

电针对青春期前后大鼠下丘脑 NPY 表达的影响

卢 静¹,丁贵鹏²,王雪松²,仲远明¹,崔毓桂²,张朝晖^{1*}⁽¹南京医科大学第一附属医院针灸科,江苏 南京 210029;²南京医科大学第一附属医院生殖医学中心实验室,江苏 南京 210036)

[摘要] 目的:电针(EA)对青春发育早期正常大鼠下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)具有显著降调节作用。为揭示该效应的内在机制,本研究观察了电针后不同发育阶段大鼠下丘脑神经肽 Y(NPY)表达的作用,以确定 NPY 是否是抑制 GnRH 释放调控的重要因素之一。方法:在 4 个不同发育阶段,分别给予电针穴位组和电针非穴位组大鼠以低频电针(3 Hz)持续治疗 10 d,每天 20 min。10 d 后,测定下丘脑 NPY 的表达。结果:电针穴位组青春发育早期大鼠下丘脑 NPY 的表达显著低于空白组($P < 0.05$);与大鼠下丘脑 GnRH 表达的变化相比,电针穴位组青春发育早期大鼠下丘脑 NPY 表达与 GnRH 表达的变化呈同向波动趋势;而 NPY 表达的下降不影响大鼠体重的增加。结论:低频电针可有效下调青春发育早期正常大鼠下丘脑 NPY 的表达,推测 NPY 不是大鼠青春发育早期下丘脑 GnRH 释放调控的关键因素。

[关键词] 电针;下丘脑-垂体;神经肽 Y(NPY);大鼠

[中图分类号] R338.27

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1214-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130908

Effects of electro-acupuncture on expression of neuropeptide Y in hypothalamus of rats during pubertal development

Lu Jing¹, Ding Guipeng², Wang Xuesong², Zhong Yuanming¹, Cui Yuyui², Zhang Zhaohui^{1*}⁽¹Department of Acupuncture, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Center of Clinical Reproductive Medicine, State Key Laboratory of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210036, China)

[Abstract] **Objective:** To confirm if neuropeptide Y (NPY) is one of the most important factors in regulating GnRH release.

Methods: In this study, we investigated the change of NPY expression in hypothalamus of common rats treated with the repeated EA at different developmental stages. Low frequency EA(3 Hz) was performed at acupoints(treatment groups) or non-acupoints (control groups) for 20 min daily for 10 days in Sprague-Dawley (SD) rats at four developmental stages, which were juvenile stage, early puberty stage, later puberty stage and adult stage. NPY expression in the hypothalamus was determined after 10-day treatment.

Results: The results showed that NPY expression in the early pubertal group(EPG) was significantly depressed after repeated EA($P < 0.05$). Compared with the results of GnRH expression and body weights, the change of NPY expression was similar with the fluctuation of GnRH expression after EA and the increase of body weights of rats was not influenced by the depression of NPY expression after EA during early puberty. **Conclusion:** The results demonstrated that repeated low frequency EA was an effective method on down-regulating NPY expression in the hypothalamus and we inferred that NPY was not the key role on regulating GnRH release in hypothalamus of common rats at early puberty stage.

[Key words] electro-acupuncture; hypothalamus-pituitary; NPY; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1214-1219]

[基金项目] 江苏省 135 医学重点人才项目(RC2002076)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: z1356@126.com

下丘脑神经肽(NPY)是由 36 个氨基酸残基组成的多肽,属胰多肽家族,在调节生殖系统功能方面,尤其是下丘脑-垂体-性腺(HPG)的水平起重要作用。下丘脑中,49%~64%的 NPY 起源于弓状核

(ARC), 并与位于下丘脑内侧视前区的促性腺激素释放激素(GnRH)神经元紧密联系^[1]。因此, NPY 可能直接调节 GnRH 和黄体生成素(LH)的分泌, 以及 HPG 轴的功能。此外, NPY 是重要的中转站, 可以介导 Alarin 增强下丘脑 GnRH 以及 LH 释放的效应^[2]。本课题组前期的研究显示, 持续的电针刺激可以下调青春期 HPG 轴的水平, 尤其是下丘脑 GnRH 的表达^[3]、血清睾酮(T)和精子量^[4]。因此猜测: NPY 在持续低频电针刺激下调青春期大鼠下丘脑 HPG 轴的水平中起关键作用。为了验证这一假说, 本研究检测了大鼠^[3-4]下丘脑中 NPY 的表达; 并分析其与大鼠下丘脑 GnRH 表达、体重的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

