

[文章编号] 1007-7669(2009)02-0134-04

曲普瑞林治疗真性性早熟的中枢机制

陈姗姗¹, 俞建², 田占庄³

(1. 上海师范大学生命和环境科学学院, 上海 200234; 2. 复旦大学附属儿科医院, 上海 200032; 3. 复旦大学上海医学院中西医结合系神经生物学教研室, 上海 200032)

[关键词] 曲普瑞林; 青春期, 早熟; 达那唑; 大鼠

[摘要] 目的 观察曲普瑞林对真性性早熟的治疗作用, 并探讨其药理作用的中枢机制。方法 雌性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 分为正常组、模型组和曲普瑞林组。模型组和曲普瑞林组动物 5 日龄时皮下注射达那唑 300 μg ; 曲普瑞林组在 15 日龄时开始给予曲普瑞林 (50 $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ 体重) 肌肉注射, 每 3 wk 一次, 共 2 次。观察 3 组大鼠性周期和动物脏器系数, 并采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测大鼠下丘脑神经肽 Kisspeptin 和 G 蛋白偶联受体 54 (GPR54) mRNA 的表达。结果 与正常组相比, 模型组大鼠阴门开启及建立规律性周期时间均明显提前, 卵巢和子宫的脏器系数也明显增加 ($P < 0.05$); 和模型组相比, 曲普瑞林组大鼠阴门开启及建立规律性周期时间均明显延迟, 卵巢和子宫的脏器系数明显减小 ($P < 0.05$), 而与正常组无明显差异 ($P > 0.05$)。模型组大鼠下丘脑 Kisspeptin 和 GPR54 mRNA 的 D 值为 (0.427 ± 0.008) 和 (0.482 ± 0.021), 高于正常组 [(0.266 ± 0.029) 和 (0.31 ± 0.03)] 和曲普瑞林组 [(0.332 ± 0.019) 和 (0.33 ± 0.03)] ($P < 0.01$), 曲普瑞林组和正常组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 曲普瑞林可抑制性早熟大鼠下丘脑-垂体-性腺轴的过早启动, 其对下丘脑内 Kisspeptin/GPR54 mRNA 表达的抑制可能是其中枢作用机制之一。

[中图分类号] R977.1 [文献标志码] A

Central mechanism of triptorelin therapeutic effects on female precocious puberty in rats

CHEN Shan-shan¹, YU Jian², TIAN Zhan-zhuang³

(1. Life and Environmental Sciences College, Shanghai Normal University, SHANGHAI 200234, China; 2. Children's Hospital, Fudan University, SHANGHAI 200032, China; 3. Department of Integrative Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, SHANGHAI 200032, China)

[KEY WORDS] triptorelin; puberty, precocious; danazol; rats

[ABSTRACT] AIM To observe the central mechanism of the GnRH analog-triptorelin on the precocious puberty female rats induced by danazol, through the pharmacologic detection of the hypothalamic expression of Kisspeptin and its receptor G protein-coupled receptor 54 (GPR54) were detected. METHODS Thirty-six female SD rats at 3 days of age fed in company with their mothers were randomly divided into normal group (N), model group (M), and model with triptorelin treatment group (M + T). The animals in M and M + T at

