

雌性性早熟大鼠下丘脑、垂体褪黑素受体表达的变化

周巧利, 石 星, 倪世宁, 顾 威, 朱子阳, 刘倩琦, 王 旭*

(南京医科大学附属南京儿童医院内分泌科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:通过研究雌性性早熟大鼠血浆褪黑素(melatonin, MT)水平,下丘脑、垂体 MT 受体 MT1、MT2 表达,探讨 MT 及 MT 受体在性发育启动和性早熟中的作用。方法:正常 26 日龄雌性 SD 大鼠 40 只,随机分为性早熟组、性早熟干预组、生理盐水对照组,后者又分为青春前期组和青春期组。使用 N-甲基-DL-天冬氨酸(NMA)建立雌性性早熟大鼠模型,促性腺激素释放激素(GnRH)类似物(曲谱瑞林)干预性早熟,通过酶联免疫法检测各组大鼠夜间血浆 MT 促黄体生成素(LH)水平,实时定量 PCR 法检测下丘脑、垂体 GnRH、MT1、MT2 mRNA 表达。结果:各组大鼠夜间血浆 MT 水平无明显差异,性早熟组下丘脑及垂体 MT1 mRNA 表达水平均低于青春前期组,差异具有统计学意义,与正常发育的青春期组比较无明显差异。与性早熟组相比,性早熟干预组下丘脑、垂体 MT1 mRNA 表达均升高,差异有统计学意义。下丘脑、垂体 MT2 表达各组间无差异。结论:雌性性早熟大鼠下丘脑、垂体 MT1 表达减少,GnRH 类似物可上调 MT1 的表达。MT 受体在青春期发育中可能起抑制性作用,通过下丘脑、垂体的 MT 受体表达的减少,减弱对中枢的抑制作用,参与正常青春发育或性早熟过程。

[关键词] 性早熟;褪黑素;褪黑素受体;促性腺激素释放激素;大鼠

[中图分类号] Q575.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-172-05

doi: 10.7655/NYDXBNS0130206

Expression of melatonin receptor in the hypothalamus and pituitary of female rats with precocious puberty

Zhou Qiaoli, Shi Xing, Ni Shining, Gu Wei, Zhu Ziyang, Liu Qianqi, Wang Xu*

(Department of Pediatric Endocrinology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of melatonin and melatonin receptors on the onset of the puberty by observing the plasma concentration of melatonin and melatonin receptors (MT1, MT2) of hypothalamus and pituitary in precocious puberty female rats. **Methods:** A total of 40 26-day-old female SD rats were divided into the precocious puberty group (A), the treated group (B) and the control groups including the prepuberty group (C1) and the normal puberty group (C2). N-methyl-DL-aspartic acid (NMA) was used to establish precocious puberty female rat model. GnRH analog (Triptorelin) were used to treat precocious puberty. The nocturnal plasma melatonin and luteinizing hormone (LH) level were assayed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the expressions of melatonin receptors (MT1, MT2) and GnRH mRNA were conducted in hypothalamus and pituitary by real time-PCR. **Results:** There was no significant difference in the plasma melatonin level in each group. The expression of MT1 mRNA of rat hypothalamus and pituitary in the group A was significantly lower than in the group B and C1, and similar with the group C2. Each group showed no significant differences in the expressions of MT2 of hypothalamus and pituitary. **Conclusion:** The expressions of MT1 mRNA decreased in precocious puberty female rats. GnRH analog may upregulate the expression of MT1 mRNA in hypothalamus and pituitary. The inhibitory effects of melatonin may decline due to the decreased expression of melatonin receptors in the central nervous system by decrease the expression of melatonin receptor in the hypothalamus. Melatonin and its receptors may participate in normal puberty or precocious puberty.