不同年龄段 SD 大鼠 218 只, 雌、雄各半, 购自南京医科大学实验动物中心, 于南京医科大学附属第一医院实验动物中心饲养。饲养条件为室温 $\pm 25^{\circ}\text{C}$, 湿度 65%~70%, 每日自然光照, 正常饮食喂养。

TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国), 随机引物 (Oligo-dT primers)、逆转录酶(M-MLV reverse transcriptase)、RNA 抑制剂 (RNase inhibitor)、Taq 聚合酶(Promega 公司, 美国), SYBR Green PCR 荧光定量试剂盒 (Applied Biosystems 公司, 美国), RT-PCR 与实时定量 PCR 引物由上海申能博彩生物有限公司合成。

GB6805-I 电针电麻仪 (青岛鑫升实业有限公司), 分光光度计 ULTROSPEC 2000 型 (Pharmacia 公司, 英国), RT-PCR 仪 PTC-200 型 (MJ 公司, 美国), 凝胶成像分析系统 Epi Chemi II Darkroom (UVP 公司, 美国), 实时定量 PCR 仪 ABI PRISM7000 型 (ABI 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

根据大鼠的出生时间和体重将实验大鼠分为幼年期(JG: 出生后 25 d; 体重 70~80 g)、青春发育早期(EPG: 出生后 35 d; 体重 120~135 g); 青春发育后期(LPG: 出生后 50 d; 体重 160~210 g)、成年期(AG: 出生后 60 d; 体重 215~265 g)^[4]; 各年龄段大鼠雌雄各半; 分别将各年龄段大鼠再随机分为电针穴位组(EWA)、电针非穴位组(ENA)、捆绑组(IC)与空白组(NC)(表 1)。

1.2.2 治疗与处置

选取大鼠百会、命门、肾俞(双)、太溪(双)穴^[4],

表 1 实验动物分组

Table 1 Grouping of the experimental animals (n)

	JG	EPG	LPG	AG
EWA	14	12	20	16
ENA	14	12	20	16
IC	8	8	8	10
NC	16	10	20	14

并由本文作者亲自给予腧穴定位, 以保证穴位的准确性。电针穴位组先予乙醚吸入麻醉, 固定四肢, 在上述穴位处给予电针刺激, 每日 1 次, 每次 20 min, 频率 3 Hz, 输出电压 6 V, 连续治疗 10 d; 电针非穴位组选取体表(侧胸腹部)靠近穴位的 6 个非穴位点, 处理同电针穴位组; 捆绑组先予乙醚吸入麻醉, 仅固定四肢 20 min, 无针刺刺激; 对照组给予大鼠自然光照和自由进食的笼中喂养, 每天给予抓挠刺激。

1.2.3 标本采集与处理

针刺实验 10 d 完毕后快速取脑, 将分离后的下丘脑组织于液氮冻存^[3]。

1.2.4 总 RNA 提取与逆转录(RT)

TRIzol 一步法抽提总 RNA, 加入 75%的冰乙醇, 在 -20°C 冰箱中储存。

逆转录反应: 随机引物 Oligo(dT) 2.0 μl 、RNA 模板 4.0 μl 、DEPC 水 7.5 μl , 混匀, 70°C 作用 5 min, 冰上操作, $5 \times$ Buffer 4.0 μl 、dNTP(10 mmol/L) 1.0 μl 、RNasin(40 U/ μl) 0.5 μl 、M-MLV(200 U/ μl) 1.0 μl , 混匀后, 反应条件: 42°C 作用 60 min, 95°C 作用 10 min, 终止反应。cDNA 模板 4°C 保存。

1.2.5 PCR 扩增

反应体系为: cDNA 模板 4.0 μl 、 MgCl_2 1.5 μl 、dNTPs 2.0 μl 、 $10 \times$ Buffer 2.5 μl 、上下游引物(表 2)各 1.25 μl (10 pmol/L)、Taq 聚合酶 0.25 μl 、 ddH_2O 12.25 μl 。NPY mRNA PCR 循环参数为: 94°C 30 s, 60°C 25 s, 72°C 30 s, 共 40 个循环。 β -actin PCR 循环参数为: 94°C 30 s, 60°C 25 s, 72°C 30 s, 共 25 个循环。

