

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^{*}

蔡德培¹ 陈伯英² 庄振杰²

内容提要 目的 探讨滋肾阴泻相火(简称滋阴泻火)中药对下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)的合成、分泌及其调节机制的影响。方法 青春期中大白鼠喂饲滋阴泻火中药后,采用内侧基底下丘脑区的脑片孵育法,测定 KCl 刺激后孵育液中 GnRH 的含量,观察其下丘脑 GnRH 的紧张性分泌中心(弓状核及腹内侧核)GnRH 合成水平的变化,采用免疫组化及计算机图像处理技术,测定其下丘脑视前区 GnRH 阳性物质的积分光密度值,观察其下丘脑 GnRH 的脉冲性分泌中心(视前内侧核)GnRH 含量的变化;采用下丘脑的内侧视前区的推挽灌流技术,以放射免疫法测定序列的灌流液中 GnRH 的含量,观察其下丘脑视前内侧核 GnRH 脉冲释放频率及幅度的变化;以高效液相色谱-荧光检测法,测定灌流液中门冬氨酸、谷氨酸及 γ 氨基丁酸的含量,并以放射免疫法测定灌流液中 β -内啡肽的含量,观察其下丘脑 GnRH 的脉冲性分泌中心(视前内侧核区)兴奋性、抑制性氨基酸递质及 β -内啡肽释放量的变化。结果 滋阴泻火中药可使内侧基底下丘脑区(弓状核、腹内侧核)及下丘脑视前区(视前内侧核)的 GnRH 含量显著减少,并可使下丘脑视前内侧核 GnRH 脉冲释放的频率及幅度明显降低。滋阴泻火中药还可使下丘脑内侧视前区门冬氨酸和谷氨酸的释放明显减少,而使 γ 氨基丁酸和 β -内啡肽的释放明显增加。结论 滋阴泻火中药可通过抑制中枢兴奋性氨基酸递质的释放及促进中枢抑制性氨基酸递质和 β -内啡肽的释放,使下丘脑 GnRH 神经元的功能活动显著降低,从而使下丘脑 GnRH 的紧张性分泌中心和脉冲性分泌中心 GnRH 的合成及分泌明显减少,这可能是滋阴泻火中药能有效地治疗特发性真性性早熟的主要作用机理之一。

关键词 中药 神经生物学 促性腺激素释放激素 神经递质 β -内啡肽

Effect of Chinese Herbal Medicine for Nourishing Yin and Removing Fire on Biosynthesis, Secretion and Regulative Mechanism of Gonadotropin-Releasing Hormone in Hypothalamus CAI De-pei, CHEN Bai-ying, ZHUANG Zhen-jie *Pediatric Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200032)*

Objective: To elucidate the effect of Chinese herbal medicine (CHM) for nourishing Yin and removing fire on the biosynthesis, secretion and regulative mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in hypothalamus. **Methods:** The brain slices of medial basal hypothalamus of adolescent rats, which had been fed with CHM, were incubated. The content of GnRH in incubative liquid was determined during the slices were stimulating with high KCl to observe the change of GnRH biosynthesis from tonic secretory center of GnRH (arcuate nucleus and ventromedial nucleus) in hypothalamus. The integrated optic density of GnRH positive immunoreactive substance in preoptic area of hypothalamus was determined by immunohistochemistry and image processing to observe the change of GnRH content in pulsative secretory center of GnRH (medial preoptic nucleus) in hypothalamus. The push-pull perfusion of medial preoptic area in hypothalamus was performed. The content of GnRH in serial perfusates was determined by radioimmunoassay (RIA) to observe the change of frequency and amplitude of GnRH pulse releasing from medial preoptic area in hypothalamus. The content of aspartic acid, glutamic acid and γ -amino butyric acid in the perfusate was determined by high performance liquid chromatography-fluorometry, and the content of β -endorphin in the perfusate was determined by RIA to observe the change of releasing amount of exciting aminoacid neurotransmitter and β -endorphin from pulsative secretory center of GnRH (medial preoptic area) in hypothalamus. **Results:** CHM could markedly reduce the content of