[收稿日期] 2008-06-23 [接受日期] 2009-01-08

[基金项目] 复旦大学上海医学院基础与临床交叉基金资助

[作者简介] 陈姗姗 (1985—), 女, 上海人, 本科, 主要从事生物工程专业研究。

[通讯作者] 田占庄。E-mail: tianvv@shmu.edu.cn

the postnatal 5th day were given a single dose (300 μg) danazol by subcutaneous injection. At the postnatal 15th days, the rats in M + T were treated by subcutaneous injection of triptorelin (50 $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ body weight) once per three weeks, totally for two times. From the postnatal 25th day, the days of the vaginal opening were recorded and the exfoliative vaginal epithelial cells were examined every day until the establishment of first estrus cycle. The organ coefficients of uterus and ovary in each group were observed. The expression of Kisspeptin/GPR54 mRNA was also detected by means of RT-PCR. RESULTS The days of vaginal opening and establishment of first estrus cycle were advanced, and the organ coefficients of uterus and ovary increased in M than those of N. The days of vaginal opening and the establishment of first estrus cycle were postponed, and the organ coefficients decreased in M + T comparing with those of M, but showing no significant difference with N ($P > 0.05$). The expressions of Kisspeptin and GPR54 mRNA in M ((0.427 \pm 0.008) and (0.482 \pm 0.021)) were higher than those in N ((0.266 \pm 0.029) and (0.31 \pm 0.03)) and M + T ((0.332 \pm 0.019) and (0.33 \pm 0.03)) ($P < 0.01$), but no obvious difference was found between M + T and N ($P > 0.05$). CONCLUSION Triptorelin might inhibit abnormal early startup of hypothalamus-pituitary-gonad axis of precocious puberty rats induced by danazo, to synthesis and release the expression of hypothalamic Kisspeptin/GPR54 mRNA, and thus probably be one of the mechanisms.

性早熟 (precocious puberty) 是一种生长发育异常性疾病, 是儿科常见的内分泌疾病之一。其主要临床表现为下丘脑神经内分泌功能失调, 导致下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamic-pituitary-gonad axis, HPGA) 功能提前启动, 第二性征提早出现, 同时伴有骨骼生长加速、骨骺提前融合等症状和体征。致使成年后身材矮小, 心理和社会适应能力受到影响。下丘脑分泌的促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 是 HPGA 行使功能的始动因素和核心^[1]。

目前多采用 GnRH 类似物药物治疗性早熟, 效果明显, 能有效抑制提前启动的 HPGA 功能^[2,3]。G 蛋白偶联受体 54 (G protein coupled receptor 54, GPR54) 是调控青春期发育的关键分子^[4-6], 为视黄酸家族的 G 蛋白偶联受体, 其内源性配体是由 *Kiss-1* 基因编码的神经肽 Kisspeptin^[7], *Kiss-1/GPR54* 的表达可能参与了儿童性早熟的发病机制。本研究探讨 GnRH 类似物曲普瑞林 (triptorelin) 对真性性早熟动物模型的作用及其可能的中枢机制, 现报道如下。

材料和方法

实验动物和分组 3日龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 购自复旦大学实验动物部、放射医学研究所动物部。仔鼠与母鼠共同饲养在 12 h 光照和 12 h 黑暗的环境中, 自由摄食和饮水。动物出生后 23 d 断奶。动物随机分为正常组、模型组和曲

普瑞林组。

模型制备和评价^[8]

1 模型的制备 达那唑 300 μg 溶解于乙二醇-乙醇 (1:1, V:V) 混合液 25 μL 中。模型组和曲普瑞林组大鼠于 5 日龄时每只臀部皮下注射达那唑 300 μg 。曲普瑞林组大鼠在 15 日龄时给与曲普瑞林 (50 $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ 体重) 肌内注射, 每 3 wk 一次, 共 2 次。

2 性周期和体重观察 大鼠 25 日龄时, 开始每天检查阴门开口情况, 如动物在第一次检查时阴门已经开口, 则阴门开口时间记为 25 d。从大鼠阴门开口日起, 每天上午定时做阴道涂片, 直至大鼠建立正常性周期。记录大鼠阴门开启时间和建立第一个正常性周期的时间。并分别在 25 日龄、30 日龄、35 日龄时, 称量各组大鼠的体重。

3 动物脏器系数的测定 大鼠在建立正常性周期后, 称量体重后断头处死, 取子宫及卵巢等脏器称重, 计算各脏器的脏器系数。大鼠处死后, 剖开腹腔, 以剪刀摘取子宫及卵巢, 除去脂肪组织, 放于滤纸上, 迅速以天平称重。计算子宫和卵巢湿重与每 100 g 体重的百分率, 即为脏器系数。

