

Orexin - A mRNA 表达的脏器分布及在急性炎症反应中的变化

颜光涛 林季 廖杰

【摘要】 目的 研究 Orexin - A mRNA 表达在体内主要脏器的分布及在急性炎症损伤后的变化,探讨 Orexin - A 在急性炎症反应中的作用。方法 取正常雄性 SD 大鼠和肠缺血-再灌注(IR)损伤模型大鼠的下丘脑、胃、肺、肾、附睾脂肪垫、睾丸、肝、脾、十二指肠等主要脏器,采用逆转录-聚合酶链反应(RT - PCR)检测 Orexin - A mRNA 在各主要脏器的分布情况,同时检测 IR 损伤后下丘脑内 Orexin - A mRNA 的表达变化。结果 所取各脏器均有 Orexin - A mRNA 表达,尤其是在胃、肺、肾的表达丰度较高。在 IR 损伤的急性刺激作用后,下丘脑 Orexin - A mRNA 表达水平出现波动式的下降趋势。结论 Orexin - A mRNA 广泛分布于机体主要脏器,对急性炎症刺激具有时间依赖性的应答效应,其表达水平变化可以作为一种新型的急性炎症反应监测指标。

【关键词】 Orexin - A mRNA; 缺血-再灌注损伤,肠; 逆转录-聚合酶链反应

Distribution of Orexin - A mRNA expression in different organs and its variation in acute inflammation

YAN Guang - tao * , LIN Ji , LIAO Jie . * Research Laboratory of Biochemistry, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To explore the distribution of Orexin - A mRNA expression in different organs, and its variation in acute inflammation, and to evaluate the role of Orexin - A in acute inflammatory responses. Methods Hypothalamus, adipose tissue, lung, stomach, duodenum, liver, spleen and testis of male Sprague - Dawley rats (including normal and those of intestinal ischemia/reperfusion injury model) were harvested, and reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) was used to assess Orexin - A mRNA expression in different tissues of normal rats, and that in the hypothalamus of ischemia/reperfusion injured rats. Results All tissues expressed Orexin - A mRNA, and it was especially high in the stomach, lung and kidney. After the acute stimulus of ischemia/reperfusion injury, Orexin - A mRNA expression showed a trend of fluctuant declination in the hypothalamus. Conclusion Orexin - A mRNA is widely expressed in the major organs, and it has a time - dependent response to acute inflammatory stimuli. The results suggest that its expression variation may be used as a novel marker for acute inflammation.

【Key words】 Orexin - A mRNA; intestinal ischemia/reperfusion injury; reverse transcription - polymerase chain reaction

Orexin - A, 亦称为 hypocretin - 1, 是一种由下丘脑侧部特异神经元分泌的短肽。它由 33 个氨基酸残基组成, 分子质量仅为 3 562 ku, 参与睡眠和能量稳态的调控过程, 尤其与肥胖的发生及摄食行为密切相关, 主要作用是刺激摄食和减少能量消耗^[1]。在不同物种之间, 其蛋白结构也具有很大程度的同源性, 人 Orexin - A 的结构就与大鼠、小鼠及牛的完全一致^[2]。近年来的研究表明, Orexin - A mRNA 主要表达于下丘脑及周围脑组织, 也有人在表皮及胃肠黏膜中发现少量 Orexin - A mRNA^[3,4], 但对其在机体主要脏器的分布情况尚无明确报道。肠缺

血-再灌注(ischemia/reperfusion, IR)损伤是一种能很好反映急性炎症反应的模型, 在损伤过程中机体会出现严重的能量代谢障碍和失控炎症反应。由于 Orexin - A 是一种主要由下丘脑分泌的与能量代谢密切相关的蛋白因子, 我们推测 Orexin - A 可能参与了肠 IR 损伤等急性炎症反应所致能量代谢障碍的调控过程。为此, 我们提取正常大鼠和肠 IR 损伤模型大鼠下丘脑、胃、肺、肾、附睾脂肪垫、睾丸、肝、脾、十二指肠等主要脏器, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT - PCR)检测 Orexin - A mRNA 在各主要脏器的分布情况, 以及肠 IR 损伤后下丘脑 Orexin - A mRNA 的表达变化, 以探讨 Orexin - A mRNA 表达在组织中的分布及其与急性炎症反应的关系, 为今后进一步研究 Orexin - A 在急性炎症反应中的确切作用奠定了基础。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970717)

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院生化研究室(颜光涛, 林季), 解放军总医院仪器测试中心(廖杰)

