

滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠促性腺激素释放激素及其受体 mRNA 表达的影响*

田占庄 赵宏 陈伯英

摘要 目的:观察滋阴泻火中药对达那唑诱导的性早熟模型大鼠下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)和垂体 GnRH 受体 mRNA 表达的影响,探讨滋阴泻火中药的作用机制。方法:将动物分为正常组、模型组、生理盐水组和中药组。模型组、生理盐水组和中药组动物 5 日龄时皮下注射达那唑 300 μ g;中药组在 15 日龄时开始喂饲滋阴泻火中药,生理盐水组同时给予等量的生理盐水。免疫组织化学 ABC 法观察大鼠下丘脑 GnRH 的表达,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)观察下丘脑 GnRHmRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达。结果:和正常组比较,模型组和生理盐水组大鼠阴门开启和建立性周期的时间提前,下丘脑 GnRHmRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达升高,下丘脑 GnRH 免疫阳性神经元减少;中药组大鼠阴门开启和建立性周期的时间延缓,下丘脑 GnRHmRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达降低,下丘脑 GnRH 免疫阳性神经元增多。结论:滋阴泻火中药可能通过抑制下丘脑 GnRH 的合成和释放以及降低垂体对 GnRH 的反应性,抑制提前启动的下丘脑-垂体-性腺轴功能,这可能是滋阴泻火中药治疗性早熟的机理。

关键词 滋阴泻火中药 促性腺激素释放激素 促性腺激素释放激素受体 性早熟

Effect of Chinese Herbal Medicine for Nourishing Yin and Purging Fire on mRNA Expressions of Gonadotropin-releasing Hormone and Its Receptor in Precocious Puberty Model Rats TIAN Zhan-zhuang, ZHAO Hong, CHEN Bo-ying *Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Medical Center, Fudan University, Shanghai (200032)*

Objective: To probe the mechanism of Chinese herbal medicine (CHM) for nourishing Yin and purging Fire on the expressions of gonadotropin-release hormone (GnRH) and its mRNA expression in hypothalamus and GnRH receptor mRNA in pituitary in danazol induced precocious puberty model rats. **Methods:** Rats were divided into the normal group, the model group, the blank control group and the CHM group. Rats, except that in the normal group, were subcutaneously administered danazol 300 μ g at 5 days of age individually and CHM was fed to rats in the CHM group from 15 days of age, in the meantime, normal saline was fed to rats in the blank control group. Expression of GnRH in hypothalamus was observed by immunohistochemical method and expressions of GnRH mRNA in hypothalamus and GnRH receptor mRNA in pituitary were determined by RT-PCR. **Results:** Compared with rats in the normal groups, the vaginal opening and the onset of first estrus were ahead of time, the number of GnRH immunoreactive positive cells decreased and the expressions of GnRH mRNA in hypothalamus and GnRH receptor mRNA in pituitary up-regulated in the model rats and blank control rats. Compared with the model and the blank control groups, in CHM group, all the above-mentioned abnormally changed parameters improved significantly after treatment. **Conclusion:** CHM for nourishing Yin and purging Fire may inhibit the abnormal hyperfunction of hypothalamus-pituitary-ovary axis in precocious puberty rat induced by danazol via reducing the synthesis and release of GnRH, and lowering the responsibility of pituitary cells to GnRH. This may be the primary mechanism of CHM in effectively treating the true precocious puberty.

