR2 mRNA 反义序列(ASO)^[3]及正义序列(正义寡核苷酸,ODN)^[4]。合成后经点硫代修饰,聚丙烯酰胺凝胶纯化。CRFR1ASO、CRFR1ODN、CRFR2ASO、CRFR2ODN 注射前在 ASO、ODN 中加入等渗盐水,配成 3.3 μg/μL。

1.3 分组及处理

健康雄性 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物所)36 只,体质量 250 ~ 320 g。用 10 g/L 戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,按 Paxinos 图谱^[5]用立体定位仪定位第三脑室,微型电钻在定位点钻一小孔,埋入外径 0.5 mm 的不锈钢管,深度以见到清亮或淡黄色脑脊液涌出为宜。固定不锈钢管,插入与不锈钢管等长的针芯以防止脑脊液外流。单笼饲养 1 周,将 30 只大鼠背部脱毛后用凝固汽油燃烧 18 s,造成背部 30% TBSA III 度烧伤(经病理切片证实)。腹腔注射 40 mL/kg 乳酸林格液抗休克,自由进食饮水,根据脑室注入物的不同分为烧伤对照组(注入等渗盐水 3 μL)、CRFR1ODN 组(注入 CRFR1ODN 10 μg)、CRFR1ASO 组(注入 CRFR1ASO

10 μg)、CRFR2ODN 组(注入 CRFR2ODN 10 μg)、CRFR2ASO 组(注入 CRFR2ASO 10 μg)。每组 6 只大鼠。余下 6 只作为正常对照组,不致伤,仅在脑室内注入等渗盐水 3 μL。分别于伤后 5、6 d 上午在大鼠清醒状态下用微量注射器经埋置管注射药物。伤后 7 d 实验结束时,注入 20 g/L 甲紫溶液 3 μL,立即处死大鼠,开颅取脑,切开脑组织鉴定药物注射部位,第三脑室染色阳性视为实验结果有效。取下丘脑标本置液氮保存待测。

1.4 检测指标

1.4.1 静息能量消耗(REE)的测定 在大鼠清醒、空腹和安静状态下,将其放入一密闭容器中,15 min 后收集气体,测定气体中 O₂ 和 CO₂ 含量,计算 REE(kJ/d) = [3.9 × 吸入 O₂ (L/min) + 1.1 × 呼出 CO₂ (L/min)] × 1440 × 4.184,并根据体表面积计算单位面积的 REE。

1.4.2 CRFR2 mRNA 表达的检测 采用半定量反转录(RT)-PCR 法。CRFR mRNA 上游引物:5'-AACGGCATCAAGTACAACACGAC-3',下游引物:5'-CGATTCCGGTAATGCAGGTCATAC-3',扩增片段 142 bp; GAPD 上游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3',下游引物:5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3',扩增片段 453 bp。提取总 RNA 行 RT-PCR 扩增。反应条件:94 °C 预变性 5 min、变性 30 s、57 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。凝胶图像分析仪扫描后进行半定量分析,以 CRFR2/GAPD 的比值表示 CRFR2 mRNA 的相对表达量。

1.4.3 CRFR2 蛋白含量的检测 用蛋白提取液提取大鼠下丘脑组织蛋白,采用蛋白质印迹法测定组织中蛋白含量。操作按试剂盒说明书进行。一抗 CRFR2 为 1:200,β 肌动蛋白为 1:5000。采用 ChemiDoc XRS 系统采集化学发光信号,经 Quantity One 4.5 软件对结果进行分析。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析及 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠 REE 变化情况

烧伤对照组、CRFR1ODN 组、CRFR1ASO 组、CRFR2ODN 组、CRFR2ASO 组伤后 REE 值分别为(11 840 ± 987)、(11 133 ± 1100)、(10 733 ± 1338)、(11 123 ± 1321)、(7563 ± 890) kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹,均

明显高于正常对照组 [(6641 ± 526) kJ · (m²)⁻¹ · d⁻¹, P < 0.05], 而 CRFR2ASO 组却明显低于 CRFR2ODN 组 (P < 0.01)。

