

Ghrelin 对雌性大鼠促性腺激素分泌及其 mRNA 表达的影响

王 琳,方富贵,章孝荣,刘 亚,张运海,陶 勇,李运生,曹鸿国

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

【摘 要】【目的】探明 Ghrelin 在中枢水平上对雌性大鼠促性腺激素分泌及其 mRNA 表达的影响。【方法】用 1 nmol Ghrelin 对不同发情周期(发情前期、发情期、发情后期、间情期)雌性大鼠及用不同剂量(0.3, 1 和 3 nmol)Ghrelin 对发情后期雌性大鼠分别进行侧脑室注射,15 min 后断头采血,离心血清,同时采集脑垂体,采用酶免法测定血清促黄体素(LH)、促卵泡素(FSH)的质量浓度,用实时荧光定量 PCR 法检测 LH mRNA、FSH mRNA 在垂体中的表达。【结果】①在发情前期和间情期,Ghrelin 可显著抑制雌性大鼠 LH 的分泌和 LH mRNA 的表达($P<0.05$);Ghrelin 对整个发情周期中 FSH 的分泌不产生影响,仅在发情期抑制 FSH mRNA 的表达($P<0.05$)。②在发情后期,0.3 和 1 nmol 的 Ghrelin 对大鼠促性腺激素分泌和 mRNA 表达均无影响,但 3 nmol 的 Ghrelin 可显著抑制 LH、FSH 的分泌和 LH mRNA 的表达($P<0.05$)。【结论】Ghrelin 在中枢水平上对 FSH、LH 的释放及 FSH mRNA 和 LH mRNA 的表达均有抑制作用,但存在一定的剂量差异,并受发情周期的调节。

【关键词】 Ghrelin;大鼠;促黄体素;促卵泡素

【中图分类号】 Q786;S865.1⁺2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)09-0020-05

Effect of Ghrelin on the secretion of LH,FSH and LH mRNA, FSH mRNA expression in female rat

WANG Lin,FANG Fu-gui,ZHANG Xiao-rong,LIU Ya,ZHANG Yun-hai,
TAO Yong,LI Yun-sheng,CAO Hong-guo

(College of Animal Science and Technology,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China)

Abstract: 【Objective】The study was done in order to verify the effect of ghrelin on gonadotropin secretion and mRNA expression at the central level in rats.【Method】Female rats with different estrous cycles (proestrus,estrus,metestrus,diestrus) were treated using 1 nmol ghrelin,the rats at metestrus were administrated with 0.3 nmol,1 nmol,3 nmol ghrelin by intracerebroventricular injection respectively. All animals were humanely killed by decapitation 15 minutes after the injection. The blood and the pituitary were collected for determinations. The concentration and mRNA expression of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone(FSH) were determined with enzyme-linked immunosorbent(ELISA)and real-time quantitative PCR respectively.【Result】①Ghrelin could significantly inhibit the secretion and mRNA expression of LH during the estrus and diestrus ($P<0.05$),but was unable to modify FSH secretion during estrous cycle. However,ghrelin can significantly inhibit FSH mRNA expression during estrus ($P<0.05$).②During the metestrus,0.3 nmol,1 nmol ghrelin could not affect the secretion and mRNA expression of gonadotropin,ghrelin significantly inhibited the secretion of LH and FSH and the expression of

* [收稿日期] 2010-02-02

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(070411015)

[作者简介] 王 琳(1972—),男,安徽枞阳人,在读博士,主要从事动物生殖内分泌研究。

[通信作者] 章孝荣(1954—),男,安徽枞阳人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

LH mRNA at the dose of 3 nmol ($P<0.05$).【Conclusion】 Ghrelin could inhibit the secretion and mRNA expression of FSH and LH ($P<0.05$), but it was regulated by the dose and the phase of estrous cycle.