Key words Chinese herbal medicine for nourishing Yin and purging Fire, precocious puberty, gonadotropin releasing hormone, gonadotropin releasing hormone receptor

* 获国家教委高等学校博士学科点专项科研基金资助(No. 20010246008)

复旦大学上海医学院中西医结合系(上海 200032)

通讯作者 陈伯英, Tel 021-54237693, E-mail zhen-bo-ying@hotmail.com

促性腺激素释放激素(GnRH)是下丘脑分泌的十肽。GnRH 神经元整合各种环境和内部信息,是中枢生殖功能调控的最终共同通路(final common pathway)^[1],在个体生殖发育中起关键性的作用。真性性早熟患儿的下丘脑-垂体-性腺轴(HPGA)的功能提前启动,下丘脑过早分泌大量的 GnRH,血浆促性腺激素卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平显著升高。临床应用滋阴泻火中药治疗儿童性早熟,可使患儿血清 FSH、LH 水平下降,延缓骨骺愈合,明显改善临床症状,取得了较好的疗效^[2]。实验研究发现,滋阴泻火中药可使正常青春发育期大鼠下丘脑 GnRH 含量显著减少,GnRH 释放的频率和幅度明显降低^[3]。但有关滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠 GnRH 及其受体表达的研究尚未见报道。本研究拟采用免疫组织化学和逆转录聚合酶式反应(RT-PCR)方法,在达那唑诱导的大鼠性早熟模型^[4]上,研究滋阴泻火中药对性早熟大鼠下丘脑 GnRH 及垂体 GnRH 受体表达的影响,进一步探讨滋阴泻火中药治疗性早熟的中枢机理。

材料与方 法

1 动物 5 日龄雌性 SD 大鼠,购自复旦大学上海医学院实验动物中心。

2 试剂和药物 达那唑为上海华联制药有限公司产品,每 300 μ g 溶解于 25 μ l 乙二醇/乙醇(1:1)混合液中。TRIzol 购自 Life Technologies 公司。M-MuLV 逆转录酶购自 MBI 公司,Taq 酶、RNAsin 为华美生物工程公司产品,dNTP 及所有引物为上海生物工程公司产品。紫外分光光度计(Beckman DU7500)、凝胶图像分析系统(Syngene);PCR 仪(GeneAmp PCRSystem 9600,Perkin Elmer)。滋阴泻火中药由生地、炙龟版、黄柏、知母等组成,由复旦大学附属儿科医院中药制剂室煎制成浓缩合剂,每毫升约含生药 3g。

3 动物分组及处理 性早熟大鼠模型制备参考文献^[4]方法。动物随机分为正常组、模型组、生理盐水组和中药组。模型组、生理盐水组和中药组大鼠于 5 日龄时每只皮下注射达那唑 300 μ g。大鼠在生后 23 天断奶,25 天起每天检查阴道开口情况。阴道开口后,每天上午定时做阴道涂片,观察雌激素依赖的阴道脱落细胞的周期性变化,直至模型组大鼠建立正常的动情周期。中药组大鼠在 15 日龄时开始用灌胃法喂饲滋阴泻火中药,每只每次 3ml,每天 1 次,直至处死;生理盐水组同时给予等量的生理盐水灌胃。模型组大鼠在动情间期时处死,其他各组动物也同时处死。

4 下丘脑及垂体组织总 RNA 提取 动物断头取脑,分离下丘脑和垂体。TRIzol 一步法提取下丘脑和垂体组织总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在 1.8~20 之间。

5 引物^[5,6] GnRH 上游 ATT CTA CTG ACT TGG TGC GTG,下游 GGA ATA TGT GCA ACT TGG TGT,产物 380bp;GnRH 受体上游 GTA TGC TGG AGA GTT ACT CTG CA,下游 GGA TGA TGA AGA GGC AGC TGA AG,产物 347bp;组蛋白 H3.3 上游 GCA AGA GTG CGC CCT CTA CTG,下游 GGC CTC ACT TGC CTC CTG CAA,产物 213bp。

6 下丘脑 GnRH mRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达 采用 RT-PCR 方法 M-MuLV 逆转录酶催化合成 cDNA 第一链,反应总体积 20 μ l:RNA 模板 2 μ g,下游引物 25pmol,1 \times buffer, dNTPs 2mmol/L, RNAsin20U, M-MuLV 逆转录酶 1 μ l。42 $^{\circ}$ C 反应 40min。PCR 反应总体积 50 μ l,逆转录产物 10 μ l,1 \times buffer,上、下游引物各 25pmol, dNTPs0.2mmol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, Taq 酶 5U。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,62 $^{\circ}$ C(GnRH)或 68 $^{\circ}$ C(GnRH 受体)退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共 30 个循环。

