

滋阴泻火中药对雌性性早熟模型大鼠下丘脑生长激素释放肽及其受体 GHSR1- α 表达的影响

孙艳艳^{1,2} 田占庄² 李 婧² 俞 建^{1,2} 汪永红¹

摘要 目的 观察滋阴泻火中药对达那唑诱导的雌性性早熟模型大鼠青春期启动时下丘脑生长激素释放肽(Ghrelin)及其受体(growth hormone secretion peptide receptor 1 α , GHSR1- α)表达的影响。**方法** 将 40 只雌性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、生理盐水干预组及中药干预组,每组 10 只。模型组、生理盐水干预组及中药干预组于大鼠 5 日龄时一次性皮下注射达那唑 300 μ g 制备性早熟大鼠模型。15 日龄起中药干预组、生理盐水干预组分别予滋阴泻火中药及生理盐水灌胃,给药干预 7~10 天,正常组不予处理。记录阴门开启情况,计算卵巢及子宫指数,检测外周血雌二醇(E_2)、卵泡雌激素(FSH)、黄体生成素(LH)、下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)含量、下丘脑 Ghrelin 及其受体 GHSR1- α 基因表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠阴门开启时间提前,外周血 E_2 、LH 水平、子宫指数、下丘脑 GnRH 含量升高,外周血 FSH、下丘脑 Ghrelin 及 GHSR1- α mRNA 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组及生理盐水干预组比较,中药干预组大鼠阴门开启时间未提前,外周血 E_2 、LH 水平、子宫指数及下丘脑 GnRH 含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而下丘脑 Ghrelin 及 GHSR1- α mRNA 水平升高(均 $P < 0.01$);4 组间下丘脑 Ghrelin 及受体个数及活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在基因转录水平上滋阴泻火中药对性早熟大鼠下丘脑 Ghrelin 及其受体有一定的调节作用。

关键词 滋阴泻火中药;生长激素释放肽;生长激素释放肽受体 1- α ;性早熟

Effects of Nourishing Yin Removing Fire Chinese Herbs on Gene Expression of Hypothalamic Ghrelin and Its Receptor in Female Precocious Rats SUN Yan-yan^{1,2}, TIAN Zhan-zhuang¹, LI Jing¹, YU Jian^{1,2}, and WANG Yong-hong² 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Children's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai (201102); 2 Department of Integrative Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai (200032)

ABSTRACT Objective To observe the effect of nourishing yin removing fire Chinese herbs (NYRFCH) on the gene expression of hypothalamic growth hormone secretion peptide (Ghrelin) and its receptor growth hormone secretion peptide receptor 1 α (GHSR1- α) at the puberty onset of danazol induced female precocious rats. **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into 4 groups, i.e., the normal group (N), the model group (M), the normal saline intervention group (NS), and the NYRFCH intervention group (NI), 10 in each group. 300 μ g danazol was subcutaneously injected to all rats except those in the N group to prepare precocious rat model. NYRFCH and normal saline was respectively administered to rats in the NI and the NS group from the 15th day old for 7–10 days. No treatment was given to rats in the N group. Time of rats' vulva opening was recorded. Ovary index and uterus index were calculated. Peripheral blood levels of estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), and hypothalamic contents of gonadotropin releasing hormone (GnRH) as well as the gene expression of hypothalamic Ghrelin and GHSR1- α were determined. **Results** Compared with the N group, the vulva opening time was advanced in the model group; peripheral blood levels of E_2 and LH, uterus index, hypothalamic contents of

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 30973184, No. 81072841)

作者单位:1. 复旦大学附属儿科医院中医科(上海 201102); 2. 复旦大学上海医学院中西医结合系(上海 200032)

通讯作者:俞 建, Tel: 021-64931912, E-mail: yuj@shmu.edu.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 07. 0854

GnRH increased; peripheral blood FSH levels and mRNA levels of hypothalamic Ghrelin and GHSR1- α decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the M group and the NS group, the vulva opening time was not advanced in the NI group; peripheral blood levels of E_2 and LH, uterus index and hypothalamic contents of GnRH obviously decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); mRNA levels of hypothalamic Ghrelin and GHSR1- α increased (all $P < 0.01$). But there was no statistical difference in the hypothalamic contents of Ghrelin, or the number and activity of GHSR1- α ($P > 0.05$). Conclusion NYRFCH had regulatory effect on regulating hypothalamic Ghrelin and GHSR1- α at gene transcription levels.