[Key words] precocious puberty; melatonin; melatonin receptor; GnRH; rat

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 172-176]

[基金项目] 南京市卫生局科技发展青年基金(QYK09161)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 65572858@qq.com

青春期是个体由儿童向成年人过渡的时期,由下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴活化引起^[1]。当HPG轴提前发动引起促性腺激素释放激素(GnRH)脉冲分泌频率和振幅增加,青春发育提前启动,引起性早熟^[2]。特发性中枢性性早熟(idiopathic central precocious puberty, ICPP),占女孩性早熟的69%~98%,是与正常青春发育类同的HPG轴提前发动、成熟的程序性过程。过早的青春发育,缩短了骨骼在青春前期的线性生长,骨骺过早过快融合,导致成年身高减低。目前性早熟的发生率不断增高,给儿童造成较大的身心损害,已成为社会和家关注的焦点^[3-4]。

目前治疗儿童ICPP的首选药物是GnRH类似物,它通过持续的非脉冲形式作用于垂体,下调其GnRH受体或降低GnRH受体敏感性,抑制垂体分泌促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)从而抑制了性发育的启动和进展^[5]。下丘脑GnRH分泌的调控是性发育启动的关键,GnRH脉冲分泌增加引起性发育启动的具体机制目前尚不清楚。研究发现多种基因及神经递质参与调控GnRH神经元活性和青春发育启动^[6-9]。

松果体分泌的褪黑素(melatonin, MT)为抑制性神经递质,与MT受体MT1和MT2结合,抑制HPG轴各个水平发挥作用^[10]。有研究表明中枢性性早熟女童血清MT水平降低,而促性腺激素分泌不足所致性功能减低的男性患者MT分泌增加^[11-12]。MT可抑制雌性大鼠性发育过程中LH分泌,延缓性发育启动。本研究通过建立雌性性早熟大鼠模型,并应用GnRH类似物曲谱瑞林干预性早熟,观察不同发育状态下大鼠血浆MT与LH水平的相关性以及下丘脑、垂体MT受体MT1、MT2 mRNA的变化,旨在探讨MT及其受体在性发育启动以及性早熟中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择健康成熟的SD大鼠,体重300~400g,由南京医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(苏)2008-0004。饲养条件为室温20~26℃,每日固定光照时间12h(5:00~17:00)。大鼠按雌、雄比例2:1在18:00时合笼交配,通过观察阴栓结合阴道涂片方法判断雌鼠受孕妊娠,待仔鼠出生,选出雌仔鼠,每窝8只,不足者用该亲母鼠所生的雄仔鼠凑足,亲母鼠哺乳喂养,21日龄断奶,并取出雄鼠。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组

雌性仔鼠在与母鼠相同的饲养条件下自由生长到26日龄,每窝内雌仔鼠随机分为性早熟组(A)、干预组(B)以及生理盐水对照组,后者分为青春前期组(C1)和青春期组(C2),每组10只。自26日龄至阴道口开放,A组大鼠每日14:00时和16:00时颈背部皮下各注射N-甲基-DL-天门冬氨酸(NMA,美国Sigma公司)40mg/kg,B组除皮下注射NMA(方法和剂量同A组),同时还皮下注射曲谱瑞林(达必佳,德国Ferring GmbH公司)100μg/d。而C1组和C2组同时分别皮下注射生理盐水0.2ml。自给药起,每日观察各组大鼠阴道口开放情况,自阴道开口起,每日上午8:00时行阴道细胞涂片观察动情周期的出现和变化,并于第1个动情间期出现当日晚24:00时将动物处死,并按1:1比例同时处死同窝内B组和C1组大鼠。C2组大鼠阴道开口后,在出现第1个动情间期当日晚24:00时处死。处死前称重,10%水合氯醛麻醉后打开胸腔,心脏穿刺采血收集于EDTA抗凝管,分离血浆,-80℃保存。分离双侧卵巢,称量其湿重后置于10%福尔马林溶液固定。断头处死后迅速分离下丘脑、垂体,-80℃保存。

1.2.2 子宫、卵巢指数和黄体数

根据器官指数=器官湿重/体重,计算子宫、卵巢指数。单侧(左侧)卵巢常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察各组大鼠黄体的出现情况。

1.2.3 血浆MT、LH水平测定

离心分离血浆,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定夜间血浆MT及LH水平,MT及LH检测试剂盒购于英国Abcam公司,批间误差<5%。