Key words: Ghrelin; rat; luteinizing hormone (LH); follicle-stimulating hormone (FSH)

Ghrelin 是 Kojima 等^[1]于 1999 年发现的一种多肽,其由 28 个氨基酸残基组成,为生长素促分泌素受体(Growth hormone secretagogue, GHS-R)的内源性配基,其 N 端第 3 位的丝氨酸残基上有 *n*-辛酰基化基团,该基团对维持 Ghrelin 自身生物活性是必需的,去 N 端辛酰基化后,则其会失去生物活性^[2]。Ghrelin 分布在大鼠等多种动物的中枢神经系统和外周组织器官中,如下丘脑、垂体、卵巢、睾丸等^[3],它不仅能促进生长激素(Growth hormone, GH)分泌,而且在摄食、能量代谢以及血液动力学等方面也发挥着重要作用。越来越多的证据表明, Ghrelin 在生殖轴的不同层次影响着动物的生殖,其中对激素的分泌有着十分重要的作用。Furuta 等^[4]最早报道,向切除卵巢的雌性大鼠脑室内注射 Ghrelin 能抑制 LH 的波动。Fernandez-Fernandez 等^[5]报道,脑室内注射 Ghrelin 能抑制初情期前雄性大鼠促黄体素(Luteinizing hormone, LH)的分泌,对性腺摘除的雌雄大鼠的 LH 分泌亦有抑制作用,但对促卵泡素(Follicle-stimulating hormone, FSH)的分泌不产生影响。Fernandez-Fernandez 等^[6]报道,在体外, Ghrelin 可抑制促性腺激素释放激素(Gonadotrophin releasing hormone, GnRH)刺激的不同发情周期大鼠垂体细胞释放 LH,而仅在发情期抑制 GnRH 刺激的垂体细胞释放 FSH。到目前为止,已有关于 Ghrelin 对激素影响的文献报道,但未见关于其对促性腺激素 mRNA 表达的影响的报道,有关 Ghrelin 对促性腺激素分泌的作用规律及其与促性腺激素基因表达的内在联系仍不清楚。为此,本试验系统地研究了 Ghrelin 对促性腺激素分泌及对促性腺激素 mRNA 表达的影响,以期为进一步探索 Ghrelin 在中枢水平对生殖激素分泌的调控机制提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物的分组与处理

1.1.1 试验动物 120 日龄 SD 雌性大鼠((254±22) mg)72 只,购自安徽医科大学实验动物中心,于室温(22~25℃)饲养,自由摄食与饮水。

1.1.2 试验试剂及主要仪器设备 大鼠促黄体生成素(A6020),促卵泡激素(6021)ELISA 试剂盒,购

自上海西唐生物科技有限公司; Ghrelin(G8903), 购自 Sigma 公司; SYBR Premix Ex Taq™ (DRR041A), 购自大连宝生物工程有限公司; TransScript First-Strand cDNA Synthesis Super Mix. (AT301)、RNA 提取试剂(TransZol, ET101),购自北京全式金生物技术有限公司。另外还有定量 PCR 仪(Rotor-Gene 6000)、Corbett Life Science(Australia)。

1.1.3 动物分组及处理 参照张森等^[7]对发情周期的判断标准,对供试大鼠进行阴道涂片观察,判断其发情周期,在大鼠显示 2 个连续 4 天的发情周期后。对处于不同发情周期的雌性大鼠用 1 mL 质量分数为 1%的戊巴比妥钠麻醉,于立体定位仪上固定。每个发情周期取 12 只大鼠,随机分为试验组和对照组,每组 6 只,对处于不同发情周期的试验组雌性大鼠侧脑室注射 1 nmol Ghrelin,相应对照组大鼠侧脑室注射等量生理盐水,注射剂量均为 2 μL/只。同时,对发情后期大鼠,分别设置 3 个 Ghrelin 剂量组(0.3, 1 和 3 nmol)和对照组(生理盐水),进行侧脑室注射,每组 6 只,剂量均为 2 μL/只。

1.2 样本的采集

于大鼠注射 Ghrelin 15 min 后,断头采血,4℃离心,收集血清,-20℃保存待测。同时取大鼠脑垂体,于-80℃保存用于 mRNA 的定量分析。

1.3 血清促性腺激素浓度的测定

用酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清样品中 LH 和 FSH 的质量浓度。LH 和 FSH 的 ELISA 检测试剂盒购自美国 ADI 公司,其板内、板间变异系数均小于 10%,灵敏度分别为 0.8 和 1 ng/mL。

