

· 实验研究 ·

中药天癸方对雄激素致不孕大鼠下丘脑前阿黑皮原 mRNA 的影响^{*}

王 莉 俞 瑾

内容提要 目的 探讨中药天癸方对雄激素致不孕大鼠(ASR)的作用机理。方法 取新生 SD 雌性大鼠随机分为 3 组,于 9 日龄时注射丙酸睾丸酮,制成 ASR 模型,用中药天癸方治疗 14 天,于 106 日龄左右(动情前期)处死,并取血清,用放免法测定总睾酮(TT)、游离睾酮(FT),下丘脑前阿黑皮原 mRNA(POMC mRNA)。结果 模型组大鼠均无排卵,对照组(未造模)大鼠均排卵,中药组大鼠排卵率为 58%。TT 和 FT 模型组均明显高于对照组和中药组($P < 0.01$)。3 组大鼠在下丘脑弓状核神经元雄激素受体(AR)和 β -内啡肽(β -EP)共存。下丘脑 POMC mRNA 水平模型组高于对照组($P < 0.01$),中药组降至基本正常。结论 ASR 模型的血清雄激素水平升高,有可能通过下丘脑 β -EP 神经元上的 AR 引起 POMC mRNA 表达增加,中药天癸方可使血清雄激素水平和下丘脑 POMC mRNA 下降。

关键词 天癸方 雄激素致不孕大鼠 雄激素受体 前阿黑皮原 mRNA

Effect of Tiangui Recipe on Hypothalamic Proopiomelanocortin mRNA Levels in Androgen Sterilized Rats WANG Li, YU Jin *Obstetric and Gynaecologic Hospital, Fudan University, Shanghai (200011)*

Objective : To explore the effect of Tiangui recipe (TGR) in androgen sterilized rats (ASR). **Methods** : New-born female SD rats were randomly divided into 3 groups. ASR model was established by means of testosterone injection subcutaneously at the age of 9 days, ASR were administered with TGR for 14 days. Around the age of 106 days (proestrus day), all rats were sacrificed, serum total testosterone (TT) and free testosterone (FT) were measured by radioimmunoassay (RIA), and levels of hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) mRNA expression in hypothalamus were determined. **Results** : None of the ASR ovulated and all rats in control group ovulated. The rate of ovulation in TGR group was 58%, the mean-serum concentration of TT and FT in ASR were significantly higher than those in the control group and TGR group ($P < 0.01$). The hypothalamic POMC mRNA level in ASR model group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), and became normal after TGR treatment. **Conclusion** : The elevated serum androgen levels in ASR could challenge hypothalamic POMC mRNA overexpression via androgen receptor (AR). TGR might reduce serum androgen and lower the expression of POMC mRNA.

Key words Tiangui recipe, androgen sterilized rats, androgen receptor, proopiomelanocortin mRNA

高雄激素是引起青春期和生育期妇女不排卵和多囊卵巢的重要原因之一。雄激素在外周可以引起多毛、痤疮、肥胖、卵巢多囊改变和不排卵等,但高雄激素通过中枢对性腺轴产生的影响尚未见报道,尤其在合并高胰岛素血症时其治疗方法还是个难点。俞瑾等^[1]采用天癸方对高雄激素、高胰岛素型的多囊卵巢综合征(PCOS)有 60% 的促排卵效果,并采用 9 日龄 SD 雌性大鼠皮下注射丙酸睾丸酮成功诱发出不完全排卵障碍,即雄激素致不孕大鼠(ASR)模型,观察到该大鼠成

年后具有高雄激素、高胰岛素、低促性腺激素、无排卵和多囊卵巢等,认为这是研究高雄激素致不排卵的良好动物模型。本研究通过 ASR 模型研究了高雄激素对下丘脑前阿黑皮原(POMC) mRNA 所产生的影响,同时观察了补肾中药天癸方在促使 ASR 模型恢复排卵过程中血清 POMC mRNA 含量的变化。

材料和方法

1 药物 天癸方由生地、桃仁、仙灵脾、补骨脂、女贞子等组成,复旦大学药学院生药教研室提取水溶性部分,制成浸膏 342mg/ml,每毫升含生药 3g。

2 分组与模型的制备 新生雌性 SD 大鼠,购自

^{*}上海市医学领先专业重点学科中西医结合妇科资助项目(No.