1.2.4 实时定量PCR分析下丘脑、垂体GnRH、MT1、MT2、mRNA的表达水平

采用TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)一步法提取各组下丘脑及垂体总RNA,GnRH、MT1、MT2引物和内参GADPH引物均由上海英潍捷基公司合成。反转录试剂盒和PCR试剂为德国Roche公司产品,用ABI 7500 Real-time PCR system进行PCR扩增,按试剂步骤,每个样本取总RNA 1μg,用20μl反应体系反转录合成,再以cDNA模板进行扩增,反应体系为25μl。用循环阈值(circle threshold, CT)表示各基因相对表达水平,以GADPH作为内参,计算各样本GnRH、MT1、MT2相对表达水平 ΔCT ,以C1组大鼠下丘脑和垂体 ΔCT 为参照因子,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$,即为各组大鼠相对C1组大鼠各基因表达的数量倍数关系。

1.3 统计学分析

使用 SPSS18.0 统计软件, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 并用 LSD 法进行组间两两比较。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫、卵巢指数和黄体数比较

A 组大鼠阴道口开启和第 1 个动情间期出现的时间较 C2 组提前 (P < 0.05, 表 1), B 组和 C1 组处

死时阴道口均未开口。A 组和 C2 组大鼠子宫指数、卵巢指数、卵巢黄体数比较均无显著性差异, 但均大于 B 组和 C1 组 (P < 0.05, 表 1), B 组和 C1 组之间比较, 无明显差异。

2.2 血浆 MT、LH 水平

A 组血浆 LH 水平高于 B 组和 C1 组 (P < 0.05, 表 1), 而与 C2 组比较无显著性差异, B 组和 C1 组比较, 差别无统计学意义。MT 分泌存在昼低夜高节律性, 夜间 (00:00) 达到高峰, 各组大鼠夜间血浆 MT 水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05, 图 1)。

表 1 各组大鼠下丘脑-垂体-性腺发育水平比较情况

Table 1 Levels of hypothalamic-pituitary-gonadal development in each group

组别	n	VO(d)	D ₁ (d)	子宫指数(×10 ⁻³)	卵巢指数(×10 ⁻⁴)	黄体数(个)	LH(mIU/ml)	GnRH mRNA (2 ^{-ΔΔCT})
A	10	31.20±0.63 ^Δ	33.00±0.66 ^Δ	2.43±0.04*#	4.69±0.43*#	6.10±1.10	5.97±0.48*#	1.91±0.43*#
B1	10			1.45±0.04	3.29±0.13		4.91±0.38	1.25±0.19
C1	10			1.44±0.05	3.29±0.26		4.76±0.32	1.04±0.30
C2	10	35.00±1.15	37.10±1.19	2.38±0.07*#	3.92±0.70*#	6.10±1.43	6.10±0.36*#	1.69±0.49*#

VO: 阴道口开启时间; D₁: 第 1 个动情间期出现时间。与 B 组比较, *P < 0.05; 与 C1 组比较, #P < 0.05; 与 C2 组比较, ΔP < 0.05。

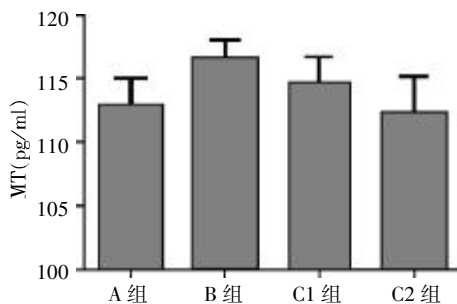
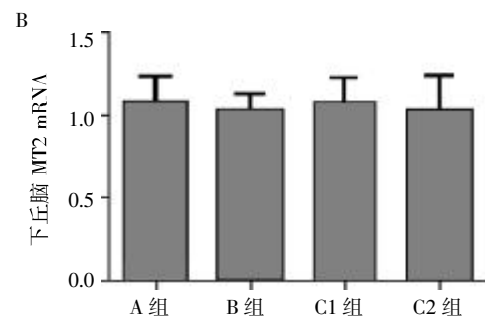
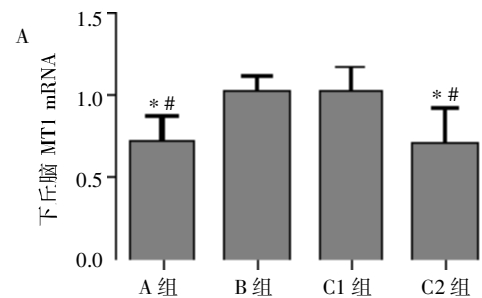