KEYWORDS nourishing yin removing fire Chinese herbs; growth hormone secretion peptide; growth hormone secretion peptide receptor 1 α ; precocious puberty

性早熟是儿童常见的青春期发育异常性疾病之一,尤以女孩的特发性性早熟最为常见,其逐年增多的发病趋势及对儿童身心健康的不良影响使人们对其关注日益增加。研究显示,性早熟患儿性腺轴功能过早启动,可导致骨龄发育超前,影响患儿的生长潜力及最终身高;且第二性征提前出现、月经提前初潮会增加患儿心理负担,易出现抑郁、社交退缩、攻击性等心理行为异常^[1,2]。目前关于青春期发育机制的研究认为,下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)脉冲性释放增多是青春期启动的关键^[3]。生长激素释放肽(growth hormone secretion peptide, Ghrelin)是具有抑制下丘脑—垂体—性腺(hypothalamic-pituitary-gonad, HPG)轴功能的多肽类分子。连续给予未发育的雄性大鼠 Ghrelin 可抑制其伴随青春期启动而出现的黄体生成素(luteinizing hormone, LH)及睾酮(testosterone, T)增高,使雄性大鼠阴茎—包皮分离时间延迟,从而延缓雄性大鼠的青春期启动。高剂量持续皮下注射 Ghrelin 也可使雌性大鼠阴门开启时间延迟、卵巢湿重降低^[4,5]。动物实验显示, Ghrelin 对雌激素化的去卵巢大鼠下丘脑视前区 Kisspeptin 基因表达具有抑制作用^[6],而 Kisspeptin 是促进 GnRH 分泌的关键因子之一,此可能是其调节生殖轴功能的机制之一,但青春期发育时其中枢水平的基因表达变化尚不明确。

滋阴泻火中药是复旦大学附属儿科医院治疗儿童性早熟的常用方剂,可降低患儿血清卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、LH 及雌二醇(estradiol, E_2)水平,使增大的乳核变软、消退,亦可延缓骨龄超前发育^[7,8]。动物实验研究显示,滋阴泻火中药可使性早熟模型大鼠下丘脑中 GnRH mRNA 显著减少^[9,10],但其机制尚不完全明确。本研究以达那唑诱导的雌性性早熟大鼠为研究对象,初步观察性早熟模型大鼠青春期启动时 Ghrelin 及

其受体在中枢水平的表达变化;应用滋阴泻火中药干预性早熟模型大鼠,观察其对大鼠下丘脑 Ghrelin 及其受体(growth hormone secretion peptide receptor 1 α , GHSR1- α)的调节作用,从而进一步探讨其延缓青春期发育的机制。

材料与方法

1 动物 40 只清洁级 5 日龄雌性 SD 大鼠与其母鼠,购自上海中科院实验动物中心,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005,共同饲养在 12 h 光照/12 h 黑暗的环境中,自由摄食和饮水,21 日龄断奶。

2 药物 滋阴泻火中药(批号:A1301170)由生地、炙龟板、黄柏、知母等组成,含生药 2.6 g/mL,为复旦大学附属儿科医院治疗儿童性早熟的院内制剂^[8,11],由复旦大学附属儿科医院中药制剂室制备和提供。

3 仪器及试剂 Trizol Reagent 为美国 Life Technologies 公司产品;M-MuLV 逆转录酶、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)、dNTP Mix、Oligo(dt)、Taq 酶、镁离子(25 mmol/L)、10 × RT buffer、DEPC-treated Water、RNaseout(40 U/ μ L)、SuperScrip III、0.1 mmol/L dTT、10 × PCR buffer 均购自美国 Introvigen 公司; E_2 、FSH、LH、Ghrelin、GHSR1- α 及 GnRH 放免试剂盒均购自北京华英生物研究所;IQ5 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 生物公司),Heraeus 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司);电动高速匀浆机(美国 IKA Works 公司),PB-20 pH 酸度计(美国 Sartorius 公司),恒温控制器(上海曹行无线电元件厂),紫外分光光度计(Beckman DU7500)(德国 Beckman 公司),r-911 全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司)。