下丘脑 *Kiss-1/GPR54* mRNA 的检测

1 组织总 RNA 提取 (Trizol 一步法) 将动物断头处死, 立即取脑并在冰浴上分离下丘脑, 置于 10 mL 消毒试管中; 按每 100 mg 组织加入 Trizol 试剂 1 mL, 冰浴中用电动高速匀浆器制备匀浆, 按每 1 mL Trizol 试剂加入 0.25 mL 氯仿的比例加入氯仿, 快速震荡 15 s, 室温孵育 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$,

12 000 × *g* 离心 15 min, 吸取上层水相转移到另一干净离心管内; 加入与 Trizol 等体积的异丙醇, 缓慢混匀, 室温孵育 10 min; 4 °C, 12 000 × *g* 离心 10 min, 弃上清, 将离心管倒置在消毒滤纸上, 吸干异丙醇; 加入 75%乙醇, 重悬沉淀, 7 500 × *g*, 4 °C离心 5 min, 弃上清, 在消毒滤纸上吸干乙醇; 并重复上述步骤一次, 最后置空气中干燥; 将沉淀溶于 DEPC H₂O, 置-70 °C贮存。实验时取 4 μL 总 RNA 溶液稀释至 1 mL, Beckman DU7500 紫外分光光度计检测 *D*₂₆₀ 和 *D*₂₈₀ 值, 测定其浓度和纯度。

2 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)

2.1 逆转录合成 cDNA 第一链 在 0.2 mL 无 RNase 的 PCR 管中依次加入总 RNA (1 g·L⁻¹) 3 μL, antisense primer (25 pmol·L⁻¹) 1 μL 和 DEPC H₂O (Rnase-free) 至总体积为 12.5 μL, 在 70 °C 变性 5 min, 冰浴 5 min 后, 再加入 5 × RT 缓冲液 4 μL, 10 mmol·L⁻¹ 4 dNT mix 2 μL, RNAsin (20 U·μL⁻¹) 0.5 μL 和 M-MuLV 逆转录酶 (200 U·μL⁻¹) 1 μL, 42 °C 水浴 45 min, 72 °C 水浴 10 min。

2.2 PCR 扩增 在 0.2 mL PCR 管中依次加入逆转录产物 10 μL、10 × 缓冲液 5 μL、25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 溶液 1 μL、Sense 和 antisense primer 各 1 μL、2.5 mmol·L⁻¹ DNTPs 2 μL、Taq 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) 11 μL 和 DEPC H₂O (Rnase-free) 29 μL, 瞬时离心后, 用 GeneAmp PCRSystem9600 PCR 仪 (美国 Perkinelmer 公司) 进行扩增。扩增条件为, 94 °C 5 min, 96 °C 1 min, 62 °C 2 min 和 72 °C 1 min 为一个循环, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

本研究所用引物核苷酸序列为 Kiss-1 上游: 5'-TGG CAC CTG TGG TGA ACC CTG AAC-3'; 下游引物序列为: 5'-ATC AGG CGA CTG CGG GTG GCA CAC-3', 产物大小为 202 bp。GPR54 上游引物序列为: Sense 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3'; 下游引物序列为: Antisense 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3', 产物大小 680 bp。β-actin 上游引物序列为: 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3'; 下游引物序列为: 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3', 产物大小 550 bp。

2.3 DNA 电泳鉴定及图像分析 PCR 产物 5 μL 上样于 1% 琼脂糖凝胶, 电压为 100 V, 在核酸电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司) 进行电泳。应用凝胶图像分析系统 (Image Master Software) 进行条带光