复旦大学医学院实验动物部,清洁级饲养,每日光照12h,喂以标准大鼠颗粒饲料。随机分为3组,每组12只。造模:取9日龄大鼠,颈背部皮下注射丙酸睾丸酮1.25mg(0.05ml),对照组大鼠于9日龄颈背部皮下注射中性茶油0.05ml,21日龄断乳。70日龄起每天作阴道涂片,连续11天,观察到阴道上皮持续角化者作为ASR造模成功。对照组70日龄后阴道涂片呈现动情周期。中药组为ASR模型81日龄起,按成人剂量20倍灌服天癸方1ml/100g体重,每天1次,连续14天。对照组和模型组大鼠同期灌服蒸馏水1ml/100g体重。95日龄起各组大鼠连续阴道涂片11天,观察排卵情况。

3 取材 106日龄左右,各组大鼠于动情前期或阴道细胞成角化状态时,腹腔注入4%水合氯醛(400mg/kg体重)麻醉,抽取下腔静脉血,离心后取血清-20℃待测,每组随机取6只新鲜下丘脑组织匀浆,抽提RNA。

4 血清总睾酮(TT)、游离睾酮(FT)测定 采用放射免疫法测定,由复旦大学妇产科研究所内分泌室按程序操作,批内误差<5%,批间误差<10%,激素放免药盒均购自美国DPC公司。

5 下丘脑弓状核神经元雄激素受体(AR)和β-内啡肽(β-EP)测定 大鼠麻醉后行心脏灌注,取脑,依次放置于20%蔗糖、多聚甲醛和30%蔗糖缓冲液中至下沉,根据KK大鼠脑定位图谱⁽²⁾,取Bregma 2.12~3.80mm平面进行切片,脑片厚30μm,经双标荧光免疫组织化学法测定,激光共聚焦显微镜观察。抗体分别购自美国Sigma公司、Pharmingen公司、DAKO公司及德国宝灵曼公司。

6 大鼠下丘脑POMCmRNA的Northern Blot分析 一步法抽提下丘脑组织RNA,1%琼脂糖变性凝胶电泳后转移至尼龙膜,进行预杂交、杂交、洗膜、显色。POMCmRNA探针及18S探针由北京赛百盛公司合成,其碱基顺序如下⁽³⁾:

POMC探针:5'-CTTGCCCACCGCTTGCCC-CAGCG-3'

18S RNA探针:5'-ACGGTATCTGATCGTCT-TGGAACC-3'

探针采用末端标记法进行3'末端异羟基洋地黄毒苷(DIG)标记。尼龙膜、DIG标记及检测药盒均购自德国宝灵曼公司。

7 计算机图像处理 所有图像均在Optiquist V641 Digital Imaging & Analysis Systems (AlphaImager 2000, AlphaImotech公司)进行分析。

8 统计学方法 应用SAS统计软件进行统计。

结 果

1 3组大鼠排卵情况 中药组大鼠12只中7只出现连续2个动情周期,占58%;模型组大鼠12只阴道细胞涂片持续角化,无动情周期出现;对照组12只大鼠均出现连续2个动情周期。

2 3组大鼠血清TT、FT的含量测定结果 见表1。血清TT和FT含量:模型组大鼠均高于对照组($P < 0.01$),中药组大鼠比模型组显著下降($P < 0.01$)。

表1 3组大鼠血清TT、FT测定结果比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TT	FT
对照	12	1.21 ± 0.36	0.057 ± 0.058
模型	12	5.20 ± 1.59 *	0.369 ± 0.045 *
中药	12	1.82 ± 0.58 [△]	0.072 ± 0.068 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

3 下丘脑AR和β-EP的共存情况 用双标荧光免疫组织化学法,激光共聚焦显微镜观察到3组大鼠弓状核神经元中存在β-EP和AR共存。

4 3组大鼠下丘脑POMCmRNA的表达 以18S RNA作为内标,用Northern印迹方法观察下丘脑POMCmRNA水平。杂交结果(见图1)显示:模型组大鼠下丘脑POMCmRNA水平表达比对照组显著上升($P < 0.01$),与模型组比较,中药组显著下降($P < 0.01$),见表2。

表2 3组大鼠POMCmRNA水平测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	POMCmRNA(灰度比)
对照	6	0.400 ± 0.037
模型	6	0.643 ± 0.058 *
中药	6	0.422 ± 0.063 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

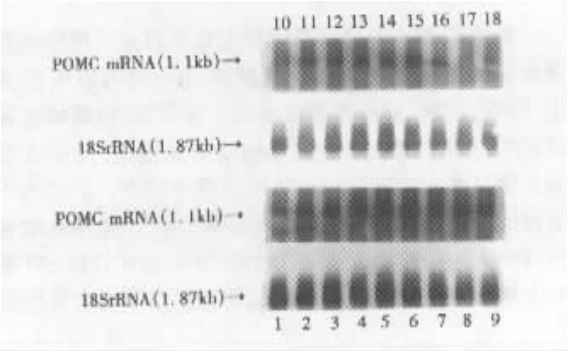


图1 3组大鼠下丘脑POMCmRNA Northern杂交结果

注:1-3,10-12为对照组,4-9为模型组,13-18为中药组

讨 论

大鼠下丘脑的 β -EP 主要来源于弓状核, β -EP 的前体物质是 POMC。20 世纪 80 年代中期即已证实 β -EP 神经元内存在有雌、孕激素受体, 下丘脑 POMC 基因表达受雌激素和孕激素的影响⁽⁴⁾。在体和离体实验均观察到睾酮可以使雄性大鼠下丘脑 POMCmRNA 表达及 β -EP 分泌增加^(5,6), 但未阐明雄激素对 β -EP 神经元的影响途径。本研究发现, 在 ASR 模型大鼠下丘脑弓状核 β -EP 神经元中存在 AR, 提示雄激素可能直接作用于分布在 β -EP 神经元上的受体, 影响 β -EP 的合成。