4 动物分组及给药 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、生理盐水干预组和中药干预组,每组 10 只。参照文献^[12,13],模型组、生理盐水干预组及中

药干预组大鼠于 5 日龄时一次性皮下注射达那唑(江苏联环药业股份有限公司,生产批号:DN20070001) 300 μg (每 300 μg 达那唑溶于 25 μL 体积比为 1:1 乙二醇/乙醇混合液中)。15 日龄(造模 10 天后)起中药干预组和生理盐水干预组大鼠每日分别予滋阴泻火中药和生理盐水灌胃。采用《中药药理研究方法学》^[14] 中的公式计算中药干预组的给药剂量为 1.25 mL/(100 g 体重·d),相当于临床用药的 30 倍,给药干预至大鼠被处死时(约 7~9 天)。正常组处死前未进行任何处理。

5 观察指标及检测方法

5.1 阴门开启时间及性器官指数 20 日龄起每日 9:00 准时观察大鼠阴门开启状况。选择模型组动物阴门开启的时间为处死时间点(约 21~23 日龄),同时选择相应数量的其余 3 组大鼠一并处死,留取外周血、卵巢、子宫、下丘脑,计算脏器湿重(mg)与每 100 g 的比值,分别记作卵巢指数和子宫指数。

5.2 血清 E_2 、FSH、LH 和下丘脑 GnRH、Ghrelin 及其受体水平检测 采用放射免疫法。大鼠断头处死后留取外周血和下丘脑,外周血于 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温静置 2 h 后低温高速离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min,离心 15 min,连续离心两次)后留取上清液,检测血清 E_2 、FSH、LH 水平。-80 $^{\circ}\text{C}$ 下剥去下丘脑组织并快速称重后于煮沸的生理盐水 1 mL 中继续煮沸 3 min,加 1 mol/L 冰醋酸 0.5 mL 于匀浆器中进行匀浆,再用 1 mol/L NaOH 0.5 mL 中和,3 500 r/min 高速离心,20 min 低温高速离心,取上清液。采用放射免疫法检测下丘脑 GnRH、Ghrelin 水平、GHSR1- α 的个数及活性。

5.3 下丘脑 Ghrelin 及 GHSR1- α mRNA 水平测定 采用 Real-time PCR 方法进行检测。(1) RNA 抽提及逆转录:从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的低温冰箱中取出下丘脑组织,采用 Trizol 法抽提 RNA,并将其逆转录为 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(2) 实时荧光定量 PCR 检测:采用 SYBR Green 染料法。引物采用 Primer premier 5.0 辅助设计,由上海生工生物工程有限公司合成,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析检测结果, $\Delta\Delta\text{Ct}$ = 样本 Ct 值平均数 - 内参 Ct 值平均数。目的基因引物序列见表 1。

5.4 下丘脑 GHSR1- α 个数及活性检测 制备 ^{125}I -Ghrelin,取 35 950/100 μL 的 CPM 试验备用。取 Ghrelin 1 250 ng/100 μL 用 pH 7.4 的缓冲液倍比稀释至 19.5 ng/100 μL ,共 7 管,将下丘脑组织用生理

盐水匀浆后以 12 000 r/min 高速离心 2 次,取上清,将蛋白含量调至 10~30 g/L,再以 12 000 r/min 离心一次后取上清,将该上清液分别取 100 μL 加入上述 7 管中,将上述反应管混匀,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 24 h,加入分离剂 25% 聚乙二醇 6000 500 μL ,混匀室温 30 min,3 500 r/min 离心 15 min 后取其沉淀测其 CPM,通过受体与配体结合方式利用 Scatchard 图分析采用相应的计算机软件计算结果,其中 Ghrelin 受体结合配体时最大的亲和常数即为 K1, Ghrelin 受体结合配体时最小的亲和常数即为 K2, Q1、Q2 表示结合位点的数目,即为配体的数目。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
β -actin	上游:5'-GACCTCTATGCCAACACAGTGC-3'	189
	下游:5'-CTGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3'	
Ghrelin	上游:5'-AAGCAGAAAGAGGCAGAGGAGAG-3'	198
	下游:5'-AGGAGGAAAGTACAGGGACCAAGTC-3'	
GHSR1- α	上游:5'-GGTCTTCTGCCTCACTGTGCTCTA-3'	116
	下游:5'-TCTTCACTGTCTGCTTGTGTTCTG-3'	