2.2 CRFR2 mRNA 的表达及 CRFR2 蛋白含量

伤后脑组织中 CRFR2 mRNA 的表达及 CRFR2 蛋白含量均明显增加,第三脑室注射 CRFR2ASO 后 CRFR2 mRNA 的表达及 CRFR2 蛋白含量均明显低于正常对照组 (P < 0.01)。见图 1,2。

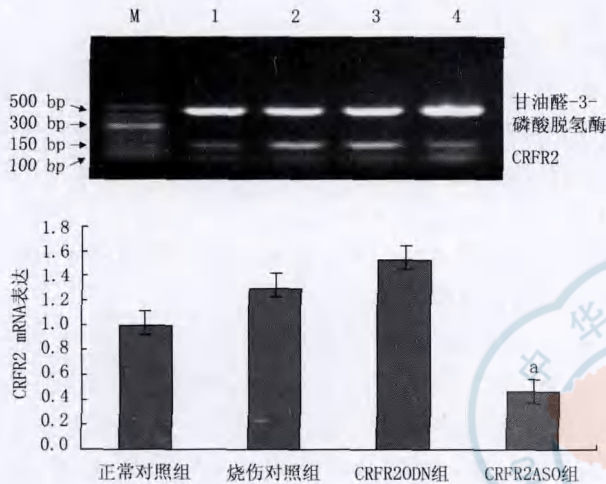


图 1 各组大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子受体 2 (CRFR2)mRNA 表达情况。上图为反转录-PCR 检测结果;下图为半定量分析结果;M 为 marker,1 为正常对照组,2 为烧伤对照组,3 为 CRFR2 正义寡核苷酸(ODN)组,4 为 CRFR2 反义寡核苷酸(ASO)组;与正常对照组及 CRFR2ODN 组比较,*P < 0.01

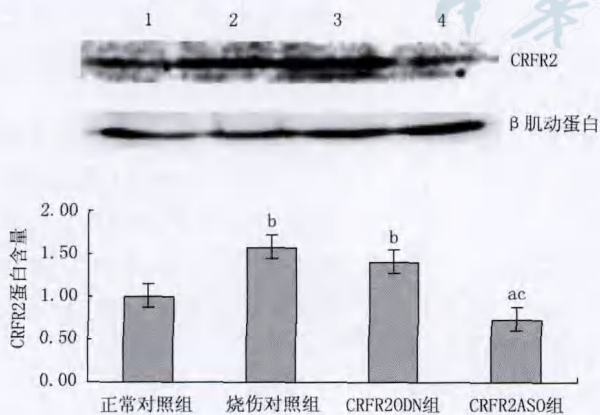


图 2 各组大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子受体 2 (CRFR2)蛋白含量。上图为蛋白电泳结果,下图为半定量分析结果;1 为正常对照组,2 为烧伤对照组,3 为 CRFR2 正义寡核苷酸(ODN)组,4 为 CRFR2 反义寡核苷酸(ASO)组;与正常对照组比较,*P < 0.05, ^bP < 0.01;与 CRFR2ODN 组比较,^cP < 0.01