^{*} 本课题为国家卫生部科学研究基金资助项目(No. 98-1-172)

1. 上海医科大学儿科医院(上海 200032) 2. 上海医科大学医学神经生物学国家重点实验室

GnRH in medial basal hypothalamus(arcuate nucleus and ventromedial nucleus)and preoptic area(medial preoptic nucleus)of hypothalamus ,and could obviously lower the frequency and amplitude of GnRH pulse releasing from medial preoptic nucleus ,It also could markedly decrease the releasing amount of aspartic acid and glutamic acid ,while obviously increase the releasing amount of γ -amino butyric acid and β -endorphin from medial preoptic area of hypothalamus. **Conclusion** :CHM could markedly reduce the activity of GnRH neurons in hypothalamus through inhibiting the releasing of central exciting aminoacid neurotransmitter and promoting the releasing of central inhibiting aminoacid neurotransmitter and β -endorphin ,thereby ,obviously decrease the biosynthesis and secretion of GnRH from tonic and pulsative secretory center of GnRH in hypothalamus. It could be one of chief effective mechanism of CHM in efficiently treating the idiopathic precocious puberty.

Key words Chinese herbal medicine , neurobiology , gonadotropin-releasing hormone , neurotransmitter , β -endorphin

特发性真性性早熟患儿的下丘脑—垂体—性腺轴提前发动、功能亢进,血清促性腺激素(FSH、LH)水平显著升高^[1]。临床上采用滋阴泻火相火中药(以下简称滋阴泻火中药)可使其下丘脑—垂体—性腺轴功能亢进显著缓解,血清FSH、LH水平下降^[2]。我们曾采用分子生物学方法,证实了补肾中药可在转录水平调节下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)及腺垂体FSH、LH的基因表达,其中滋阴泻火中药可使下丘脑GnRH及腺垂体FSH、LH的mRNA表达水平显著下调^[3]。本实验拟采用下丘脑推挽灌流、脑片孵育及免疫组化等神经生物学方法,观察实验动物喂饲滋阴泻火中药后,下丘脑促性腺区GnRH的含量、脉冲释放的频率与幅度,以及中枢氨基酸递质、 β -内啡肽释放的变化,以探讨滋阴泻火中药对下丘脑GnRH合成、分泌及其调节机制的影响。

材料与方法

1 实验动物及分组 同窝的SD大白鼠,体重160~180g,1.5月龄(相当于青春期),共100只,其中雌性80只,雄性20只,饲养于自然光照环境中。由上海西普尔—必凯实验动物有限公司提供。分为两组,给药组及对照组各50只,其中雌性40只,雄性10只。

2 药物 滋阴泻火中药方由生地15g,炙龟版12g,黄柏9g,知母9g等组成,由本院中药制剂室煎制成浓缩合剂,每毫升约含生药3g。

3 试剂及仪器 免疫组化ABC试剂盒由华美试剂公司提供,GnRH放免试剂盒由中国科学院动物研究所提供, β -内啡肽放免试剂盒由第二军医大学神经生物学教研室提供,谷氨酸、天门冬氨酸及 γ -氨基丁酸标准品由Sigma公司提供。图像分析处理软件由Leica公司提供,JW II-C型脑立体定位仪由第二军医大学仪器厂生产,高效液相色谱系统及157型荧光检测

器为Beckman公司产品。

4 实验方法

4.1 给药方法 给药组喂饲滋阴泻火中药合剂,每次每只大鼠用灌胃法喂饲5ml,每天1次,疗程25天。对照组喂饲等量生理盐水。

4.2 脑片孵育 大鼠断头,迅速取出脑组织,分离内侧基底下丘脑区(含下丘脑弓状核及腹内侧核),垂直切为两片,迅速移入预先置于37℃水浴并通以95%O₂和5%CO₂的0.5ml人工脑脊液[成分为(mmol/L):NaCl 118,KCl 3,MgCl₂ 2,NaHCO₃ 24,CaCl₂ 1.5,Glucose 12]中孵育。孵育的脑片平衡30min后更换新的脑脊液0.5ml,再孵育30min后,收集孵育液。然后将KCl浓度升高至28mmol/L,再孵育30min后,收集孵育液。收集的样品中加入杆菌肽,以抑制氨基酸酶活性,减少肽类降解,然后于-70℃保存,用于GnRH测定。