作者简介: 颜光涛(1960 -), 男(汉族), 四川省宜宾市人, 研究员, 博士研究生导师(Email, yan301@263.net)。

1 材料与方法

1.1 材料:雄性成年 SD 大鼠 60 只,体重 250 g,由解放军总医院实验动物中心提供。焦碳酸二乙酯 (DEPC)、琼脂糖、溴乙吡啶购自 Sigma[®] 公司;禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶、寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 [Oligo(dT)₁₅] 引物均购自 Promega[®] 公司; TRIzol 试剂、Taq 酶、dNTPs、β-actin 引物均购自北京鼎国生物技术公司;Orexin-A 引物由北京赛百盛基因技术公司合成;其他试剂均为市售国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠肠 IR 损伤模型的建立:54 只存活大鼠被随机分成 6 组:假手术组 (Sham), 缺血 60 min 再灌注 30 min (I60R30)、90 min (I60R90)、150 min (I60R150)、240 min (I60R240) 和 360 min (I60R360), 每组 9 只。腹腔内注射质量分数为 1% 的戊巴比妥钠 1.5 ml (60 mg/kg) 麻醉, 无菌条件下开腹并分离肠系膜上动脉 (SMA), 以微动脉夹夹闭 60 min, 然后取出微动脉夹进行再灌注^[5]。

1.2.2 各脏器组织样品的制备:假手术组大鼠麻醉后取各组织标本;IR 各实验组大鼠依据不同时间点取各组织标本。组织标本置液氮中速冻后, 转移到 -80 ℃ 保存。

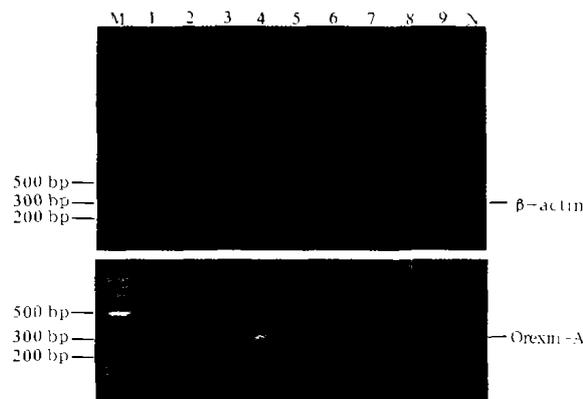
1.2.3 总 RNA 的提取以及 RT 反应:采用 TRIzol 试剂提取各组织的总 RNA, 具体操作步骤按北京鼎国生物技术公司提供的说明书进行。提取总 RNA 后, 以三蒸水作为空白对照, 测量样品在 260 nm 处的吸光度值 (A 值) 并计算总 RNA 浓度。RT 体系 (20 μl) 包括:2.5 μg 总 RNA, 40 U AMV 逆转录酶, 1 μg Oligo(dT)₁₅ 引物, 4 μl 5× 逆转录缓冲液, 1 mmol/L dNTPs, 20 U RNA 酶抑制剂及质量分数为 0.1% 的 DEPC 处理灭菌水。将 RT 样品置于 37 ℃ 水浴 2 h, 然后 95 ℃ 水浴 5 min 以灭活 AMV 酶, 快速冰镇并在 4 ℃ 下, 10 000×g 离心 5 min, 保存 cDNA 样品于 -20 ℃^[6]。

1.2.4 PCR 和图像处理:以 β-actin mRNA 水平

作为 cDNA 合成及 PCR 的内源性参照。Orexin-A PCR 体系 (50 μl) 包括:4 μl cDNA, 0.5 μmol/L 上游及下游引物, 0.8 mmol/L dNTPs, 2 U Taq 酶, 5 μl 10×PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl₂) 及灭菌去离子水。β-actin PCR 反应体系同 Orexin-A, 除了其上、下游引物各为 0.2 μg。反应所用的引物序列及条件见表 1。Orexin-A 引物序列参考 Johren 等^[7] 介绍的方法。表 1 中 PCR 反应条件的字母缩写所代表的意义如下:P (pre-degeneration) 为预变性, D (degeneration) 为变性, A (anneal) 为退火, E (elongation) 为延伸, C (cycle) 为循环数。用质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴乙吡啶) 电泳检测 PCR 产物, 并用 Gel-Pro[®] 凝胶分析仪拍摄电泳图像, 并根据仪器提供的分析软件进行图像处理。

