

泌乳期小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中 PrRP 和 PrRP-R mRNA 的表达规律

朱河水,都军霞,韩立强,王月影,王林枫

(河南农业大学 牧医工程学院,农业部动物生长发育调控重点开放实验室,河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**探讨泌乳期小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中催乳素释放肽(PrRP)及其受体(PrRP-R) mRNA 的表达规律,为 PrRP 生理功能的确定奠定基础。**【方法】**选用泌乳 6,12,18 d 小鼠,取下丘脑、垂体、卵巢组织,利用半定量 PCR 方法测定下丘脑、垂体、卵巢中 PrRP、PrRP-R mRNA 的表达水平;同时利用放射免疫法(RIA)测定血浆的孕酮(P)、雌二醇(E₂)和催乳素(PRL)水平,通过双侧相关分析,探究血浆 P、E₂、PRL 水平与下丘脑-垂体-卵巢轴 PrRP、PrRP-R mRNA 表达量的相关关系。**【结果】**泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢中均有 PrRP、PrRP-R mRNA 的表达,其中卵巢的 PrRP mRNA 表达水平最高。泌乳期小鼠血浆 E₂ 水平与卵巢 PrRP mRNA 的表达水平呈显著负相关,而卵巢的 PrRP mRNA 表达水平与垂体的 PrRP-R mRNA 表达水平呈显著正相关。**【结论】**泌乳期小鼠卵巢 PrRP 可能通过垂体间接抑制 E₂ 的分泌,进而调节相关泌乳活动。

[关键词] 催乳素释放肽;表达规律;泌乳期;小鼠

[中图分类号] Q786;S865.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)08-0021-04

Study on expression of mRNA for mouse PrRP and PrRP-R in hypothalamus-pituitary-ovary axis during lactation

ZHU He-shui, DU Jun-xia, HAN Li-qiang, WANG Yue-ying, WANG Lin-feng

(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Key Lab of Regulation on Animal Growth and Development of Agricultural Ministry, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】** The research was made to investigate the function and expression of PrRP and PrRP-R mRNA in hypothalamus-pituitary-ovary axis during lactation. **【Method】** Hypothalamus, pituitary and ovary were sampled on 6, 12 and 18 d of lactation respectively for determination of PrRP and PrRP-R mRNA expression levels in these tissues by semi-RT-PCR. Simultaneously, plasma concentration of progesterone(P), estrogen(E₂) and prolactin(PRL) were measured by RIA. Corelation between PrRP, PrRP-R mRNA and plasma P, E₂ and PRL were analyzed to investigate the relations among them. **【Result】** During lactation, hypothalamus, pituitary and ovary all showed PrRP and PrRP-R mRNA expression. Ovary had the highest PrRP mRNA level. Plasma E₂ had significant negative correlation with ovary PrRP mRNA and ovary PrRP mRNA had significant positive correlation with pituitary PrRP-R mRNA. **【Conclusion】** Ovary PrRP might indirectly inhibit the secretion of E₂ by feedback on pituitary.

Key words: prolactin-releasing peptide; expression rule; lactation; mouse

催乳素释放肽(Prolactin-releasing peptide, PrRP)是一种哺乳类 RF 肽,其肽链 C 端含有特殊

的 RF-NH₂ 结构,为孤儿受体 GPR-10 的配体^[1]。早期的研究还认为,PrRP 为下丘脑分泌催乳素的正

* [收稿日期] 2010-01-15

[基金项目] 国家“十一五”科技攻关项目(2006BAD04A03-10)

[作者简介] 朱河水(1975—),男,河南确山人,讲师,博士,主要从事动物泌乳生理研究。E-mail: zhuhehui@163.com

向调控因子^[1]。但近年来的研究表明,PrRP 不但有调节催乳素的作用,而且还参与机体内很多生理活动(如摄食、睡眠、应激等)的调节^[2-4],所以关于 PrRP 的确切生理功能,还有待于进一步探讨和研究。探究 PrRP 及其受体(PrRP-R)mRNA 在体内的分布有助于 PrRP 功能的确定,但目前尚没有关于不同泌乳阶段 PrRP、PrRP-R mRNA 在体内系统表达的研究报道。本研究采用半定量 PCR 方法,探讨了不同泌乳阶段 PrRP、PrRP-R mRNA 在下丘脑、垂体、卵巢中的表达规律及其与血浆孕酮(Progesterone,P)、催乳素(Prolactin,PRL)、雌二醇(Estrogen,E₂)水平的相关性,以期为进一步确定 PrRP 的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 30 日龄昆明种小鼠,购自河南省实验动物中心。采用阴道涂片法,连续观察小鼠 2 个情期,以确定发情周期。发情前 1 d 下午,将雌