图 1 各组大鼠夜间血浆 MT 水平比较

Figure 1 Nocturnal plasma melatonin levels in each group

2.3 下丘脑 GnRH、MT1、MT2 以及垂体 MT1、MT2 表达

A 组、C2 组下丘脑 GnRH 的表达没有差异性, 但均高于 B 组和 C1 组 (P < 0.05, 表 1)。A 组下丘脑及垂体 MT1 mRNA 表达水平均低于 C1 组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05, 图 2、3), 与 C2 组比较无明显差异。与 A 组相比, B 组下丘脑、垂体 MT1 mRNA 表达均升高 (P < 0.05, 图 2、3)。下丘脑、垂体 MT2 的表达各组间无差异 (图 2、3)。



与 B 组比较, *P < 0.05; 与 C1 组比较, #P < 0.05。

图 2 各组大鼠下丘脑 MT1 mRNA (A)、MT2 mRNA (B) 表达水平

Figure 2 Expressions of MT1、MT2 mRNA in hypothalamus of each group

3 讨论

MT 由松果体合成分泌, 具有昼低夜高的节律性, 其主要通过作用于 G 蛋白偶联的 MT 受体 MT1 和 MT2 下调下丘脑 GnRH mRNA 表达^[13]。触发青春发育启动的机制目前尚不清楚, 可能有多种物质

参与, 包括抑制性信号和刺激性信号, 随个体发育抑制信号逐渐减弱, 刺激信号增强, 最终导致 GnRH 神经元活化而增加 GnRH 分泌。ICPP 可能是由于控制青春发育启动的神经内分泌因子功能紊乱引起抑制

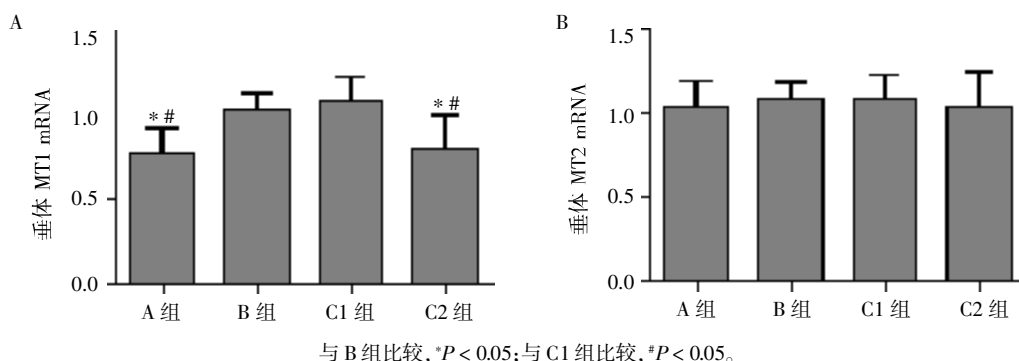


图3 各组大鼠垂体 MT1 mRNA(A)、MT2 mRNA(B) 表达水平
Figure 3 Expressions of MT1、MT2 mRNA in pituitary of each group