4.3 免疫组化 大鼠用10%水合氯醛麻醉后,开胸暴露心脏,将注射针头插入左心室,以300ml生理盐水快速冲洗后,继以0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.4)配制的4%多聚甲醛灌注固定0.5h,取出全脑。再以4%多聚甲醛固定6~8h后,先后移入20%及30%蔗糖磷酸缓冲液中,待下沉后用冰冻切片机将下丘脑部分切成35 μ m厚的冠状切片,按ABC法常规免疫组化染色后,用Leica图像分析处理系统,测定视前区阳性物质的积分光密度值。

4.4 推挽灌流 大鼠在10%水合氯醛麻醉下,用脑立体定位仪固定头部,将推挽套管定位埋置于内侧视前区(含视前内侧核)。在清醒状态下进行灌流,用恒速灌流泵推动人工脑脊液(成分同上),以50 μ l/min的速度注入内侧视前区,平衡灌流30min后开始收集灌流液,每10min收集一管,连续收集3h。收集管置于冰浴内并加入杆菌肽以减少肽类降解。收集的

样品于 -70℃ 保存 ,用于 GnRH、β-内啡肽及氨基酸递质的测定。灌流结束后 ,在灌流套管内注入 20μl 黑墨水 取出全脑 用 10% 多聚甲醛固定一周 ,在冰冻切片机上切片 ,观察套管位置 ,定位准确者可用于样品检测 ,定位不准者 ,弃去不用。

4.5 GnRH 及 β-内啡肽的放射免疫测定 上述收集的孵育液、灌流液样品中的 GnRH 及 β-内啡肽含量均按常规放射免疫法测定 ,操作步骤按药盒说明书执行。

4.6 氨基酸类递质的高效液相测定 灌流液样品中的兴奋性氨基酸递质(谷氨酸 ,门冬氨酸)及抑制性氨基酸递质(γ 氨基丁酸)的含量 ,采用高效液相色谱—荧光法检测 ,以 Beckman 公司 Gold system 软件进行梯度控制及色谱数据处理 ,以外标法计算样品浓度 ,操作步骤按仪器说明书执行。

5 统计学方法 两组数据间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 滋阴泻火中药对内侧基底下丘脑 GnRH 释放的影响 见表 1。孵育液中的 GnRH 含量 ,特别是以 KCl 激活释放后孵育液中的 GnRH 含量代表下丘脑弓状核及腹内侧核 GnRH 的储备状况 ,可反映该部位 GnRH 合成的水平。从实验结果可见给药组 GnRH 的激活释放量比对照组显著减少 ,说明给药组的下丘脑弓状核及腹内侧核中 GnRH 的储备量显著减少 ,提示滋阴泻火中药可抑制下丘脑 GnRH 的合成。

2 滋阴泻火中药对下丘脑视前区 GnRH 含量的影响 见表 2。下丘脑视前区免疫组化染色阳性物质的积分光密度值可代表视前内侧核 GnRH 的含量。从实验结果可见给药组 GnRH 含量比对照组显著减少 ,提示滋阴泻火中药可抑制下丘脑视前内侧核 GnRH 的合成(或)促进其 GnRH 的释放。

3 滋阴泻火中药对下丘脑内侧视前区 GnRH 脉冲释放频率及幅度的影响 见表 3。从一系列按时间顺序的灌流液样品的检测 ,可反映下丘脑视前内侧核 GnRH 脉冲释放的频率与幅度。由实验结果可见给药组 GnRH 脉冲释放的幅度比对照组显著降低 ,在雌性大白鼠其脉冲释放的频率也明显减低 ,说明滋阴泻火中药可明显抑制下丘脑视前内侧核 GnRH 的脉冲分泌。

表 1 滋阴泻火中药对内侧基底下丘脑 GnRH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	孵育液中 GnRH 的含量(μg/L)	
		基础水平	激活释放
给药	10	36.10±21.23	65.21±30.40 *
对照	10	34.82±18.09	83.44±14.38