1.2.6 凝胶电泳

所有 RT-PCR 扩增产物 8 μl , 与 2 μl $6 \times$ loading buffer 混合, 经 2%琼脂糖凝胶 110 V 电泳 30 min; 电泳后用美国 UVP 公司的凝胶成像分析系统拍照获取图像并分析。

1.2.7 荧光实时定量 PCR (real-time quantitative PCR)

反应体系为: SYBR Green Mix 10 μl 、cDNA 3.2 μl , 上下游引物各 1 μl 、 ddH_2O 4.8 μl 。NPY

表2 NPY与β-actin引物序列及基因片段长度
Table 2 Sequences of primers and fragment sizes

	引物序列	基因片段长度(bp)
NPY	上游 5'-TGGACTGACCCTCGCTCTA-3'	348
	下游 5'-GGGACAGGCAGACTGTTT-3'	
β-actin	上游 5'-GTCACCCACACTGTGCCCATCT-3'	542
	下游 5'-ACAGAGTACTTGGCTCAGGAG-3'	

mRNA PCR 循环参数为:95℃ 15 s,60℃ 20 s,72℃ 45 s,共45个循环。β-actin PCR 循环参数为:95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,共25个循环。

1.3 统计学方法

所有结果以均值 ± 标准误表示,运用SPSS13.0统计学软件,使用单因素方差分析(One way-ANOVA)进行统计学比较,P≤0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测大鼠下丘脑中 NPY 的表达

以 NPY mRNA 和 β-actin 引物进行 RT-PCR 扩增的 DNA 片段分别为 348 bp(图 1A~D)和 542 bp(图 1E)。如图所示,幼年期大鼠各组 NPY 的表达均较弱(图 1A);而青春发育早期各组 NPY 的表达均最强(图 1B),其余两个年龄段大鼠各组下丘脑 NPY 的表达介于幼年期和青春发育早期之间(图 1C、D)。

2.2 qPCR 检测大鼠下丘脑中 NPY 的表达

通过研究相对值(ΔCt=Ct_{NPY}-Ct_{β-actin})可知,青春发育早期的大鼠,电针穴位组和电针非穴位组下丘脑 NPY 的表达较空白组均有降低(P < 0.05);成年期大鼠,电针穴位组下丘脑 NPY 的表达较捆绑组显著降低(P < 0.05);其他两个年龄段的大鼠,各组之间比较均无统计学差异(P > 0.05)。有趣的是,捆绑组 4 个年龄段大鼠下丘脑 NPY 的 ΔCt 值分别与相

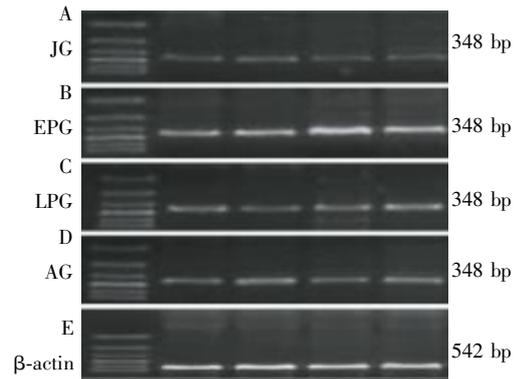


图1 大鼠下丘脑中 NPY 的表达

Figure 1 Expression of NPY in the hypothalamus of rats

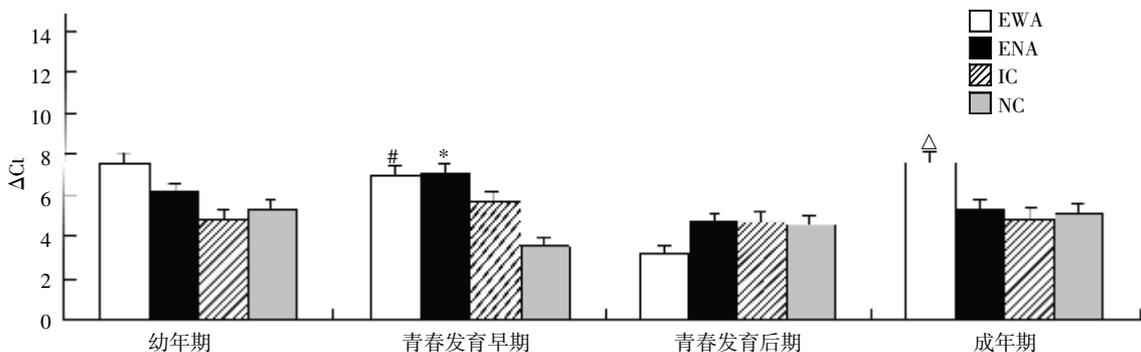
对应年龄段的空白组比较,其差异均无统计学意义(P > 0.05),这表明电针过程中的捆绑对 NPY 的表达无影响。