雄小鼠按 2 : 1 的比例放入同一笼中交配。第 2 天早上采用观察阴道栓法判断是否受精。分娩当天记作泌乳 0 d,依此类推。

1.1.2 试剂及仪器 RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂等,购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司。使用的主要仪器有 PCR 仪(GeneAMP PCR System 9700,美国)、凝胶成像分析系统(MultimageTM Light,美国)、电泳仪(DYY-12,中国)。

1.1.3 引物设计与合成 依据 GenBank 中 PrRP (FJ424613)、PrRP-R (BC125651)、GAPDH (XM_001476723.1)的序列,利用 DNASTar4.0 软件设计引物,具体见表 1。引物由 TaKaRa 宝生物工程有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 样品采集 将试验小鼠分为 3 组,每组 6 只。分别在泌乳初期(L6,泌乳 6 d)、泌乳中期(L12,泌乳 12 d)、泌乳晚期(L18,泌乳 18 d)上午 9:00 处死,取下丘脑、垂体、卵巢组织,同时采取血液,制备血浆。

表 1 PCR 引物的序列及其参数

Table 1 Primers sequence and parameter for PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	位置/bp Position
PrRP	Forward:GACGTGGCTTCTGTGCTTGCTG	62	12~33
	Reverse:GCAGCACTGTCTTCTCGAGCTG		273~252
PrRP-R	Forward:CTGGCCATCCTCCTGTCTTAC	51	715~735
	Reverse:GTCCAGGTCTCGCAATAG		912~895
GAPDH	Forward:ACCACAGTCCATGCCATCAC	57	434~453
	Reverse:TCCACCACCTGTTGCTGTA		885~866

1.2.2 激素水平的测定 血浆 P、E₂、PRL 水平用放射免疫法测定,放免试剂盒由北京东雅科美生物技术公司生产。PRL 和 P 反应灵敏度≤1.0 ng/mL,E₂ 反应灵敏度≤3.0 pg/mL;三者精密度同为:批内 CV<10%,批间 CV<15%;线形 |r|≥0.99。

1.2.3 半定量 PCR 按照常规方法提取下丘脑、垂体、卵巢组织 RNA,并进行反转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL(其中 cDNA 1 μL,PCR Master mix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 μL,上、下游引物各 1 μL)。反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 20 s,不同退火温度下退火 20 s,72 ℃ 20 s,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。

分别取 PCR GAPDH、PrRP、PrRP-R 的扩增产物 5 μL,加荧光染料,室温避光反应 10 min,上样于琼脂糖凝胶,100 V 电泳 40 min。凝胶成像分析系统照相,以 GAPDH 作为内对照,检测不同时期小

鼠下丘脑、垂体、卵巢中 PrRP、PrRP-R mRNA 的表达情况。

1.2.4 资料统计方法 应用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析、作图,各组数据均用“平均值±标准差”表示,组间比较采用 One-Way ANOVA S-N-K 方法分析。运用 Pearson bivariate correlation 进行双侧相关分析,以 P<0.05 和 P<0.01 作为统计学差异的标准。

2 结果与分析

2.1 泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢中的 PrRP、PrRP-R mRNA 表达水平和血浆激素水平

泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢中的 PrRP 和 PrRP-R mRNA 表达水平及血浆的 P、PRL、E₂ 水平见表 2。由表 2 可知,泌乳期小鼠卵巢的 PrRP mRNA 表达水平最高,极显著高于下丘脑、垂体的表达水平(P<0.01)。泌乳期下丘脑、垂体、卵巢 PrRP-R mRNA 的表达水平分别为 0.19,0.24,0.25,三者

之间差异不显著($P>0.05$)。

表 2 泌乳期小鼠组织中的 PrRP、PrRP-R mRNA 的表达水平和血浆激素水平的比较
Table 2 Expression of tissure PrRP,PrRP-R mRNA and plasma hormones during lactation