2 结果

2.1 Orexin-A mRNA 在各脏器中的分布 (图 1): Orexin-A mRNA 在下丘脑、胃、肺、肾、附睾脂肪垫、睾丸、肝、脾、十二指肠等脏器中均有表达, 尤其是胃、肺和肾的表达丰度较高。



注: M 为 Marker; 1~9 分别为下丘脑、胃、肺、肾、附睾脂肪垫、睾丸、肝、脾、十二指肠; N 为阴性对照

图 1 Orexin-A mRNA 在各脏器中的表达结果

Figure 1 Expression of orexin-A mRNA in different tissues

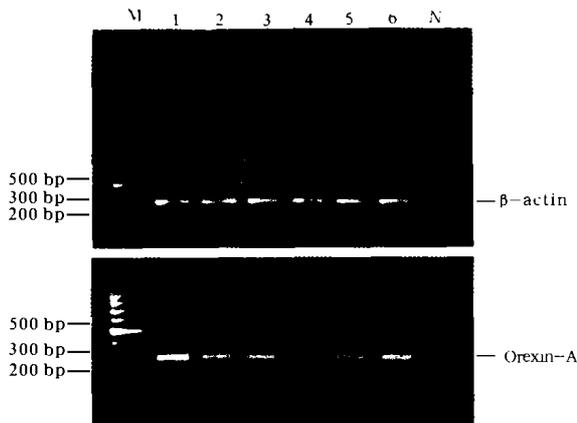
2.2 损伤后下丘脑 Orexin-A mRNA 表达水平的比较 (图 2): 与损伤后 Sham 组下丘脑 Orexin-A mRNA 水平相比, I60R30 组和 I60R90 组均有所降

表 1 PCR 所用的引物序列及反应条件

Table 1 Nucleotide sequences of PCR primers and PCR conditions

引物名	核酸序列及 PCR 反应条件	GenBank 编号	预期大小
Orexin-A	正义: 5'-GCCGTCTCTACGAAGTGTG-3'	AF041241	303 bp
	反义: 5'-CGAGGAGAGGGGAAAGTTAG-3'		
	P 94 C 5 min, D 94 C 30 s, A 56 C 30 s, E 72 C 60 s, C 35 次		
β-actin	正义: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	BC063166	318 bp
	反义: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'		
	P 94 C 5 min, D 94 C 45 s, A 55 C 45 s, E 72 C 45 s, C 30 次		

低, I60R150 组最低, I60R240 组和 I60R360 组逐步回升, 但仍低于 Sham 组的水平。



注: M 为 Marker; 1~6 分别为 Sham, I60R30, I60R90, I60R150, I60R240, I60R360; N 为阴性对照

图 2 IR 损伤后下丘脑 Orexin-A mRNA 水平的比较
Figure 2 Comparison of Orexin-A mRNA levels in hypothalamus after intestinal I/R injury

3 讨论

Orexin 包含 Orexin-A 和 Orexin-B 两种成分, 亦称为 hypocretin-1 和 hypocretin-2。目前研究较多的是 Orexin-A, 但对它的研究几乎都局限在 Orexin-A 与肥胖、摄食、睡眠觉醒周期以及激素分泌等方面^[8]。尽管 Orexin-A 具有多样化的功能, 其受体也广泛分布于体内各器官^[9], 但目前对 Orexin-A mRNA 的组织分布尚缺乏详细的报道。本研究结果显示, Orexin-A mRNA 广泛表达于体内主要脏器, 提示 Orexin-A 在机体的各种生命活动中发挥着重要作用。

肠 IR 损伤模型是一种经典的创伤、感染和应激反应模型, 通过夹闭 SMA 引发动物肠缺血、坏死, 致使大量内毒素和氧自由基进入血液循环, 并且激活全身单核/巨噬细胞和中性粒细胞, 释放大炎症介质和细胞因子, 引发严重的全身性炎症反应和能量代谢障碍, 甚至脓毒症和多器官功能衰竭^[10]。同时体内交感、副交感神经系统活化引起儿茶酚胺、肾上腺皮质激素等物质急剧增加, 血糖水平也发生改变, 机体通过中枢神经和内分泌系统调节和加强各脏器的功能和代谢, 稳定内环境^[11, 12]。有研究报道, Orexin-A 与儿茶酚胺、糖皮质激素、血糖、交感神经系统兴奋性有一定联系^[13-16], 说明 Orexin-A 在肠 IR 损伤等急性炎症反应能量代谢障碍中可能起一定作用。