1.4 实时荧光定量 PCR

以 β actin 基因为内参基因,对 LH、FSH 进行实时荧光定量 PCR 检测。

1.4.1 总 RNA 的提取和反转录 按照 TransZol 试剂盒说明书抽提大鼠脑垂体总 mRNA,按反转录试剂盒的操作说明进行反转录反应。反应体系为 20 μL,其中有 2 μL 总 RNA,1 μL Anchored Oligo(dT)18, 10 μL 2×TS Reaction Mix, 6 μL Rnase-free Water, 1 μL TransScript RT Enzyme Mix。反

应条件为:42 ℃ 孵育 50 min,70 ℃ 加热 15 min ,反
转录产物于-20 ℃ 保存待用。

1.4.2 引物的设计与合成 $\beta actin$ 的引物序列参
照文献[8]中的序列,即上游引物序列为 5'-CAG
CCT TCC TTC CTG GGT ATG-3',下游引物序列
为 5'-TAG AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3',扩
增片段的长度为 182 bp。参考美国国立生物技术信
息中心(NCBI)数据库中 SD 大鼠的 LH(U25803)
和 FSH(BC168724)的 mRNA 序列,利用 Primer
5.0设计 LH、FSH 引物。所得 LH 上游引物序列为
5'-ACC TTC ACC ACC AGC ATC TGT-3',下游
引物序列为 5'-AGC TCA CGG TAG GTG CAC
ACT-3';FSH 上游引物序列为 5'-TAC TTT CTG
GGT GTT TGG-3',下游引物序列为 5'-TCC TAC
TCT GGT GCT TGA-3';扩增片段长度分别为 246 和
164 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4.3 PCR 将总 RNA 反转录获得的 cDNA 进
行连续 10 倍稀释,以各稀释度为模板进行实时荧光
定量 PCR,制作标准曲线和溶解曲线进行反应条件
优化。优化后的反应体系为:上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)
1 μL ,下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,SYBR Premix
Ex Taq TM 12.5 μL ,cDNA 2 μL ,加无核酶水至 25
 μL 。LH 的反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 5
s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,45 个循环;FSH 的反应条
件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 5 s,52 ℃ 20 s,72 ℃
15 s,45 个循环。

1.5 标准品的制备及扩增效率的评价

以总 RNA 反转录的 cDNA 进行连续 10 倍稀

释,以各稀释度为模板,采用上述优化的反应条件,
利用设计合成的引物对 FSH 、 LH 和 $\beta actin$ 基因进
行扩增,分别构建 3 个基因的相对定量标准曲线,并
根据曲线斜率计算各自的 PCR 扩增效率。

1.6 数据统计与分析

所有数据用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用
AVEDEV 进行统计,用配对比较的 t 检验进行差异
显著性分析。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 扩增效率的评价

对 10 倍系列稀释的模板进行实时荧光定量
PCR 反应,构建 3 个基因的相对定量标准曲线,计
算各标准曲线的相关参数。

内参基因 $\beta actin$: $E=1.04$, $M=3.231$, $B=$
 42.962 , $R^2=0.99733$, $R=0.99866$;

LH 基因: $E=1.04$, $M=3.226$, $B=34.320$,
 $R^2=0.99635$, $R=0.99817$;

FSH 基因: $E=1.06$, $M=3.153$, $B=39.665$,
 $R^2=0.99950$, $R=0.99975$ 。上述结果表明,3 种
基因的扩增效率基本一致,可采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值法计算
LH mRNA 和 FSH mRNA 的相对表达量。