2.3 下丘脑 NPY 和 GnRH 含量的关系

如图 3 所示,不同年龄段每一组 NPY 的表达几乎都随着 GnRH 含量的变化而变化,这种趋势在 EWA 表现得尤为明显;然而,综观各组大鼠从幼年期到成年期的整个发育阶段,NPY 表达的波动幅度不如 GnRH 剧烈。

2.4 下丘脑 NPY 表达和体重的关系

如图 4 所示,综观各组大鼠从幼年期到成年期的整个发育阶段,体重的改变不随 NPY 表达的变化而变化,尽管在 EWA 和 ENA 中,NPY 的表达在青



EWA 与 NC 比较,*P < 0.05;ENA 与 NC 比较,*P < 0.05;EWA 与 IC 比较,△P < 0.05。

图2 qPCR 检测不同发育阶段大鼠下丘脑 NPY 的表达

Figure 2 qPCR was used to quantitate the expression of NPY in the hypothalamus

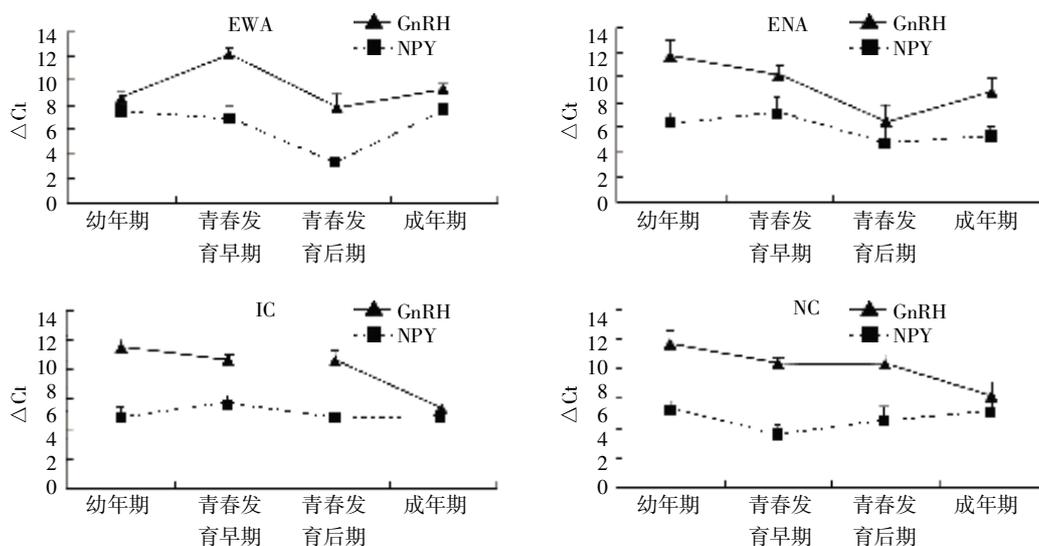


图 3 不同组别大鼠各年龄段下丘脑 NPY 和 GnRH 含量的关系

Figure 3 The relationship between the expression of NPY and GnRH in hypothalamus of rats in four teams at different developmental groups

春发育早期下降明显,但体重增长并未下降。

3 讨论

自从上世纪 80 年代发现 NPY 后,研究者通过各种现代实验手段对 NPY 的作用机制进行了深入

研究。大量报道表明, NPY 是参与能量代谢生理过程的重要物质之一^[5]。由于能量代谢与生殖发育联系紧密,推测持续电针刺激后, NPY 在抑制青春期大鼠下丘脑 GnRH 的分泌过程中扮演了重要角色。