密度分析, 经 β-actin 校正得到相对 *D* 值。

统计学方法 多组间计量资料比较采用方差分析, 率的比较采用 χ² 检验。数据用 SPSS 13.0 软件处理。定义 *P* < 0.05 为差别有显著意义。

结 果

性早熟大鼠模型的建立和评价 模型组大鼠阴门开启和出现第一个规律性周期的时间比正常组提前, 差异有显著意义 (*P* < 0.05); 同时, 模型组大鼠卵巢和子宫的脏器系数也比正常组增加 (*P* < 0.05)。见表 1。

曲普瑞林对性早熟大鼠青春期发育的影响 曲普瑞林组大鼠阴门开启及建立第一个规律性周期时间与模型组相比延缓 (*P* < 0.05); 大鼠子宫、卵巢的脏器系数较模型组降低, 2 组相比有显著差异 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 模型建立后 3 组大鼠各项指标比较 *n* = 12

组别	阴门开启 时间/d	正常性周期 出现时间/d	脏器系数/mg·100g ⁻¹ 体重	
			卵巢	子宫
正常	34 ± 6	41 ± 3	59 ± 4	67 ± 6
模型	25 ± 3 ^b	34.5 ± 2.6 ^b	71 ± 4 ^b	75 ± 3 ^b
曲普瑞林	36 ± 5 ^a	43 ± 4 ^a	63 ± 4 ^a	70.1 ± 2.8 ^a

3 组比较, 经方差分析, 两两比较: 与正常组比较, ^a*P* > 0.05, ^b*P* < 0.05; 与模型组比较, ^a*P* < 0.05

大鼠下丘脑 Kiss-1 mRNA 的表达 模型组大鼠青春期启动时 Kiss-1 mRNA 的相对 *D* 值为 0.427 ± 0.008, 高于正常组 0.266 ± 0.029 (*P* < 0.01)。曲普瑞林组大鼠 Kiss-1 mRNA 的相对光密度值为 0.332 ± 0.019, 较模型组降低 (*P* < 0.01), 和正常组相比无明显差异 (*P* > 0.05)。见图 1。

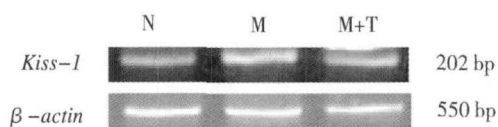


图 1 下丘脑 Kiss-1 mRNA 的表达 N: 正常组; M: 模型组; M+T: 曲普瑞林组

大鼠下丘脑 GPR54 mRNA 的表达 模型组大鼠青春期启动时 GPR54 mRNA 的相对 *D* 值为 0.482 ± 0.021, 明显高于正常组 0.31 ± 0.03 (*P* < 0.01), 曲普瑞林组大鼠 GPR54 mRNA 的相对光密度值为 0.33 ± 0.03, 较模型组降低 (*P* < 0.01), 和正常组相比无明显差异 (*P* > 0.05)。见图 2。

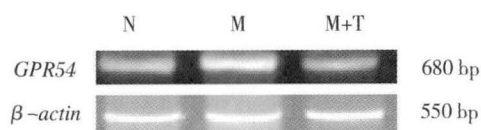


图2 下丘脑 *GPR54* mRNA 的表达 N: 正常组; M: 模型组; M+T: 曲普瑞林组

讨 论

曲普瑞林是天然 GnRH 分子结构的改良产物, 将分子中的第 6 个左旋氨基酸(甘氨酸), 以右旋色氨酸取代, 作用与 GnRH 相同, 但其血浆 $t_{1/2}$ 延长且对 GnRH 受体的亲和力更强, 是 GnRH 受体的强力激动剂。本研究结果表明, 曲普瑞林肌肉给药 2 次后, 动物阴门开启和规律性周期建立的时间与比不给药的模型动物明显延迟, 子宫、卵巢的脏器系数明显减小, 接近正常发育大鼠水平。提示曲普瑞林对达那唑诱导的性早熟动物有明显的治疗作用。