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先对数据进行正态检验和方差齐性检验,同时符合正态分布且方差齐性的数据,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;若不符合正态分布或方差不齐则采用 Kruskal-Wallis H 检验进行秩次的非参数检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠阴门开启时间及性器官指数比较 (表 2、3) 23 日龄时,模型组与生理盐水干预组大鼠阴门已基本开启(21~23 日龄),而中药干预组及正常组大鼠尚未开启。与正常组比较,模型组子宫指数明显升高(P < 0.01);与模型组与生理盐水干预组比较,中药干预组子宫指数明显降低(P < 0.01)。中药干预组卵巢指数明显低于生理盐水干预组(P < 0.05),其他组间比较,差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 2 各组大鼠阴门开启情况比较 (只)

组别	n	20 日龄	21 日龄	22 日龄	23 日龄
正常	10	0	0	0	0
模型	10	0	1	4	5
生理盐水干预	10	0	2	4	4
中药干预	10	0	0	0	0

表 3 各组大鼠性器官指数比较 (mg/100 g, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	子宫指数	卵巢指数
正常	10	55.72 $\pm$ 3.87	51.18 $\pm$ 5.00
模型	10	69.34 $\pm$ 9.60 *	49.29 $\pm$ 5.48
生理盐水干预	10	66.53 $\pm$ 6.87	55.03 $\pm$ 8.02
中药干预	10	49.71 $\pm$ 5.50 $\Delta\Delta$	44.46 $\pm$ 7.51 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与生理盐水干预组比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠外周血激素水平比较(表 4) 与正常组比较,模型组大鼠外周血 E_2 及 LH 水平明显增高,FSH 水平降低($P < 0.05$);与模型组与生理盐水干预组比较,中药干预组 E_2 和 LH 水平降低($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠外周血激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	E_2 (pg/mL)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)
正常	10	20.69 $\pm$ 2.61	17.99 $\pm$ 1.97	16.64 $\pm$ 1.10
模型	10	24.67 $\pm$ 4.05 *	15.79 $\pm$ 1.24 *	18.83 $\pm$ 1.11 *
生理盐水干预	10	24.11 $\pm$ 2.52	17.15 $\pm$ 1.38	18.81 $\pm$ 1.08
中药干预	10	19.97 $\pm$ 2.62 $\Delta\Delta$	16.47 $\pm$ 2.04	16.96 $\pm$ 1.31 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与生理盐水干预组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组大鼠下丘脑 GnRH、Ghrelin 及 GHSR1- α 水平比较(表 5、6) 与正常组比较,模型组下丘脑 Ghrelin、GHSR1- α mRNA 水平明显降低,而 GnRH 含量升高(均 $P < 0.01$)。与模型组和生理盐水干预组比较,中药干预组下丘脑 Ghrelin、GHSR1- α mRNA 升高,GnRH 含量降低($P < 0.01$)。4 组间下丘脑 Ghrelin 及受体个数及活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 各组下丘脑 GnRH、Ghrelin、GHSR1- α mRNA 及 Ghrelin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	GnRH(pg/mL)	Ghrelin mRNA	GHSR1- α mRNA	Ghrelin (pg/mL)
正常	5	18.07 $\pm$ 2.08	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.05	8.4 $\pm$ 0.97
模型	5	23.81 $\pm$ 3.99 *	0.82 $\pm$ 0.03 *	0.91 $\pm$ 0.05 *	10.29 $\pm$ 2.13
生理盐水干预	5	22.70 $\pm$ 2.52	0.87 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.03	9.60 $\pm$ 2.23
中药干预	5	18.15 $\pm$ 3.67 $\Delta\Delta$	0.96 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	1.00 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	8.99 $\pm$ 1.98

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与生理盐水干预组比较, $\Delta P < 0.01$