本研究结果表明,青春发育早期的大鼠经持续

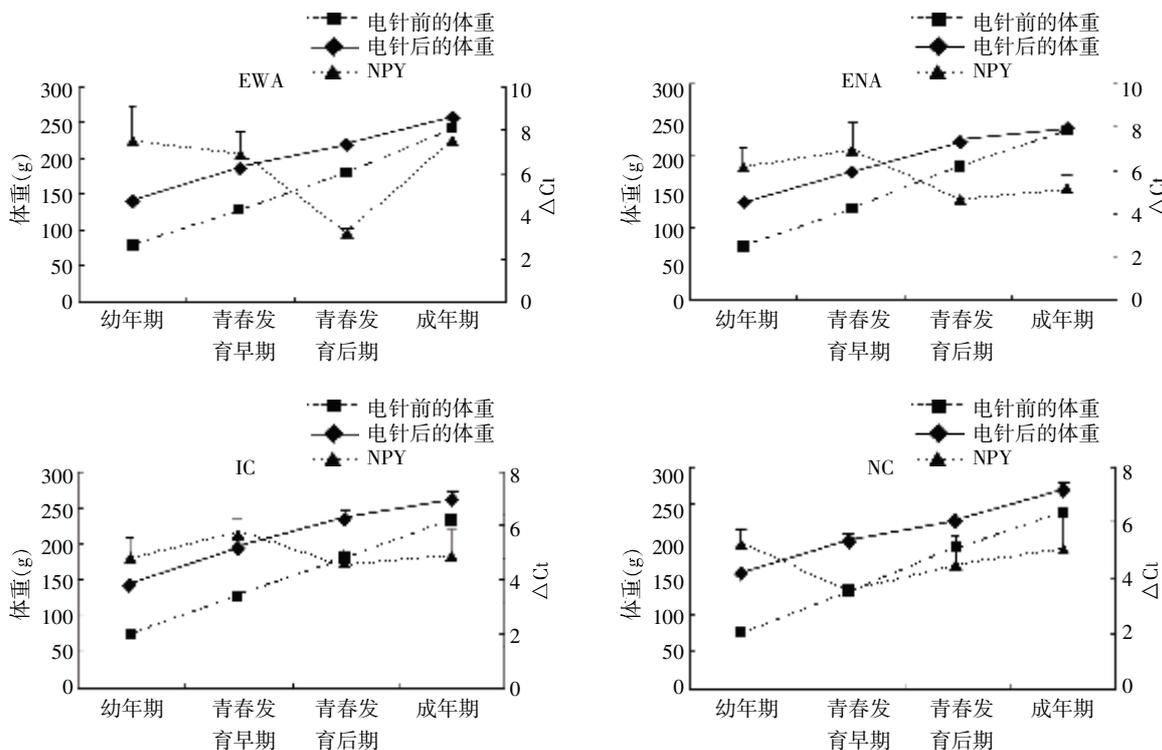


图 4 不同组别大鼠各年龄段下丘脑 NPY 表达和体重的关系

Figure 4 The relationship between the NPY expression and body weights of rats in four teams at different developmental groups

低频电针刺刺激后,下丘脑 NPY 的表达显著降低。已有研究发现电针可双向调节模型大鼠下丘脑中 NPY 的异常表达^[6]与下丘脑 GnRH 的表达^[7-8]。因此,电针的抑制或促进效应取决于 NPY 或 GnRH 本身的水平。本课题组过去^[4]及现有的研究皆表明青春早期大鼠 NPY 及 GnRH 的表达均达到一个高峰,因此,这个表达高峰可被持续低频的电针刺刺激所抑制。

许多研究已发现,被食物受限的模型大鼠,下丘脑中 NPY 的表达显著上升而 GnRH 表达却明显下降,进而影响血中 LH 水平,对机体的生殖功能带来显著影响^[9]。本研究与本课题组先前研究中^[4]下丘脑 GnRH 表达相比较, NPY 表达与 GnRH 表达同步增高或降低,这表明青春发育早期大鼠接受电针刺刺激后 GnRH 表达的降低不是直接由 NPY 介导的。进一步来说, NPY 神经元可能更多地作为一个中转站,传导来自持续电针刺刺激的信号或其他抑制性神经元(如阿立新^[10]、瘦素^[11])的信号。