作用,20 多年来神经生物学不断发展,大量与能量平衡有关的下丘脑神经肽相继被发现,为探索烧伤高代谢反应机制提供了重要的理论基础。近年来,越来越多的证据显示,CRF 系统在机体能量平衡调节网络中起重要作用。CRF 相关肽系统属分解代谢神经肽,哺乳动物 CRF 系统包括 CRF、尿皮素 1 (UCN1)、UCN2、UCN3、CRFR1、CRFR2,所有 CRF 相关肽均通过与 CRFR 结合而起作用^[6]。CRFR 包括 CRFR1、CRFR2 以及新近发现的非哺乳动物 CRFR₃^[7],均为 7 次跨膜的 G 蛋白耦联受体,CRFR1 与 CRFR2 约有 70% 的同源性。正常情况下下丘脑 CRFR1 表达较低,下丘脑室旁核内 CRFR1 mRNA 的表达不能检出,但各种应激原可诱导下丘脑室旁核 CRFR1 mRNA 的表达^[8]。CRFR2 因其 mRNA 剪接不同形成 3 种剪接变体,分别是 CRFR2A、CRFR2B、CRFR2C,其中 CRFR2A 是脑内主要的 CRFR2 受体^[9]。下丘脑 CRFR1 主要介导烧伤急性应激反应,CRFR2 主要介导能量代谢。Chance 等^[2]应用皂草素-CRF 化合物行第三脑室注射,造成下丘脑 CRFR 化学性损伤,结果观察到,皂草素-CRF 可明显降低大鼠烧伤后高代谢,提示下丘脑 CRFR 可能介导烧伤高代谢反应。他们的实验还提示,烧伤后高代谢下降的同时,下丘脑 CRFR2 mRNA 的表达也降低。

ASO 是一种人工合成的以碱基互补方式为目的 mRNA 上的靶序列结合并抑制基因表达的一类寡核苷酸片段。本实验应用 ASO 技术,人工合成 CRFR1、CRFR2 mRNA 的反义片段,通过第三脑室给药下调大鼠下丘脑,观察烧伤大鼠 REE 变化情况。CRFR2ASO 经硫代磷酸化修饰,以硫原子取代磷酸骨架上的氧原子构成硫代磷酸骨架,具有抗核酸酶、稳定性好、易穿过细胞膜的特性。本研究结果显示,伤后大鼠 REE 明显增高,与烧伤对照组及 CRFR2ODN 组比较,CRFR2ASO 组大鼠 REE 明显下降。同时,伤后大鼠下丘脑 CRFR2 mRNA 的表达明显增加,行 CRFR2ASO 第三脑室注射后下丘脑 CRFR2 mRNA 的表达明显下降。第三脑室注射 CRFR2ASO 后使下丘脑 CRFR2 蛋白含量明显降低。提示中枢注射 CRFR2ASO 可以下调下丘脑 CRFR2 mRNA 和蛋白的表达水平,降低烧伤后高代谢,CRFR2 可能参与烧伤后高代谢反应。

3 讨论

烧伤后高代谢反应是严重烧伤应激、炎症反应的重要组成部分。下丘脑在能量平衡调节中起关键

参考文献

[1] Cerri M, Morrison SF. Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus. Neurosci.

2006,140(2): 711-721.

[2] Chance WT, Dayal R, Friend LA, et al. Possible role of CRF peptides in burn induced hypermetabolism. *Life Sci*, 2006, 78(7): 694-703.

[3] Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, et al. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in sociallydefeated rats. *RegulPept*, 1995, 59(2): 229-239.

[4] Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, et al. The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor and urocortin induced anorexia. *Neuroreport*, 1998, 9(7): 1601-1606.

[5] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1986: C18-37, S37-78, 80, H87-105.

[6] Richard D, Lin Q, Timofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of

energy balance. *Eur J Pharmacol*, 2002, 440(2/3): 189-197.

[7] Arai M, Assil IQ, Abou - Samra AB. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 446-454.

[8] Rivest S, Laflamme N, Nappi RE. Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *J Neurosci*, 1995, 15(4): 2680-2695.

[9] Nazarloo HP, Nishiyama M, Tanaka Y, et al. Down-regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 2 beta mRNA expression in the rat cardiovascular system following food deprivation. *Regul Pept*, 2002, 105(2): 121-129.