7 RT-PCR 产物的检测 PCR 产物 5 μ l 上样于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,电压 100V。LeicaQ500IW 图像分析系统进行条带光密度分析,经组蛋白 H3.3 校正,得到 GnRH 和 GnRH 受体 mRNA 的相对光密度值。

8 下丘脑 GnRH 表达 采用免疫组织化学 ABC 法 动物麻醉后 4% 中性多聚甲醛灌流固定,取脑,放入含 20% 蔗糖的 4% 多聚甲醛液中固定 24h 后,浸入 30% 蔗糖磷酸缓冲液中,待脑组织完全下沉后,将下丘脑制成 35 μ m 厚的冠状位连续冰冻切片,隔张取片用于 GnRH 免疫组织化学染色。兔抗大鼠 GnRH 多克隆抗体购自 Chemicon 公司,工作浓度 1:2000,4 $^{\circ}$ C 孵育 70h 后,移至 37 $^{\circ}$ C 再孵育 1h。DAB 显色,常规脱水透明,中性树脂封片。分别用正常兔血清和 0.01mol/L PBS 代替一抗作为阴性对照。

根据大鼠脑组织图谱,对内侧隔核、Broca 斜角带核和内侧视前区的阳性细胞进行计数。按 GnRH 细胞表面棘样结构的多寡,将其分为光滑型和棘型^[7]。在高倍镜下(200 \times)确定所有细胞的类型,最后计算各型细胞的构成比。

9 统计学方法 数据统计应用 SPSS 10.0 软件,各均值之间的显著性用双侧 t 检验。

结 果

1 滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠阴门开启和建立性周期时间的影响 正常组大鼠阴门开启的时间为出生后(34.00±0.98)天,出现第1个性周期的时间为(41.26±2.35)天;模型组分别为(25.97±2.24)天和(32.43±0.75)天,比正常组明显提前($P<0.01$)。生理盐水组分别为(24.78±1.04)天和(34.56±0.89)天;中药组大鼠阴门开启时间(32.56±1.32)天,比模型组和生理盐水组显著延迟,被处死时仍未建立性周期。

2 滋阴泻火中药对大鼠下丘脑 GnRH mRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 表达的影响 见图 1、2 和表 1。模型组和生理盐水组大鼠 GnRH mRNA 和 GnRH 受体 mRNA 表达比正常组增强,中药组 GnRH mRNA 和 GnRH 受体 mRNA 表达比模型组和生理盐水组明显降低。