本研究证实 ASR 模型大鼠血中总睾酮和游离睾酮均高于正常(对照组)雌性大鼠, POMCmRNA 局部表达也明显升高, 提示在 ASR 模型中高雄激素可以通过血脑屏障使 β -EP 神经元 POMCmRNA 表达升高。当然在这里也应考虑雌激素对 β -EP 神经元的影响。20 世纪 80 年代中期, Wilcox 等⁽⁷⁾报道了高水平的雌激素可以降低大鼠下丘脑 POMCmRNA 的水平。杨淑萍等⁽⁸⁾证实在排卵前血清雌激素出现峰值时下调了下丘脑弓状核内雌激素受体, 相伴出现 POMCmRNA 表达的明显下降, 所以 ASR 模型中 POMCmRNA 表达升高可能主要是该大鼠血中高雄激素通过其受体对 POMC 神经元的作用。

20 世纪 50 年代 Barraclough 等就已证实内阿片肽参与调节促性腺激素的分泌, β -EP 是其中最重要的一种。下丘脑 β -EP 神经元纤维大量投射到促性腺激素释放激素(GnRH)神经元密集的内侧视前区, GnRH 神经元上有 β -EP 受体, β -EP 可抑制 GnRH 神经元分泌, β -EP 还可以通过突触前机制调节去甲肾上腺素(NE)的释放, 或抑制兴奋性氨基酸(NMDA)及一氧化氮(NO)的产生, 进而影响 GnRH 神经元的活动, 即 β -EP 是抑制 GnRH 合成和释放的基本物质⁽⁹⁾。孙斐等⁽¹⁰⁾亦报道了 ASR 模型大鼠血清黄体生成素、促卵泡激素(FSH)含量低于正常, 由此可见, 在 ASR 模型中 β -EP 合成增加, 进而可以对 GnRH 的合成和释放产生直接抑制作用, 或者间接通过抑制下丘脑 NE 神经元而使 GnRH 合成和分泌减少, 从而造成 ASR 模型的低促性腺激素的状态。

俞瑾教授根据中医肾主生殖理论并结合多年临床经验, 研制成补肾、活血、化痰为主的中药天葵方已在临床多囊卵巢综合征中取得良好的促排卵效果。本研

究 ASR 模型大鼠灌服中药天葵方两周后排卵率达到 58%, 血清 TT、FT 均降至基本正常, 这与其诱发排卵的结果相符; ASR 模型灌服中药后, 在血清 TT、FT 下降的同时, 局部的 POMCmRNA 水平也降至正常。提示补肾中药天葵方可能同时调整了 ASR 模型外周血性激素与下丘脑 POMC 水平, 或在降低血雄激素时通过其受体调控下丘脑 POMC 含量而对下丘脑—垂体—卵巢轴具有中枢性的良性调节作用。

参 考 文 献

1. 俞瑾. 肾主生殖的实验性研究. 中西医结合杂志 1989; 9(9): 548—550.
2. Koning JFR, Klippl RA. The rat brain. In: Koning JFR, Klippl RA eds. A sterotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. 2nd ed. Hamburg: Willams and Wilkins Company, 1990: 1—162.
3. Yang ZY, Lee D, Huang WQ, et al. Glucocorticoids potentiate the adenylyl cyclase-cAMP system mediated immunoreactive β -endorphin production and secretion from hypothalamus neurons in culture. Brain Res 1994; 648: 99—108.
4. Tong Y, Zhao H, Labrie F, et al. Regulation of pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. Neuroscience Letters 1990; 112: 104—108.
5. Chowen-Breed J, Fraser HM, Vician L, et al. Testosterone regulation of proopiometanocortin messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus of the male rat. Endocrinology 1989; 124: 1697—1702.
6. Nakano Y, Suda T, Sumitomo T, et al. Effects of sex steroids on endorphin release from rat hypothalamus in vitro. Brain Res 1991; 553: 1—3.
7. Wilcox JN, Roberts JL. Estrogen decreases rat hypothalamic proopiometanocortin messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 1985; 117: 2392—2396.
8. 杨淑萍, 何莲芳, 俞瑾. 大鼠排卵前促性腺激素释放激素释放过程中下丘脑前阿黑皮素基因表达和雌激素受体的水平. 动物学报 1998; 44(1): 67—73.
9. Sagrillo CA, Grattan DR, McCarthy MM, et al. Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH expression and related reproductive behaviors. Behav Genet 1996; 16: 241—246.
10. 孙斐, 俞瑾. 中药天葵方对雄激素致不孕大鼠血 leptin 及垂体促性腺激素的影响. 中国中西医结合杂志 1999; 19(6): 350—352.

(收稿 2000-09-06 修回 2001-04-16)