(收稿日期: 2008-06-04)

(本文编辑: 张红)

· 技术与方法 ·

介绍一种烧伤肢体治疗康复器

王年云

在烧伤肢体创面治疗阶段, 特别注重肢体的悬吊及创面减压问题, 其目的是为了 提高移植自体皮或异体皮的生长及成活率^[1], 防止受压创面造成感染而引发烧伤脓毒症等问题。目前多采用悬挂输液瓶吊架、灯架、床架等传统方法, 无专门的器具。为此, 笔者研制出一种烧伤肢体治疗康复器, 应用于临床取得了较好的效果, 并获得实用新型专利(专利号: ZL200420069465. 4)。

该康复器由主控电路、电动机、齿轮变速箱、垂直旋转螺杆、螺母升降板、导轨、垂直杆、悬臂挂梁、推车支架和电子显示电路等构成。见图 1。外壳及支架采用不锈钢制作, 便携式推车型。控制主板选用精确的 8098 单片机作自控电路, 控制电动机的正、反向转动, 带动变速机械缓慢升降。当电机启动后, 带动齿轮变速箱上的垂直螺杆低速转动, 同时与

垂直旋转螺杆相配的螺母升降板沿导轨缓慢滑动升降, 当碰到已设定的触动开关时, 电动机便自动断电停止运转, 这时电动机停机信号会启动单片机的计时电路(开机前人工预设)。待静止时间计时完成, 电动机又再次启动运转, 其自动循环过程为上升—静止—下降—静止。也可由患者自行控制遥控器操作。如果选用人工按键升降定位, 就能按要求长时间选择悬吊高度或下降休息。

使用方法: 将一次性棉垫对折成 0.09 m 宽的长方形棉垫条, 托住(固定)患者下肢足跟部或小腿, 并用棉垫条托住(固定)手腕部或前臂, 再用绷带将棉垫托条两头固定于升降器上部伸缩支架上。设定康复器升降时间, 一般悬吊 40 min、下降休息 20 min。选择悬吊高度以充分暴露肢体根部创面为宜。接通电源, 康复器自动循环升降。

优点: 该康复器控制主板既有 16 位微控制器, 又有 8 位微控制器。接口简单, 有较强的运算能力。它的高速输入和输出功能适合于各类自动控制。可按患者耐受的情况设定时间, 能按时自动悬吊下降, 每次悬吊和休息时间间隔短, 当患者感觉悬吊较累时, 升降器可缓慢下降休息, 下降休息时改变了悬吊受压点。悬吊着力部位受压时间短, 创面血液循环好, 创面不容易溃烂, 有利于生长。

自动循环升降不需要人工管理, 减轻了医务人员的劳动强度。机身小(70 cm × 15 cm × 15 cm), 立柱推车形, 悬吊支架可根据患者肢体长短伸缩定位调节, 并能灵活移动或锁定到病床床尾, 不占病房空间, 双上、下肢可同时悬吊也可分别悬吊。医师在悬吊时可以照常换药, 护士也可正常进行治疗操作。

参考文献

[1] 毛远桂, 张志安, 肖长辉, 等. 削痂术在Ⅲ度烧伤创面的应用. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(4): 244.

(收稿日期: 2008-03-12)

(本文编辑: 张红)

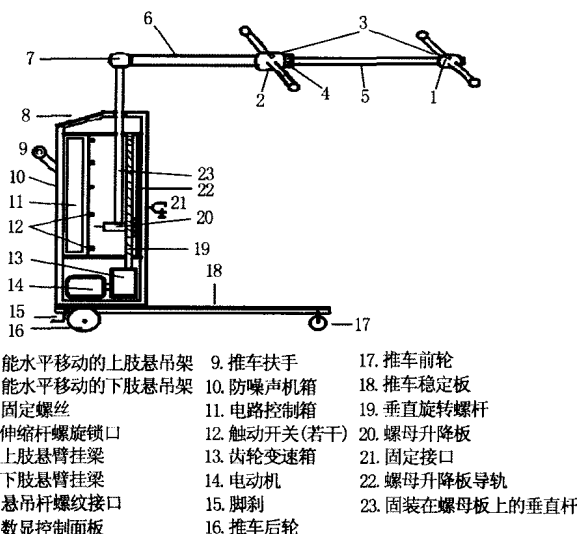


图 1 肢体治疗康复器示意图

作者单位: 330006 南昌大学第一附属医院烧伤科