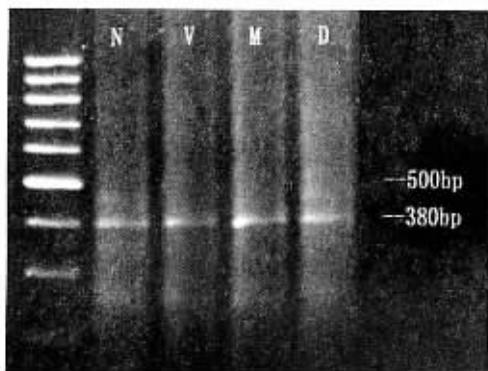


图 1 滋阴泻火中药对大鼠下丘脑 GnRH mRNA 的影响
注: N 为正常组, M 为模型组, S 为生理盐水组, D 为中药组; 下图同

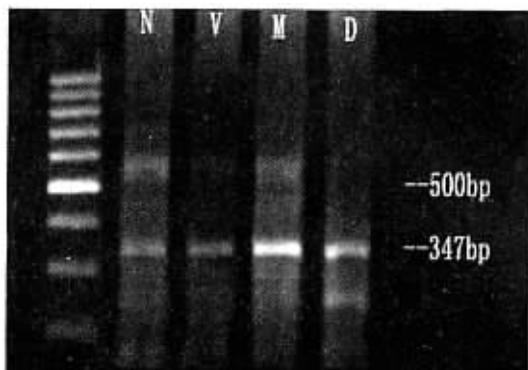


图 2 滋阴泻火中药对大鼠垂体 GnRH 受体 mRNA 表达的影响
万方数据

表 1 滋阴泻火中药对大鼠下丘脑 GnRHmRNA 和垂体 GnRH 受体 mRNA 表达的影响 (相对密度 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	下丘脑 GnRHmRNA 的表达	垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达
正常	10	0.0936±0.008	0.2537±0.1272
模型	10	0.4016±0.079*△	0.5307±0.1685*△
生理盐水	10	0.3989±0.009△	0.5572±0.1260△
中药	10	0.2634±0.0440	0.2120±0.0247

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与中药组比较,△ $P<0.01$

3 滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠下丘脑 GnRH 表达的影响 见表 2。GnRH 阳性细胞主要分布于内侧隔核、Broca 斜角带核以及内侧视前区。模型组大鼠下丘脑 GnRH 免疫阳性细胞数量减少,与正常组比较差异有显著性;中药组大鼠 GnRH 免疫阳性细胞数量增多,和模型组及生理盐水组比较差异有显著性。但各组 GnRH 阳性细胞亚型的构成比差异无显著性。

表 2 滋阴泻火中药对大鼠下丘脑 GnRH 免疫阳性神经元数目的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GnRH 免疫阳性细胞数(个)	细胞构成比(%)	
			光滑型	棘型
正常	5	310.50±52.34	56.86±8.64	43.14±8.46
模型	6	222.00±57.15*△	56.72±6.32	43.28±6.54
生理盐水	5	198.50±43.52△	58.78±8.73	41.22±8.36
中药	6	322.50±34.69	60.03±3.72	39.97±3.71

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与中药组比较,△ $P<0.01$

讨 论

GnRH 在调控哺乳动物性成熟过程中起关键性作用,其合成和释放受多种神经递质、神经肽、细胞因子和性激素等组成的调节系统的调节^[8,9]。在婴幼儿期此调节系统对 HPGA 的功能主要起抑制作用。GnRH 的脉冲式分泌处于低水平^[10-12]。随着个体的生长发育,此调节系统对 GnRH 的抑制性调节减弱,兴奋性调节增强,GnRH 释放的脉冲幅度及频率不断增加^[9]。到青春期中晚期,GnRH 的正反馈调节机制建立,诱发排卵所必须的 LH 峰出现,动物开始排卵,性机能成熟^[11]。如脑内过早分泌大量的 GnRH,HPGA 功能提前发动,生殖器官和性征的发育提前出现,患儿临床表现为性早熟。

长期以来,性早熟的研究多采用处于青春发动期的正常动物^[3]和外源性给予 GnRH 拟似物^[13]的“性早熟”模型。应用这些模型探讨性早熟发病的中枢机制有较大的局限性。Hajime 等^[4]报道给予 5 日龄雌性大鼠皮下注射达那唑 1 次,可诱发大鼠性早熟,是一种比较理想的性早熟模型。

中医学认为性早熟的病机为“肾阴虚而相火旺”,

肾对生殖机能调节障碍。复旦大学附属儿科医院研制的滋阴泻火中药主要由生地、炙龟版、黄柏、知母等组成,在临床上用于治疗性早熟,取得了满意的疗效。患儿服药后血中 FSH、LH 及 E₂ 等激素水平显著下降,生殖器官及性征的发育明显消退,阻断了骨骼的过早愈合^[2]。本研究从现代生物医学的角度,在达那唑诱导的性早熟大鼠模型上,探讨了滋阴泻火中药治疗性早熟的中枢机理。结果表明,滋阴泻火中药可能通过下调下丘脑 GnRHmRNA 的表达,抑制 GnRH 的合成,免疫组化结果表明,下丘脑 GnRH 阳性神经元数目增多,可能滋阴泻火中药也抑制了下丘脑 GnRH 的释放,提示滋阴泻火中药可能有抑制 HPGA 功能过早启动的作用。