性和刺激性信号间整合失衡所致^[14]。国外有文献报道中枢性性早熟儿童夜间血 MT 和性发育水平相关,在 1~5 岁性早熟儿童中,血 MT 水平明显低于年龄相当的正常对照组,且与正常青春组无差异^[11]。而在促性腺激素分泌不足所致性腺功能减低以及青春发育延迟的男性患者,夜间 MT 平均水平显著高于正常对照组,低睾酮促性腺激素分泌过多患者的 MT 分泌减少,表明促性腺激素和性腺激素对 MT 的分泌均有调节作用,该研究也显示 MT 和 LH 的节律没有相关性,MT 可能不在下丘脑-垂体水平发挥作用^[12]。用 GnRH 类似物抑制垂体-性腺轴,并未增加性早熟儿童夜间血清 MT 水平,正常青春组血清 MT 水平的下降可能不依赖于促性腺激素或性激素^[11]。由此可见 MT 在性早熟发展中起重要作用,尽管对其作用尚且存在争论。

MT 可能通过抑制雌性大鼠下丘脑 GnRH 的合成和释放以及降低垂体对 GnRH 的反应性,抑制达那唑诱导的 HPG 轴功能的提前启动^[15]。蛋白激酶 A(PKA)途径、蛋白激酶 C(PKC)途径以及有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号途径的活化参与了 MT 及 MT 受体介导的对 GnRH 神经元的抑制作用^[6,13]。有研究表明 MT 受体随大鼠发育渐减少直至在成年鼠逐渐消失,MT 对垂体促性腺细胞的作用具有年龄依赖性,提示其可能参与性发育的启动^[10]。已有研究表明,MT、MT 受体在性发育启动及过程中发挥重要的抑制作用,但直接研究结果尚少。

本研究予 26 日龄雌性 SD 大鼠皮下注射 NMA,其阴道口开启和第 1 个动情间期出现的时间明显提前,子宫指数、卵巢指数、卵巢黄体数、血浆 LH 水平、下丘脑 GnRH 表达显著升高,表明 HPG 轴启动,成功建立了性早熟动物模型。同时予 GnRH 类似物曲谱瑞林抑制性早熟,结果表明其可抑制

HPG 轴提前启动,干预组大鼠处于青春前期状态。本研究结果显示青春前期,性早熟、正常青春期以及 GnRH 类似物引起的青春未发育状态雌性大鼠夜间血浆 MT 水平并没有显著差异。国外研究报道儿童夜间血 MT 水平随年龄进展而逐渐降低,血 MT 随青春发育进展呈下降趋势^[16]。本研究显示大鼠夜间 MT 峰值差异尽管无统计学差异,但性早熟组与青春组 MT 水平较青春发育未启动的青春前期组、性早熟干预组大鼠有下降趋势,MT 峰值的下降或许参与触发 HPG 轴启动,但不是主要激活因素。MT 浓度的下降是否触发或仅是反映 HPG 轴的中枢成熟,仍需进一步证明。

定量 PCR 显示性早熟组及正常青春组大鼠下丘脑、垂体 MT 受体 MT1 表达较青春前期组降低,而 MT2 各组间无明显差异,表明 MT1 表达减少在性发育启动及性早熟中起活化作用。体外实验 GT1-7 细胞(下丘脑 GnRH 神经元细胞模型)研究中,MT 抑制 GT1-7 细胞 GnRH 基因表达和分泌,MT 受体拮抗剂可以阻断 MT 的作用,进一步表明 MT 通过与 MT 受体特异性结合对 GnRH 分泌发挥调节作用^[6]。GnRH 通过自分泌和旁分泌下调了 GT1-7 细胞上的 MT1 的表达,GnRH 拮抗剂(西曲瑞林)以剂量和时间依赖的方式增加 MT1 的表达而阻断 GnRH 的作用。通过曲谱瑞林作用的性早熟干预组,其性发育水平基本处于青春前期状态,下丘脑、垂体 MT1 表达较性早熟组增高,GnRH 类似物减少了下丘脑 GnRH 神经元分泌内源性 GnRH 而增加了 MT1 表达^[17]。另有研究显示,MT 与垂体特异性高亲和力的膜受体结合而发挥作用,4~8 日龄大鼠,MT 抑制了 50%~60%GnRH 诱导的 LH 释放,而在 10 日龄后 MT 的抑制作用逐渐减弱,21 日龄的垂体细胞对 MT 几乎无反应性,可能与垂体 MT 受体的表达逐渐下降有关^[18]。下丘脑可能是 MT 拮抗内分泌