目前国内外尚无关于 Orexin-A 与急性炎症反应相关联的确切报道。肠 IR 损伤对下丘脑组织 Orexin-A mRNA 表达水平的影响受到能量代谢

状态、血浆 Orexin-A 水平变化及麻醉作用的多重影响。在 IR 早期(从 I60R30 到 I60R150), 高代谢状态使血浆 Orexin-A 水平升高^[15], 产生负反馈信号, 同时麻醉剂抑制下丘脑神经元的活性^[17], 下丘脑神经元内 Orexin-A mRNA 表达受到抑制而逐步下降; 之后, 高代谢状态逐步恢复, 其促进血浆 Orexin-A 水平升高的作用减弱, 同时麻醉剂对下丘脑神经元活性的抑制也减弱, 于是 Orexin-A mRNA 的表达水平受负反馈影响而呈逐步回升趋势(从 I60R240 到 I60R360)。Orexin-A 在下丘脑组织内基因表达水平的波动式变化和整体的下降趋势, 提示 Orexin-A 在 IR 损伤过程中可能起到一定的炎性细胞因子作用, 即当机体处于炎症反应状态时, 该细胞因子表达水平受到机体自身反馈调节的抑制, 以使机体免遭进一步的损害。

通过上述实验结果我们可以看出, Orexin-A mRNA 广泛分布于机体主要脏器, 其水平受中枢神经系统的调控。Orexin-A 在急性炎症反应中产生有限的变化, 对肠 IR 损伤等急性炎症刺激具有较迟缓的应答, 表明其可能在损伤所致能量代谢障碍中发挥一定的炎性细胞因子作用。若能进一步证实 Orexin-A 是一种新型的炎症介质, 对于临床危重病急救医学和新药研发将有巨大的推动作用。

参考文献:

- Sakurai T. Orexin: a link between energy homeostasis and adaptive behaviour[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6: 353-360.
- Wieland H A, Soll R M, Doods H N, et al. The SK-N-MC cell line expresses an orexin binding site different from recombinant orexin 1-type receptor[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 1128-1135.
- Beiras-Fernandez A, Gallego R, Blanco M, et al. Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors[J]. *J Anat*, 2004, 204: 117-122.
- de Miguel M J, Burrell M A. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut[J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50: 63-69.
- Turnage R H, Kadesky K M, Bartula L, et al. Splanchnic PGI₂ release and "no reflow" following intestinal reperfusion[J]. *J Surg Res*, 1995, 58: 558-564.
- 林季, 颜光涛, 王录焕, 等. 肠缺血-再灌注损伤对 Leptin 蛋白质及 mRNA 水平的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 651-655.
- Johren O, Neidert S J, Kummer M, et al. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats[J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 3324-3331.
- Iqbal J, Pompolo S, Sakurai T, et al. Evidence that orexin-containing neurons provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine hypothalamus[J].

- J Neuroendocrinol, 2001, 13: 1033 - 1041.
- 9 Zhang S, Blache D, Vercoe P E, et al. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep [J]. Regul Pept, 2005, 124: 81 - 87.
 - 10 Sun K, Liu Z S, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia - reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 1934 - 1938.
 - 11 Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, et al. Effects of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats [J]. Auton Neurosci, 2002, 95: 37 - 42.
 - 12 郑国伟, 陈少如, 黄邦汉. 舒心注射液治疗心肌缺血-再灌注损伤的临床与实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7: 165 - 167.
 - 13 Kawada Y, Ueno S, Asayama K, et al. Stimulation of catecholamine synthesis by orexin - A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor - 1 [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66: 141 - 147.
 - 14 Stricker - Krongrad A, Beck B. Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296: 129 - 133.
 - 15 Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner A L. Glucose regulates the release of orexin - a from the endocrine pancreas [J]. Diabetes, 2003, 52: 111 - 117.
 - 16 van den Top M, Nolan M F, Lee K, et al. Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones [J]. J Physiol, 2003, 549 (Pt 3): 809 - 821.
 - 17 Kushikata T, Hirota K, Yoshida H, et al. Orexinergic neurons and barbiturate anesthesia [J]. Neuroscience, 2003, 121: 855 - 863.
- (收稿日期: 2005 - 01 - 29 修回日期: 2005 - 03 - 23)
(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