Wray 等^[14]发现大鼠出生前 GnRH 神经元以光滑型为主,随着性机能成熟,棘型神经元的比例逐渐增高。棘型神经元的胞体和突起比光滑型者有较多的突触连接^[9],可能接受和整合各种内外信息的传入,其可能参与 GnRH 向正中隆起的脉冲性释放;而光滑型 GnRH 神经元可能参与紧张性的 GnRH 分泌。本研究观察到虽然各组大鼠 GnRH 细胞亚型的构成比没有变化,但模型组大鼠 GnRH 棘型神经元的绝对数目减少,可能由于病理性的 GnRH 脉冲释放增加所致,进而导致 HPGA 功能的提前启动,这可能是性早熟发病的形态学机制。本研究实验结果表明,滋阴泻火中药上调了棘型 GnRH 神经元的数量,从形态学角度提示,滋阴泻火中药可能抑制了下丘脑 GnRH 的释放,抑制了提前启动的 HPGA 功能。

本研究还观察到滋阴泻火中药可下调模型组大鼠异常升高的垂体 GnRH 受体 mRNA 的表达,提示服药后,大鼠垂体前叶细胞对 GnRH 的反应性可能降低,也抑制了 HPGA 的功能,这可能是滋阴泻火中药治疗性早熟的机理之一。

参 考 文 献

- 1 Vincent P. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroend* 2002 ;14(3): 247—255.
- 2 蔡德培,季志英,时毓民. 性早熟女童阴虚火旺证本质的研

- 究. *中国中医基础医学杂志* 1998 ;(增刊):76—78.
- 3 蔡德培,陈伯英,庄振杰. 滋阴泻火中药对下丘脑 GnRH 的合成、分泌及其调节机制的影响. *中国中西医结合杂志* 2001 ;21(8):595—598.
- 4 Hajime M, Mikihiko T, Hajime K, et al. Induction of true precocious puberty by neonatal treatment with danazol in female rats. *Neuroscience Lett* 1993 ;157(1):33—36.
- 5 Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor and interleukin-2 receptor γ -chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 ;84(2):743—750.
- 6 Azad N, La Paglia N, Jurgens KA, et al. Immunoactivation enhances the concentration of luteinizing hormone-releasing hormone peptide and its gene expression in human peripheral T-lymphocytes. *Endocrinology* 1993 ;133(1):215—223.
- 7 Witkin JW. Morphology of LHRH neurons as a function of age and hormone condition in the female rat. *J Neuroendocrin* 1989 ;4(2):344—348.
- 8 Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Rev* 1998 ;19(3):302—330.
- 9 Terasawa E. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. Mechanism of pulsatile LHRH release. *Vitam Horm* 2001 ;53(1):91—129.
- 10 Ojeda SR, Prevot V, Heger S. Regulation of puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2001 ;8(1):154—160.
- 11 Bourguignon JP, Franchimont P. Perbuty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* 1984 ;114(5):1941—1943.
- 12 Witkin JW, Romero MT. Comparison of ultrastructural characteristics of gonadotropin-releasing hormone neurons in prepubertal and adult male rats. *Neuroscience* 1995 ;64(4): 1145—1151.
- 13 Urbanski HF, Ojeda SR. Activation of luteinizing hormone releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology* 1987 ;46(3):273—276.
- 14 Wray S, Hoflman G. Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *J Neuroendocrinology* 1986 ;4(1):93—97.

(收稿 2002-07-10 修回 2002-10-08)