表 6 各组大鼠下丘脑 GHSR1- α 个数及活性比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	K_1 ($\times 10^6$ L/mol)	K_2 ($\times 10^5$ L/mol)	Q_1 ($\times 10^{17}$ 个/细胞)	Q_2 ($\times 10^{17}$ 个/细胞)
正常	5	13.34 $\pm$ 1.57	1.43 $\pm$ 0.28	1.65 $\pm$ 0.70	7.78 $\pm$ 1.15
模型	5	9.23 $\pm$ 3.43	1.73 $\pm$ 0.49	1.62 $\pm$ 0.45	7.31 $\pm$ 1.71
生理盐水干预	5	8.87 $\pm$ 2.32	1.35 $\pm$ 0.33	1.55 $\pm$ 0.49	8.00 $\pm$ 1.36
中药干预	5	10.00 $\pm$ 2.20	1.41 $\pm$ 0.35	1.55 $\pm$ 0.39	8.14 $\pm$ 1.51

注: K_1 、 K_2 为亲和常数; Q_1 、 Q_2 为有效受体个数

讨 论

青春期是儿童期向成人期过渡的特殊时期,此时体内发生一系列形态、功能、代谢以及心理、智力及行为的显著变化,最明显的是生殖系统迅速发育与成熟,这也是由多种因素参与调控下的 HPG 轴功能的成熟过程。其中,下丘脑 GnRH 脉冲性释放增多是青春期启动的起始关键,但促使其分泌增加的机制尚不明确。目前发现 GnRH 神经元同时受到多种兴奋性和抑制性神经递质、调质或因子如 Kisspeptin、 γ -氨基丁酸、神经肽 Y 等的调节,外在环境影响因素如营养、环境内分泌干扰物、光照等通过作用于相关的因子使兴奋性和抑制性分子之间的动态平衡被打破,导致青春期发育异常^[15]。

对新生 SD 大鼠 5 日龄时采用一次性微量达那唑皮下注射的干预方法制备性早熟模型,大鼠阴道脱落细胞学改变和正常的成年大鼠一致,是目前应用较多、研究较为成熟的性早熟动物模型^[12,13,16,17]。既往关于达那唑性早熟动物模型的研究显示,一次性皮下注射 25 μ L 体积比为 1:1 乙二醇/乙醇混合液并未对 5 日龄大鼠的青春期启动产生影响^[11,16,17],故在本次研究中并未设立乙二醇/乙醇混合液干预的实验动物组。本研究结果显示,模型组大鼠阴门开启明显提前,血清性激素水平明显增高,外周性腺发育较成熟,下丘脑 GnRH 含量明显增加,提示本实验中诱导早熟的动物模型制备成功。

Ghrelin 主要由胃的 X/A 样内分泌细胞(大鼠)、P/D1 型细胞(人)分泌。在脑组织中,Ghrelin 及其受体在下丘脑的弓状核、正中隆起、室旁核、内侧视前区、视交叉均有分布,上述核团亦是 Kisspeptin 和 GnRH 神经元胞体及纤维所在地,其分布特点为其参与生殖轴功能提供了解剖学依据^[18]。Ghrelin 的基因转录与生殖轴功能状态有一定关系。张文龙等^[19]研究发现,整个动情周期中,大鼠下丘脑和垂体中 Ghrelin 均处于转录活性状态,但伴随动情周期的变化具有一定的波动性:动情间期(生殖轴功能处于相对抑制的状态)其转录水平明显增加,动情期(生殖轴功能处于相对活跃状态)则降低,与 GnRH 基因的转录变化则相反;猪下丘脑 Ghrelin 基因转录伴随动情周期的变化也存在同样的变化趋势^[20],以上提示下丘脑的 Ghrelin 基因转录与机体生殖轴的功能状态密切相关。本研究显示,模型组大鼠阴门已开启时(HPG 轴功能激活,青春期发育启动),下丘脑 Ghrelin 及受体基因的转录水平较低;同龄的正常大鼠阴门未开启(HPG 功能未激活,

青春期尚未启动),其基因转录水平较高;而 Cui LL 等^[21]发现下丘脑中的 Ghrelin 参与营养状态影响青春期发育的过程。Ghrelin 及其受体同时参与机体营养、能量代谢的过程,外周血中 Ghrelin 的水平受机体进食、营养状态的影响^[22,23]。本研究中初步发现未给予饮食干预的性早熟模型大鼠在青春期启动时仅在基因转录水平呈现一定的变化,此变化可能与青春期启动有关。