2.2 侧脑室注射 Ghrelin 对不同发情周期大鼠
LH、FSH 分泌及其 mRNA 表达的影响

1 nmol Ghrelin 对不同发情周期雌性大鼠血清
LH、FSH 分泌及其 mRNA 表达的影响如图 1、2 所
示。

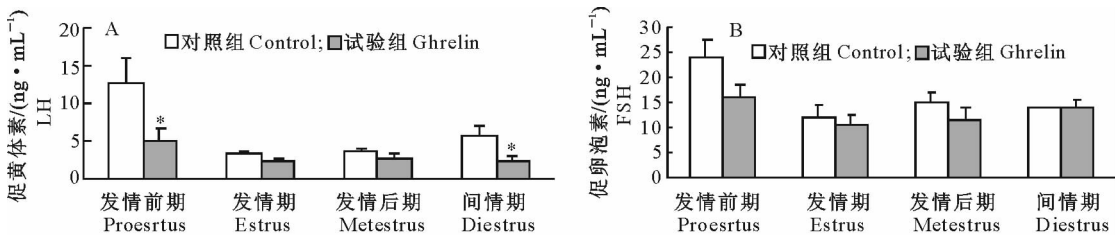


图 1 侧脑室注射 1 nmol Ghrelin 对不同发情周期大鼠血清 LH (A)和 FSH (B)分泌的影响

*. 表示差异显著($P<0.05$),下同

Fig.1 Serum LH (A) and FSH (B) concentration in cyclic female rats after i. c. v injection of Ghrelin (1 nmol)

*. Donates significant differences ($P<0.05$),the follwing is the same

由图 1、2 可知,1 nmol Ghrelin 可显著抑制发
情前期和间情期 LH 的分泌(图 1-A)和 LH mRNA
(图 2-A)的表达($P<0.05$),并不会显著影响整个发
情周期 FSH 的分泌(图 2-A, $P>0.05$),但 1 nmol
Ghrelin 可显著抑制发情期 FSH mRNA 的表达(图

2-B, $P<0.05$)。
2.3 侧脑室注射不同剂量 Ghrelin 对发情后期雌
性大鼠 LH、FSH 分泌及其 mRNA 表达的影响

由表 1 可知,与对照组相比,0.3 和 1 nmol Gh-

relin 在中枢水平并不能显著改变 LH、FSH 的分泌 ($P>0.05$),但 3 nmol Ghrelin 可显著抑制 LH 和 FSH 的分泌($P<0.05$),表明在中枢水平,Ghrelin 能否抑制 LH、FSH 的分泌与其剂量有关。由表 2

可知,0.3 和 1 nmol 的 Ghrelin 对大鼠 LH mRNA 的表达均无影响,3 nmol 的 Ghrelin 能显著抑制 LH mRNA 的表达($P<0.05$);而 0.3,1 和 3 nmol 的 Ghrelin 对 FSH mRNA 的表达均无显著影响。

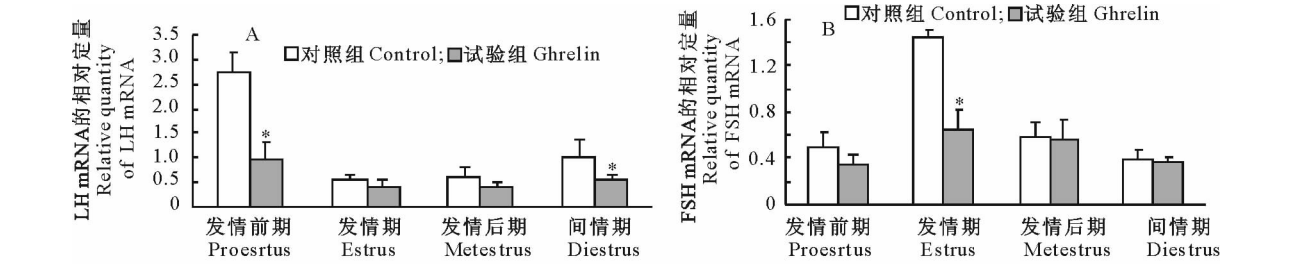


图 2 侧脑室注射 1 nmol Ghrelin 对不同发情周期大鼠垂体 LH mRNA (A)和 FSH mRNA (B)表达的影响
Fig. 2 Expression of LH mRNA (A) and FSH mRNA (B) in pituitaries of cyclic female rats after i. c. v injection of Ghrelin (1 nmol)

表 1 不同剂量 Ghrelin 对发情后期雌性大鼠 LH、FSH 分泌的影响

Table 1 Effect of different doses of Ghrelin on LH, FSH secretion in metestrus rats

组别 Group	Ghrelin 剂量/nmol Dose	促黄体素/ (ng · mL ⁻¹) LH	促卵泡素/ (ng · mL ⁻¹) FSH
对照组 CK	0	5.45±1.56 a	24.73±9.32 a
试验组 Test group	0.3	4.44±1.33 a	16.40±4.65 a
试验组 Test group	1	2.59±0.14 a	14.61±1.30 a
试验组 Test group	3	2.25±0.66 b	11.56±2.48 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: Different lowercase letters in the same array mean extremely significant differences ($P<0.05$). The same with the following table.