生殖轴的主要靶器官。本研究发现不同性发育状态下 MT2 表达无显著差异性,提示 MT2 在性发育启动中可能不发挥主要作用。

本研究表明 MT 受体与 HPG 轴的成熟具有相关性,主要是 MT1 在青春发育启动中起重要作用,通过下丘脑、垂体的 MT 受体表达的减少,减弱对中枢启动的抑制而参与正常青春发育和性早熟发生过程。有研究表明子宫、卵巢组织存在 MT 受体表达,在正常青春发育及性早熟发生中 MT 及 MT 受体在性腺水平表达是否变化及其作用需进一步研究证明。血 MT 浓度下降是否参与正常青春发育启动和性早熟的发生或仅是反映 HPG 轴的中枢成熟,性早熟儿童血 MT 水平的检测能否作为判断性早熟的参考指标,MT 及其受体对 HPG 轴的作用及具体的神经内分泌机制,均有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Kakarla N,Bradshaw KD. Disorders of pubertal development;precocious puberty[J]. *Semin Reprod Med*,2003,21(4):339-351
- [2] Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited[J]. *Horm Res*,2002,57 (Suppl 2):2-14
- [3] Cesario SK,Hughes LA. Precocious puberty;a comprehensive review of literature[J]. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*,2007,36(3):263-274
- [4] Cisternino M,Arrigo T,Pasquino AM,et al. Etiology and age incidence of precocious puberty in girls;a multicentric study[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*,2000,13(Suppl 1):695-701
- [5] Bajpai A,Menon PS. Contemporary issues in precocious puberty[J]. *Indian J Endocrinol Metab*,2011,15 (Suppl 3):S172-S179
- [6] Roy D,Belsham DD. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms [J]. *J Biol Chem*,2002,277(1):251-258
- [7] Clarkson J,Herbison AE. Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2006,254-255:32-38
- [8] Katz N,Mazer NA. The impact of opioids on the endocrine system[J]. *Clin J Pain*,2009,25(2):170-175
- [9] Kurian JR,Keen KL,Guerriero KA,et al. Tonic control of kisspeptin release in prepubertal monkeys;implications to the mechanism of puberty onset[J]. *Endocrinology*,2012,153(7):3331-3336
- [10] Ishii H,Tanaka N,Kobayashi M,et al. Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors[J]. *J Physiol Sci*,2009,59(1):37-47
- [11] Waldhauser F,Boepple PA,Schemper M,et al. Serum melatonin in central precocious puberty is lower than in age-matched prepubertal children[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,1991,73(4):793-796
- [12] Luboshitzky R,Lavi S,Thuma I,et al. Nocturnal secretory patterns of melatonin,luteinizing hormone,prolactin and cortisol in male patients with gonadotropin-releasing hormone deficiency[J]. *J Pineal Res*,1996,21(1):49-54
- [13] Kelestimur H,Ozcan M,Kacar E,et al. Melatonin elicits protein kinase C-mediated calcium response in immortalized GT1-7 GnRH neurons[J]. *Brain Res*,2012,1435:24-28
- [14] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 中枢性(真性)性早熟诊治指南[J]. *中华儿科杂志*,2007,45(6):426-427
- [15] 李伶俐,林汉华,陈晓娟,等. 外源性褪黑素水平对雌性性早熟大鼠的影响[J]. *实用儿科临床杂志*,2007,22(20):1539-1541
- [16] Salti R,Galluzzi F,Bindi G,et al. Nocturnal melatonin patterns in children[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2000,85(6):2137-2144
- [17] Ishii H,Sato S,Yin C,et al. Cetrorelix,a gonadotropin-releasing hormone antagonist,induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7[J]. *Neuroendocrinology*,2009,90(3):251-259
- [18] Johnston JD,Message S,Ebling FJ,et al. Gonadotropin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(5):2831-2835

[收稿日期] 2012-09-15