重度创伤后顽固性发热及重度贫血 1 例

侯杰 郭应军 王国军 刘八一 林玉珍

【关键词】 创伤; 全身炎症反应综合征; 发热; 贫血

救治成功重度创伤后顽固性发热及重度贫血 1 例, 报告如下。

1 病历简介

患者男, 57 岁, 汽车碾压伤 3 h, 于 2002 年 9 月 16 日入院。X 线检查示: 左股骨中段及左胫腓骨粉碎性骨折, 左第 5 后肋骨折。查体: 患者意识淡漠, 体温为 37.1 °C, 呼吸频率为 20 次/min, 脉搏为 122 次/min, 血压 54/34 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 血红蛋白 (Hb) 60 g/L。给予积极抗休克治疗, 紧急行左下肢毁损伤口清创、骨折复位以及股骨 AO 内固定术, 左小腿 Orthofix 外支架固定术。术后入住重症监护治疗病房 (ICU) 时, 患肢渗出严重, Hb 25 g/L, 经液体复苏及改善微循环, 休克纠正, 体温波动在 37.5 ~ 38.8 °C, 热峰出现在每日下午 3 ~ 7 时, 无寒战; 每日输入压积红细胞 2 ~ 4 U, Hb 波动在 60 g/L 左右。住院第 4 d X 线胸片示双侧胸腔中量积液, 予胸腔闭式引流术, 左侧引出暗红色血性液 550 ml, 右侧 600 ml, 胸水涂片未见致病菌。次日胸腔镜探查未见活动出血。术后热峰 39.0 ~ 39.8 °C, 特点同前,

左大腿伤口缝线处有较多脓性分泌物溢出, 分泌物培养见金黄色葡萄球菌生长, 予间断拆线加皮条引流, 根据药物敏感实验加用泰能, 但疗效欠佳, 白细胞 $(13.6 \sim 20.2) \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.89 ~ 0.95。入院后第 13 d 行左膝关节离断术, 术后 Hb 70 g/L, 每日输注压积红细胞 2 U, Hb 波动在 55 ~ 65 g/L。反复行血、胸水、分泌物细菌培养均为 (-), 先后给予泰能、万古霉素、克林霉素、马斯平、大扶康等多种抗生素, 均对热型无影响。患者精神可, 胃纳好, 二便调。第 19 d 敞开创口引流, 患者出现剧烈寒战, 气促, 体温 40.6 °C, 动脉血氧饱和度 (SaO₂) 0.86。静脉推注地塞米松、吗啡等无效; 遂充分切开清创, 冲出较多脓性血水及陈旧血块, 症状很快缓解, 送检分泌物及血培养为 (-)。其后每日伤口清创引流, 热峰渐降。复查患肢无骨髓炎 X 线征。第 21 d Hb 61 g/L, 输注压积红细胞 3 U 后, 次日复查 Hb 85 g/L, 其后未再输血, Hb 稳定在 77 g/L 以上。第 24 d 未再发热, 转出 ICU。

2 讨论

本例患者发热出现在创伤后数小时, 呈弛张热, 热峰的时间性明显, 经多次血、胸水和伤口分泌物细菌培养, 除 1 次分泌物培养外, 均无细菌生长, 使用

多种抗生素, 均对热型无干扰。充分切开引流清除坏死物质后, 发热逐步自行缓解, 说明仅从分泌物培养阴性结果并不能完全代表真正的致病菌, 发热是创伤性全身炎症反应综合征 (SIRS)、机体释放大炎症介质的结果。

SIRS 是创伤、休克、感染等并发多器官功能障碍综合征 (MODS) 的中间环节, 其实是大量细胞因子以及炎性介质引起的体内非特异性炎症。在 SIRS 及 MODS 过程中, 骨髓是最敏感、反应最早的器官之一, 即骨髓增生抑制效应^[1], SIRS 水平愈重, 对骨髓的抑制作用愈强。本例贫血呈重度改变, 持续恒定于低水平, 且不受输血制品的影响^[2], 随着 SIRS 被阻断才有效纠正, 在排除其他疾病可能性后, 显然是骨髓抑制的结果。胸腔积血归因于 SIRS 介导的损伤部位微血管渗漏。

参考文献:

- 1 汤大明, 张红金, 景炳文, 等. 血小板在危重病患者全身炎症反应监测中的意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 35 - 37.
- 2 毛居卫, 陈德昌, 景炳文, 等. 骨髓象在 SIRS 和 MODS 中临床意义的分析 [J]. 中国急救医学, 2001, 21: 592.

(收稿日期: 2005 - 03 - 29)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 528400 广东省中山市中医院 ICU

作者简介: 侯杰 (1966 -), 男 (汉族), 河南省永城县人, 副主任医师。