表 2 不同剂量 Ghrelin 对发情后期雌性大鼠 LH mRNA、FSH mRNA 表达的影响

Table 2 Effect of different doses of Ghrelin on LH mRNA, FSH mRNA expression in metestrus rats

组别 Group	Ghrelin 剂量/nmol Dose	LH mRNA	FSH mRNA
对照组 CK	0	0.58±0.20 a	1.21±0.40 a
试验组 Test group	0.3	0.51±0.12 a	1.00±0.08 a
试验组 Test group	1	0.56±0.01 a	0.66±0.18 a
试验组 Test group	3	0.35±0.08 b	0.61±0.07 a

2.4 大鼠垂体促性腺激素 mRNA 的表达与血清促性腺激素质量浓度的相关性

相关分析结果(图 3)表明,侧脑室注射 3 nmol Ghrelin 后,垂体 LH mRNA 的表达与血清 LH 的质量浓度成正相关关系($P<0.001,r=0.9604$);而 FSH mRNA 的表达与 FSH 质量浓度之间不存在相关性($P<0.001,r=0.2114$)。

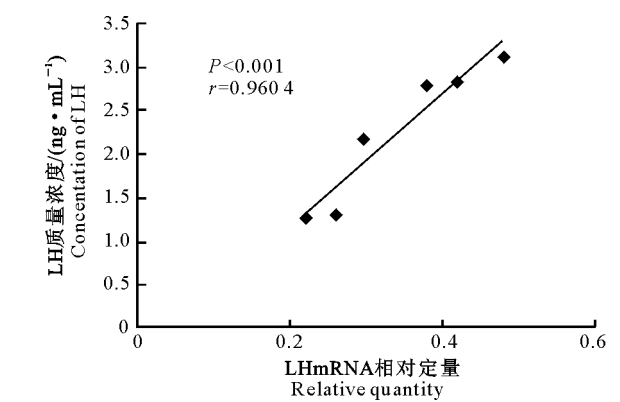


图 3 侧脑室注射 3 nmol Ghrelin 后大鼠血清中 LH 质量浓度与垂体 LH mRNA 表达的相关性
Fig. 3 Relation between serum testosterone LH vs pituitary LH mRNA after the injection of 3 nmol Ghrelin

3 讨论

FSH、LH 是由腺垂体内的嗜碱性细胞合成分泌的,二者的分泌受抑制素、瘦素等因子的调节^[9-10]。Cowley 等^[11]研究发现,在大鼠的垂体中有 Ghrelin 及其功能性受体 GHS-R1a 的表达,表明 Ghrelin 对垂体促性腺激素的分泌及其 mRNA 的表达可能有一定的调控作用。

本试验发现,与对照组相比,Ghrelin 仅在发情前期和间情期抑制 LH 的分泌,在整个发情周期对 FSH 的分泌没有显著影响。Ghrelin 对 LH 的抑制作用,可能与 Ghrelin 的功能性受体 GHS-R1a 在发情期、发情后期大鼠垂体中的表达水平显著下降有关^[6]。但本研究关于 Ghrelin 对 FSH 影响的结论与 Fernandez-Fernandez 等^[6]的报道存在差异,这可能与 Ghrelin 的给药剂量不同有关。最近据 Messi-

ni 等^[12]报道,对月经周期中的妇女静脉注射 Ghrelin,其血液中的 LH、FSH 水平不受 Ghrelin 的影响。但 Kluge 等^[13-14]发现,对成年男性静脉注射 Ghrelin,其可显著抑制血液中的 LH、FSH 水平。现有研究提示,Ghrelin 对 LH、FSH 分泌的影响可能与物种、性别、给药方式和剂量、发情周期等有关。