组别 Group	PrRP			PrRP-R mRNA			激素/(ng·mL ⁻¹) Hormones		
	下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	卵巢 Ovary	下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	卵巢 Ovary	催乳素 PRL	孕酮 P	雌二醇 E ₂
L6	0.21±0.18	0.12±0.09	0.38±0.14	0.65±0.26	0.23±0.09	0.24±0.09	8.90±2.90	2.13±1.06	0.12±0.01
L12	0.25±0.06	0.16±0.05	0.41±0.16	0.25±0.08	0.37±0.11	0.25±0.07	9.62±0.85	2.46±0.55	0.15±0.10
L18	0.15±0.03	0.13±0.04	0.18±0.06	0.16±0.02	0.12±0.70	0.26±0.07	7.76±1.26	2.30±0.79	0.16±0.04
SD	0.20±0.11 B	0.14±0.06 B	0.32±0.16 A	0.19±0.08 a	0.24±0.14 a	0.25±0.75 a	8.76±1.94	2.30±0.79	0.14±0.03

注:同栏同行数据后标不同大写字母表示差异极显著,标不同小写字母表示差异显著。
Note:Different capital letters represent extremley marked difference and lower letters represent marked difference in same column and row.

2.2 泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢中的 PrRP、PrRP-R mRNA 及血浆激素之间的相关性
运用 Pearson bivariate correlation 对泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢中的 PrRP、PrRP-R mRNA 表达水平和血浆 P、PRL、E₂ 水平进行双侧相关分析,结果见表 3。

表 3 泌乳期小鼠组织中 PrRP、PrRP-R mRNA 和血浆激素间的相关分析
Table 3 Correlation between PrRP,PrRP-R mRNA and plasma hormones during lactation

	项目 Item	PrRP mRNA		
		下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	卵巢 Ovary
PrRP-R mRNA	下丘脑 Hypothalamus	0.395	0.324	0.127
	垂体 Pituitary	0.038	−0.068	0.500 *
	卵巢 Ovary	−0.093	−0.089	0.140
激素 Hormones	催乳素 PRL	0.007	0.174	−0.020
	孕酮 P	−0.313	−0.007	0.002
	雌二醇 E ₂	−0.031	−0.085	−0.489 *

注: * 表示显著相关($P<0.05$)。
Note: * Correlation is significant at the 0.05 level.

由表 3 可知,泌乳期小鼠垂体 PrRP-R mRNA 的表达水平与卵巢的 PrRP 表达水平呈显著正相关($r=0.500,P<0.05$),同时小鼠血浆 E₂ 水平与卵巢的 PrRP 表达水平呈显著负相关($P<0.05$)。血浆 P 水平与卵巢的 PrRP 表达水平呈正相关关系,而与下丘脑、垂体的 PrRP 水平呈负相关关系,但其相关性均不显著($P>0.05$)。血浆 PRL 水平与下丘脑、垂体的 PrRP 表达水平呈正相关关系,而与卵巢的 PrRP 表达水平呈负相关关系,但其相关性也不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 PrRP mRNA 在下丘脑、垂体、卵巢中的表达规律

早期研究发现,下丘脑中 PrRP mRNA 表达水平比较高的位置是背内侧核、腹内侧核,而其他区域的表达较少^[5]。PrRP mRNA 在垂体中的表达较弱^[6],只在神经垂体中含有少量的 PrRP 神经纤维^[7]。有研究发现,其在外周组织,如小肠^[8]、肝^[6]、肾^[6]、睾丸^[6]、肾上腺^[9]、胰腺^[10]中也有表达。

就不同时期下丘脑 PrRP mRNA 表达水平的变化而言,有研究表明,出生 6 d 大鼠仔鼠的下丘脑中就开始有 PrRP 神经纤维的分布,其分布特点与成年大鼠类似;出生 13 d 大鼠仔鼠的下丘脑中开始有 PrRP mRNA 的表达^[11]。泌乳期和非泌乳期大鼠下丘脑区域的 PrRP 表达没有明显变化^[5]。

本研究发现,泌乳期小鼠下丘脑、垂体、卵巢组织中均有 PrRP mRNA 的表达,其中卵巢的表达水平极显著高于下丘脑和垂体 ($P<0.01$),提示卵巢 PrRP 可能通过调控相关性激素的分泌进而影响泌乳活动。