本科在中医药诊疗性早熟的临床实践中发现,大多数早熟患儿在性征发育提前的同时伴有怕热、口渴、面红、烦躁易怒、五心烦热、便秘、盗汗、舌质红等 8 项阴虚火旺征象,提出“肾阴虚、相火旺”是性早熟的病机,并制订了“滋肾阴、泻相火”的治疗原则,以知柏地黄丸方药为主进行加减的滋阴泻火中药可以延缓儿童的性征发育,改善患儿的阴虚火旺证候^[7]。蔡德培等^[24]认为,亢进的 HPG 轴功能可能是性早熟患儿阴虚火旺的本质。相关的分子生物学研究提示:滋阴泻火中药可以降低青春期和性早熟大鼠下丘脑 GnRH 基因的表达^[9];降低大鼠下丘脑内侧视前区兴奋性氨基酸如门冬氨酸和谷氨酸的含量,增加抑制性 γ -氨基丁酸和神经肽类物质如神经肽 γ 和 β -内啡肽以及 Neurokinin B 等物质的释放^[25],也可抑制下丘脑内侧视前区、弓状核、室周核 Kisspeptin 基因表达,降低以上核团内 Kisspeptin 神经元的数目^[11];通过增加外周长骨骨骼板雌激素受体 α 、胰岛素样生长因子 1 及其受体基因的表达延缓骨龄发育^[26,27],由此可见滋阴泻火中药通过多靶点机制延缓青春期的启动和骨龄的发育。流行病学调查提示儿童营养状态的改善是青春期发育提前的原因之一,此现象可能与儿童后天调补太过、多食肥甘厚味之品等有关。小儿属于稚阴稚阳之体,容易出现阴阳失衡的特点,加之过于调补或嗜食肥甘厚腻之品致使肾气过早充盛,所谓“气有余便是火”,火旺而肾阴相对不足,无以制阳,肾的阴阳不平衡,造成青春期发育提前。而滋阴泻火合剂能够有效地延缓青春期的启动,但其是否具有联系机体营养状况与生殖轴功能的桥梁因子间的调节作用尚不明确。

综上,本研究显示予滋阴泻火中药干预的达那唑大鼠下丘脑 Ghrelin 及其受体 mRNA 的转录显示降低的趋势,提示滋阴泻火中药可能对参与机体营养代谢与生殖轴功能的 Ghrelin 及其受体的基因表达存在一定的调节作用。

参 考 文 献

[1] 乔晓红,俞建,傅晓燕,等.性早熟女童智力、自我意识

和行为问题分析[J].中国临床心理学杂志,2008,26(4):370-371.

- [2] Downing J, Bellis MA. Early pubertal onset and its relationship with sexual risk taking, substance use and anti-social behaviour: a preliminary cross-sectional study [J]. BMC Public Health, 2009, 3(9): 446.
- [3] Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates [J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1): 67-77.
- [4] Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Barreiro ML, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat [J]. Endocrinology, 2005, 146(7): 3018-3025.
- [5] Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, 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(5-6): 245-255.
- [6] Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, et al. Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat [J]. Neurosci Lett, 2009, 460(2): 143-147.
- [7] 时毓民,曹莲华.滋阴泻火法治疗女童性早熟症[J].辽宁中医杂志,1981,12(1):31.
- [8] 俞建,时毓民,蔡德培,等.中医药治疗女童性早熟 68 例随机双盲对照试验[J].中医杂志,2005,45(7):516-519.
- [9] 田占庄,赵宏,陈伯英.滋阴泻火中药对性早熟模型大鼠促性腺激素释放激素及其受体 mRNA 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2003,23(9):695-698.
- [10] 俞建,吴家敏,杨毅,等.滋阴泻火方对青春期大鼠性腺轴相关基因的影响[J].上海中医药杂志,2003,37(6):48-50.
- [11] Sun Y, Perry GN, Yu J, et al. Effect of nourishing yin removing fire Chinese herbal mixture on hypothalamic Kisspeptin expression in female precocious rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 127(2): 274-279.
- [12] Morishita H, Takemoto M, Kondo H, et al. Induction of true precocious puberty by neonatal treatment with Danazol in female rats [J]. Neurosci Lett, 1993, 157(1): 33-36.
- [13] 田占庄,赵宏,陈伯英.达那唑诱导的雌性性早熟大鼠 GnRH 及其受体 mRNA 的表达[J].中华内分泌代谢杂志,2003,19(5):65-67.
- [14] 陈奇主编.中药药理学研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
- [15] Plant TM. Neuroendocrine control of the onset of puberty [J]. Front Neuroendocrinol, 2015, 38: 73-88.