注 :与对照组比较 ,* *P*<0.05 ,** *P*<0.01 ;下表同

表 2 滋阴泻火中药对下丘脑视前区 GnRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	积分光密度值
给药	6	95.80±50.05 *
对照	6	160.74±58.56

表 3 滋阴泻火中药对下丘脑视前区 GnRH 脉冲释放方式的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	脉冲间隔(min)		脉冲幅度(μg/L)	
		雄性	雌性	雄性	雌性
给药	5	80.00±15.81	≥180 **	85.60±22.94 *	28.31±5.88 *
对照	5	62.00±5.70	104.00±22.80	150.60±58.70	40.36±10.05

4 滋阴泻火中药对下丘脑内侧视前区氨基酸递质及 β-内啡肽释放的影响 见表 4。给药组下丘脑内侧视前区门冬氨酸和谷氨酸的释放比对照组明显减少 ,而 γ 氨基丁酸及 β-内啡肽的释放明显增加 ,说明滋阴泻火中药可使下丘脑内侧视前区兴奋性氨基酸递质的释放明显减少 ,而抑制性氨基酸递质的释放明显增加 ,并可明显促进 β-内啡肽的释放。

讨 论

下丘脑的弓状核及腹内侧核是 GnRH 的紧张性分泌中心 ,其功能活动与维持 GnRH 的基础分泌水平有关。而下丘脑的视前内侧核是 GnRH 的脉冲性分泌中心 ,其功能活动则与 GnRH 的周期性脉冲式的分泌有关⁽⁴⁾。青春发动的显著标志不仅是下丘脑 GnRH 基础分泌的增加 ,更重要的是 GnRH 脉冲分泌的频率和幅度的显著提高⁽⁵⁾。女性在青春期的后期 ,当血中雌二醇浓度升高到一个临界水平并持续一定时间后 ,即引起下丘脑 GnRH 脉冲分泌突然剧增 ,导致腺垂体 LH 分泌剧增 ,达到峰值 ,从而诱发卵巢排卵⁽⁶⁾。本实验的结果表明滋阴泻火中药对下丘脑 GnRH 的紧张性分泌中心及脉冲性分泌中心均有显著的抑制作用 ,不仅可明显抑制其 GnRH 的合成 ,而且使 GnRH 的脉冲释放也显著减少。

多种中枢神经递质及神经肽均参与下丘脑 GnRH

表 4 滋阴泻火中药对视前区氨基酸递质及 β-内啡肽释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	门冬氨酸(nmol/L)		谷氨酸(nmol/L)		γ 氨基丁酸(nmol/L)		β-内啡肽(μg/L)	
		雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
给药	6	72.28±27.33 *	33.10±13.34 *	111.14±76.55 *	76.15±46.10 *	255.21±178.89 *	238.79±104.13 **	593.75±169.70 *	619.51±195.20 *
对照	6	124.20±35.00	120.29±117.01	274.61±176.87	161.53±101.75	107.74±77.95	104.74±71.81	349.97±112.04	372.57±156.24

合成与分泌的调节。兴奋性氨基酸递质(门冬氨酸、谷氨酸)可促进 GnRH 的释放,引起垂体 LH 分泌的增加,并参与了雌性大鼠排卵前 LH 峰形成的机制^[7]。抑制性氨基酸递质(γ 氨基丁酸)可抑制 GnRH 的释放,GnRH 神经元受到 γ 氨基丁酸的紧张性抑制作用,在青春发动前及垂体 LH 分泌峰值出现前均出现 γ 氨基丁酸水平的下降^[8]。 β -内啡肽也可明显抑制 GnRH 的释放^[9]。本实验结果表明滋阴泻火中药可通过抑制下丘脑 GnRH 脉冲分泌中心兴奋性氨基酸递质的释放,促进抑制性氨基酸递质和 β -内啡肽的释放,从而抑制下丘脑 GnRH 神经元的功能活动,使 GnRH 的分泌减少。