3.2 PrRP-R mRNA 在下丘脑、垂体、卵巢中的表达规律

在 PrRP-R 的研究方面,据 Ibata 等^[12]报道,大鼠垂体前叶和脑中的许多部位都有 PrRP-R mRNA 的表达,其中表达丰度较高的部位是垂体。另外在肾上腺^[13]、睾丸和附睾^[14]中也有 PrRP-R mRNA 的表达。Nieminen 等^[6]报道,在发育 14 d 胚胎至出生这段时期内,PrRP-R mRNA 在大鼠肾上腺中有稳定的表达,在垂体中的表达较弱。另有研究表明,

雌性大鼠 PrRP-R 的表达水平高于雄性大鼠,但泌乳大鼠和非泌乳大鼠之间差异不显著^[15]。

本研究发现,PrRP-R mRNA 除在下丘脑、垂体中表达外,在卵巢中也有 PrRP-R mRNA 的表达。

3.3 PrRP 与血浆激素 E₂ 的关系

在 PrRP 和血浆 E₂ 的相互关系方面,有研究表明,体内的 E₂ 水平影响 PrRP 与受体的亲和力^[16-17]。本研究发现,泌乳期小鼠血浆的 E₂ 表达水平较低,其与卵巢 PrRP 的表达水平呈显著负相关($r=-0.489, P<0.05$),而卵巢的 PrRP 表达水平与垂体的 PrRP-R 表达水平呈显著正相关,该结果提示,泌乳期内卵巢 PrRP 可能通过垂体间接抑制卵巢的分泌活动,如 E₂ 的分泌,进而影响泌乳相关生理如乳腺的发育等,但其确切机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Hinuma S, Habata Y, Fujii R, et al. A prolactin-releasing peptide in the brain [J]. *Nature*, 1998, 393(6682): 272-276.

[2] Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, et al. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(12): 4014-4024.

[3] Zhang S Q, Kimura M, Inoue S. Effects of prolactin-releasing peptide (PrRP) on sleep regulation in rats [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2000, 54(3): 262-264.

[4] Mera T, Fujihara H, Kawasaki M, et al. Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of stress responses in the brain through the hypothalamic paraventricular nucleus [J]. *Neuroscience*, 2006, 141(2): 1069-1086.

[5] Iijima N, Kataoka Y, Kakiyama K, et al. Cytochemical study of prolactin-releasing peptide (PrRP) in the rat brain [J]. *Neuroreport*, 1999, 10(8): 1713-1716.

[6] Nieminen M L, Nystedt J, Panula P. Expression of neuropeptide FF, prolactin-releasing peptide, and the receptor *UHR1/GPR10* genes during embryogenesis in the rat [J]. *Dev Dyn*, 2003, 226(3): 561-569.

[7] Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, et al. Immunocyto-

chemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(5): 2326-2333.

[8] Roland B L, Sutton S W, Wilson S J, et al. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5736-5745.

[9] Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, et al. Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland [J]. *Regul Pept*, 2005, 126(1/2): 97-102.

[10] Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, et al. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor [J]. *Regul Pept*, 1999, 83(1): 1-10.

[11] Yano T, Iijima N, Kataoka Y, et al. Developmental expression of prolactin releasing peptide in the rat brain: localization of messenger ribonucleic acid and immunoreactive neurons [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 128(2): 101-111.

[12] Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, et al. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain [J]. *Neurosci Res*, 2000, 38(3): 223-230.

[13] Takahashi K, Totsune K, Murakami O, et al. Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas [J]. *Peptides*, 2002, 23(6): 1135-1140.

[14] Nieminen M L, Brandt A, Pietila P, et al. Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat [J]. *Peptides*, 2000, 21(11): 1695-1701.

[15] Jarry H, Heuer H, Schomburg L, et al. Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release *in vivo* [J]. *Neuroendocrinology*, 2000, 71(4): 262-267.

[16] Kawamata Y, Fujii R, Fukusumi S, et al. Analyses for susceptibility of rat anterior pituitary cells to prolactin-releasing peptide [J]. *Endocrine*, 2000, 12(3): 215-221.

[17] Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, et al. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(2): 321-324.