2003 年, 美国、法国和沙特阿拉伯的 3 个研究小组几乎同时向全世界宣布, 发现了调控青春期发育的关键分子——*GPR54*^[4-6]。临床流行病学和动物基因敲除实验研究都发现, *GPR54* 基因的功能缺失性突变或敲除, 可导致人或小鼠发生以性发育不良、青春期启动延迟甚至缺失为病理特征的原发性促性腺激素依赖性性机能减退症(idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, IHH)。后来的研究表明, *Kiss-1/GPR54* mRNA 及蛋白在生殖内分泌调节的关键区域——下丘脑弓状核、内侧视前区以及下丘脑外侧区都有较高的表达^[9]; 在大鼠出生时, 下丘脑 *Kiss-1/GPR54* mRNA 仅微量表达, 青春期启动时其表达急剧升高, 青春期维持在较高水平^[9,10]。这些研究均提示, *Kiss-1/GPR54* 的表达与青春期发育密切相关, 可能参与了儿童性早熟的发病机制。

Kisspeptin/GPR54 与青春期发育有着不可或缺的联系, 可能是调控青春期发育的关键分子, 国际上将其称为青春期启动的“Gatekeeper”^[11]。*Kiss-1/GPR54* mRNA 和蛋白在下丘脑多个调节生殖内分泌的核团上分布^[9]。两者在青春期发育的不同阶段表达不同, 青春期启动时表达最高^[10]。并且, 大鼠和恒河猴外周或中枢给予 *Kisspeptin* 可促进 GnRH 分泌增加, 造成性发育提前; 小鼠和人

GPR54 基因缺失则导致 GnRH 释放减少, GnRH 兴奋实验曲线左移, 血促性腺激素水平显著降低, 性器官发育明显缺陷, 生殖能力丧失^[5]。由此可以推测, *Kiss-1/GPR54* 与青春期启动及 GnRH 的释放有着极其密切的联系, 可能参与了促进 GnRH 的过量表达及 HPGA 的提前启动。本研究结果表明, 曲普瑞林可明显抑制性早熟动物下丘脑内 *Kiss-1/GPR54* mRNA 表达, 从而可能减少了 *GPR54* 和 *Kisspeptin* 的合成和释放, 阻止了达那唑诱导的大鼠的早熟进程, 这可能是曲普瑞林治疗真性性早熟的中枢机制之一。

[参考文献]

- [1] CONN PM, CROWLEY WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(2): 93-103.
- [2] 葛秦生. 性早熟[J]. *生殖医学杂志*, 2000, 9(6): 377-380.
- [3] 倪继红, 宋文惠, 陈凤生, 等. 促性腺释放素类似物治疗特发性中枢性性早熟 18 例[J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(8): 556-558.
- [4] SEMINARA SB, MESSENGER S, CHATZIDAKI EE, et al. The *GPR54* gene as a regulator of puberty [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(17): 1614-1627.
- [5] de ROUX N, GENIN E, CAREL JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *KiSS-1*-derived peptide receptor *GPR54*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 10972-10976.
- [6] FUNES S, HEDRICK JA, VASSILEVA G, et al. The *KiSS-1* receptor *GPR54* is essential for the development of the murine reproductive system[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(4): 1357-1363.
- [7] KOTANI M, DETHEUX M, VANDENBOGAERDE A, et al. The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor *GPR54* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [8] TIAN ZZ, ZHAO H, CHEN BY. Decreased hypothalamic aromatase in female rats of true precocious puberty[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 366(1): 92-96.
- [9] COLLEDGE WH. *GPR54* and puberty [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15(9): 448-453.
- [10] NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of *KiSS-1* and its putative receptor, *GPR54*, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of *KiSS-1* peptide [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(10): 4565-4574.
- [11] POPA SM, CLIFTON DK, STEINER RA. A *KiSS* to remember [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16(6): 249-250.