特发性真性性早熟患儿的下丘脑—垂体—性腺轴提前发动、功能亢进,血清 FSH、LH 的水平显著升高,生殖器官及性征的发育明显提前。临床上采用滋阴泻火中药可使其下丘脑—垂体—性腺轴功能亢进显著缓解,血清 FSH、LH 水平下降,生殖器官及性征的发育明显消退。我们曾采用定量的逆转录-聚合酶链式反应(定量的 RT-PCR)方法,证实了滋阴泻火中药可使下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 的 mRNA 表达水平显著下调。结合本实验的结果,我们认为滋阴泻火中药可通过抑制兴奋性氨基酸递质的释放及促进抑制性氨基酸递质和 β -内啡肽的释放,使下丘脑 GnRH 神经元的功能活动显著降低,GnRH 的基因表达水平显著下调,从而使 GnRH 的合成及分泌明显减少,这可能是滋阴泻火中药能有效地治疗特发性真性性早熟的主要作用机理之一。

参 考 文 献

1. 蔡德培,时毓民,陆英. 女性特发性性早熟下丘脑—垂体—

卵巢轴功能及内生殖器官的发育规律. 中华内分泌代谢杂志 1993;9(1):24—26.

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;4(增刊):76—78.

3. 蔡德培,张炜. 补肾中药对下丘脑 GnRH、垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 基因表达的调节作用. 中国中医基础医学杂志 1998;4(增刊):132—134.

4. Wetsel WG, Vanenka MM, Mercantaler I, et al. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone releasing hormone secreting neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4149—4153.

5. Wu FC, Butler GE, Veldhuis TD. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in human male: a study using deconvolution analysis and ultrasensitive immunofluorometric assay. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1798—1805.

6. Bourguignon JP, Franchimont P. Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro. Endocrinology 1984;114:1943—1945.

7. Spergel DI, Krsmanovic LZ. Glutamate modulates $[Ca^{2+}]$ and gonadotropin releasing hormone secretion in immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. Neuroendocrinology 1994;59:309—317.

8. Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S, et al. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. Neuroendocrinology 1992;56:133—140.

9. 谢启文. 现代神经内分泌学. 上海:上海医科大学出版社, 1999:261—262.

(收稿 2000-09-17 修回 2001-04-16)

第五届全国胃病学术大会征文通知

为加强学术交流,提高胃病学的研究和诊治水平,促进我国消化医学事业的发展,中国胃病专业委员会决定于 2002 年 4 月在广州召开第五届全国胃病学术大会。现将征文有关事项通知如下:

征文内容 (1)幽门螺杆菌相关性疾病:慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌、MALT 淋巴瘤、增生性胃息肉等病因病机研究和诊断治疗 (2)胃动力障碍性疾病:胃食管反流病、反流性食管炎、贲门失弛缓症、功能性消化不良、胃轻瘫、胆汁反流性胃炎等疾病的基础和临床研究 (3)上消化道出血:急性胃粘膜病变、消化性溃疡、肝硬化食道胃底静脉曲张破裂出血的临床表现、诊断评估和抢救治疗 (4)其他胃部疾病:胃血管病变(Dieulafoy 病、西瓜胃、胃弥漫性血管扩张症)、胃泌素瘤、胃憩室、胃肿瘤、胃内异物等诊断与治疗。上述各类疾病的中医、西医、中西医结合的基础、临床研究和经验总结以及内镜诊断、介入治疗等均欢迎投稿,欢迎消化内科、消化病理、消化影像、消化内镜、胃肠外科、小儿科、肿瘤科、中医科、中西医结合脾胃专科等医学同仁踊跃参加。

征文要求 (1)论文全文 3 000 字左右及结构式摘要(目的、方法、结果、讨论)各 1 份文稿及软盘 1 件。同时配有内镜、X 线、手术录像的请注明 (2)征文上请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮编、单位盖章 (3)请自留底稿,不退稿 (4)论文请寄至大会秘书处(邮编 510515)广州市同和南方医院全军消化内科研究所 智发朝、姜泊教授,或 E-mail:zfc@fimmu.edu.cn。

征文截稿日期 2002 年 1 月 15 日。