本研究发现,不同发情周期大鼠脑垂体中的 LH mRNA、FSH mRNA 表达量有一定差异。LH mRNA 表达量在发情期、发情后期较低,在间情期明显上升,到发情前期时达到最大值;FSH mRNA 表达量在发情期较高,其他时期较低,且保持在一个相对稳定的水平。此结果与 Zmeili 等^[15]和 Ortolano 等^[16]的报道相似。但在绵羊中,FSH mRNA 的表达量在排卵前期有所下降^[17],这种差异可能是物种不同所致。与对照相比,侧脑室注射 Ghrelin 后,LH mRNA 在发情前期和间情期差异显著,与 Ghrelin 对不同发情周期大鼠 LH 分泌的影响完全一致,这也进一步解释了 Ghrelin 还可能通过抑制 LH mRNA 的表达,抑制发情前期和间情期大鼠 LH 的释放。同时,Ghrelin 可显著抑制发情期 FSH mRNA 的表达,而此阶段 FSH 的分泌却不受影响,这可能是因为 FSH 的释放还受其他因子的调控,如抑制素、瘦素等^[9-10]。

在研究不同剂量 Ghrelin 对发情后期大鼠 LH、FSH 分泌的影响时发现,3 nmol 的 Ghrelin 可显著抑制 LH、FSH 的分泌,而 0.3 和 1 nmol 的 Ghrelin 对 LH、FSH 的分泌没有影响。表明在中枢水平上,Ghrelin 对 LH、FSH 分泌的影响存在剂量差异。同时,3 nmol 的 Ghrelin 能显著抑制发情后期大鼠 LH mRNA 的表达,但不同浓度的 Ghrelin 均不会显著改变 FSH mRNA 的表达水平。Ghrelin 对 LH mRNA、FSH mRNA 表达的影响存在差异,其原因目前尚不清楚。据报道,促性腺激素释放激素、睾酮、孕酮对 LH mRNA、FSH mRNA 表达的影响也有类似情况出现^[18-20],其原因还有待于进一步研究。通过相关性分析可以看出,侧脑室注射 Ghrelin (3 nmol)后,垂体 LH mRNA 的表达与血清 LH 的质量浓度呈正相关关系。可见,Ghrelin 通过抑制 LH mRNA 的表达来抑制 LH 的分泌。

总之,Ghrelin 在中枢水平上对 LH、FSH 的释放及 LH mRNA 和 FSH mRNA 的表达有抑制作用,且存在一定的剂量限制,并受发情周期的调节。Ghrelin 通过抑制 LH mRNA 的表达来抑制 LH 的分泌;Ghrelin 对 FSH、LH 的分泌及其基因表达的

调控存在差异。

[参考文献]

- [1] Kojima M, Hosoda H, Nalazato M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [2] Broglio F, Arrat E, Benso A, et al. Endocrine activities of cortistatin 14 and its interaction with GHRH and Ghrelin in humans [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3783-3790.
- [3] Gualillo O, Laqo F, Gomez-renio J, et al. Ghrelin, a widespread hormone insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action [J]. *FEBS Letters*, 2003, 552(2/3): 105-109.
- [4] Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288: 780-785.
- [5] Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, et al. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362: 103-107.
- [6] Fernandez-Fernandez R, Tena-semepere M, Victor M, et al. Effects of Ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats, *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Neuroendocrinology*, 2005, 82: 245-255.
- [7] 张森, 王新, 韦旭斌, 等. 大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(2): 69-72.
Zhang S, Wang X, Wei X B, et al. Observation on the vaginal smear photographs for each stage of estrus cycle in rats [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(2): 69-72. (in Chinese)
- [8] Kyung-Sun K, Jeong-Hwan C, Doug-Young R, et al. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid [J]. *Toxicology*, 2002, 64: 227-235.
- [9] Bilezikjian L M, Blount A L, Leal A M, et al. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin [J]. *Molcell Endocrinol*, 2004, 225: 29-36.
- [10] Ogasawara H, Ohwarda S, Nagai Y, et al. Localization of leptin and leptin receptor in the bovine adenohypophysis [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, 35: 8-15.
- [11] Cowley M A, Smith R G, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of Ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis [J]. *Neuron*, 2003, 37: 646-661.
- [12] Messini C I, Dafopoulos K, Chalvatzas N, et al. Effect of Ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle [J]. *Hum Reprod*, 2008, 24: 976-981.
- [13] Kluge M, Schussler P, Uhr M, et al. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(8): 3202-3205.

(下转第 31 页)