尽管如此,在幼年期或青春发育后期,进行持续的电针刺刺激并不能显著改变 NPY 的表达,这一特点与本课题组之前研究所阐明的大鼠下丘脑 GnRH 的分泌十分类似^[4]。针对青春发育早期雌性小羊模型的实验表明,脑室内注射(icv)NPY 不能改变血清中 LH 的浓度^[12]。因此,幼年期 NPY 的分泌不会被外界的刺激所影响,因此可能有一个闸门,它可以阻止外界信息干扰 NPY 和 GnRH 分泌的平衡。在青春发育期的启动阶段, GnRH 或 LH 脉冲式释放可以打破这种平衡,在这期间,电针对其有很好的调节作用。同时,在青春发育后期,这种平衡得以再次重建,电针对 NPY 或 GnRH 表达的抑制效应再次减弱。

NPY 还被看做是刺激摄食反应的重要因素之一,在摄食受限和能量消耗降低时, NPY 在维持能量摄入和体重方面扮演了重要角色^[13]。本研究显示,即使在青春发育早期大鼠受持续电针刺刺激后 NPY 表达受到显著抑制,所有组别大鼠的体重也均随年龄增长而稳步增高。这表明青春发育期正常大鼠受持续电针刺刺激后引起的 NPY 表达短暂降低,不能对摄食和能量平衡产生显著影响。

有趣的是,本研究发现青春发育早期, EWA 和 ENA NPY 的表达与 NC 相比都有明显下降,且 EWA 和 ENA 组之间无明显差异;而在成年期, EWA NPY 的表达与 IC 相比下降明显,但 ENA 与 IC 相比无明显统计学差异。这与本课题组先前的研究结果中下丘脑 GnRH 表达的情况非常相似^[4]。相关原因已在先前的文章中详细讨论^[4]。

综上,本研究证明了在青春发育早期,持续低频的电针刺刺激可显著下调正常大鼠下丘脑 NPY 表达的水平,且并不影响大鼠体重的增加。因为 NPY 与 GnRH 表达的波动趋势相似,这有力证明了在青春早期 NPY 神经元可有效传导抑制 GnRH 分泌的信号。本研究亦支持这一观点,即下丘脑肽能代谢系统如 NPY 在对生育能力的调控中不起关键作用^[14]。

[参考文献]

- [1] Turi GF, Liposits Z, Moenter SM, et al. Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice [J]. *Endocrinology*, 2003, 144 (11): 4967-4974
- [2] Boughton CK, Patterson M, Bewick GA. Alarin stimulates food intake and gonadotrophin release in male rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(3): 601-613
- [3] 张朝晖, 崔毓桂, 仲远明, 等. 电针对正常大鼠性发育前后下丘脑 GnRH 释放调控的影响 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(17): 2048-2050
- [4] 张朝晖, 仲远明, 崔毓桂, 等. 电针对性发育期雄性大鼠睾酮和精子发生影响的实验观察 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(4): 500-502, 506
- [5] Nguyen AD, Herzog H, Sainsbury A. Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18(1): 56-60
- [6] Manneras L, Cajander S, Lonn M, et al. Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(4): R1124-R1131
- [7] Feng Y, Johansson J, Shao R, et al. Hypothalamic neuroendocrine functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome: effects of low frequency electro-acupuncture [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6638
- [8] Zhao H, Tian ZZ, Chen BY. Increased corticotropin-releasing hormone release in ovariectomized rats' paraventricular nucleus: effects of electroacupuncture [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 353(1): 37-40
- [9] Kumar S, Kaur G. Intermittent fasting dietary restriction regimen negatively influences reproduction in young rats: a study of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52416
- [10] Kiyokawa M, Matsuzaki T, Iwasa T, et al. Neuropeptide Y mediates orexin A-mediated suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in ovariectomized rats [J]. *J Med Invest*, 2011, 58(1-2): 11-18
- [11] Wojcik-Gładysz A, Nowak KW, Pierzchała-Koziec K, et al.

- Aspects of central and peripheral regulation of reproduction in mammals[J]. *Reprod Biol*, 2006, 6(Suppl 1): 89-103
- [12] Wan'kowska M, Lerrant Y, Wojcik-Gładysz A, et al. Intracerebroventricular infusion of neuropeptide Y up-regulates synthesis and accumulation of luteinizing hormone but not follicle stimulating hormone in the pituitary cells of prepubertal female lambs [J]. *J Chem Neuroanat*, 2002, 23(2): 133-142
- [13] Lee AK, Mojtahed-Jaberi M, Kyriakou T, et al. Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus [J]. *Nutrition*, 2010, 26(4): 411-422
- [14] Ward DR, Dear FM, Ward IA, et al. Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5322
- [收稿日期] 2013-04-19

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,名间加连字符,如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)