- [16] Tian Z, Zhao H, Sun Y, et al. Evaluation of the true precocious puberty rats induced by neonatal administration of Danazol: therapeutic effects of nourishing yin removing fire Chinese herb mixture[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005,3(1): 38.
- [17] Sun Y, Tian Z, Zhao H, et al. Characteristic of hypothalamic Kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats[J]. Neurosci Lett, 2007, 420 (1): 12 - 17.
- [18] 王琳, 方富贵, 章孝荣, 等. Ghrelin 及其 mRNA 在大鼠下丘脑和垂体上的定位[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 57 (1): 131 - 135.
- [19] 张文龙, 童德文, 邢福娜. 大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin mRNA 的表达[J]. 动物学杂志, 2009, 53 (4): 28 - 33.
- [20] Zhang W, Lei Z, Su J, et al. Expression of ghrelin in the porcine hypothalamic-pituitary-ovary axis during the estrous cycle[J]. Anim Reprod Sci, 2008,109(1-4): 356 - 367.
- [21] Cui LL, Li P, Zhu ZY. Impact of changes in post-natal nutrition on puberty onset and the expression of hypothalamic GnRH and ghrelin[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014,18(5): 703 - 709.
- [22] Casazza K, Hanks LJ, Alvarez JA. Role of various cytokines and growth factors in pubertal development[J]. Med Sport Sci, 2010,55:14 - 31.
- [23] Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, et al. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20 (20): 137 - 152.
- [24] 蔡德培, 时毓民. 性早熟女童阴虚火旺证本质的探讨[J]. 中西医结合杂志, 1991,11(7): 397 - 399.
- [25] Wang S, Zhu L, Yu J, et al. Effect of nourishing yin removing fire Chinese herbal mixture on hypothalamic NKB/NK3R expression in female precocious rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014: 217424.
- [26] 芦军萍, 蔡德培. 滋阴泻火中药对雌性青春期大鼠生长板 ER α , IGF-1R 及 EGFR 基因表达和蛋白合成的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 721 - 724.
- [27] 李斌, 向正华, 蔡德培. 中药对大鼠下丘脑生长抑素及垂体生长激素基因表达与蛋白表达的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2003,23(3): 207 - 210.

(收稿:2014-05-27 修回:2015-01-23)

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 沈自尹 雷 燕

顾 问 王永炎 邓铁涛 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 侯 灿
唐由之 曹洪欣

编辑委员

于德泉	马必生	王一涛	王卫霞	王宁生	王 伟	王 阶	王拥军(上海)	王拥军(北京)		
王昌恩	王学美	王硕仁	王 舒	车镇涛	卞兆祥	方邦江	尹光耀	邓跃毅	叶文才	史载祥
白彦萍	吕志平	吕维柏	朱元杰	朱 兵	朱明军	危北海	庄曾渊	刘干中	刘 平	刘 良
刘建平	刘建勋	刘保延	刘鲁明	齐清会	阮新民	孙汉董	孙 燕	苏 励	杨任民	杨宇飞
杨秀伟	李乃卿	李大金	李玉光	李廷谦	李军祥	李连达	李国栋	李国勤	李顺成	李 恩
李 涛	李焕荣	连 方	吴大嵘	吴万垠	吴泰相	吴根诚	吴 烈	时毓民	邱 峰	张大钊
张永贤	张永祥	张荣华	张亭栋	张家庆	张敏州	张敏建	陆付耳	陈士奎	陈小野	陈冬燕
范吉平	范维琥	林志彬	林求诚	林瑞超	郁仁存	果德安	季 光	周 俊	周霭祥	郑国庆
赵一鸣	赵伟康	赵健雄	胡义扬	胡镜清	侯凡凡	饶向荣	洪传岳	顾振纶	栗原 博(日本)	
徐凤芹	徐治鸿	徐 浩	殷惠军	郭 军	郭赛珊	唐旭东	凌昌全	黄光英	黄晓愚	黄 熙
黄璐琦	梅之南	曹小定	崔 红	麻 柔	梁晓春	梁繁荣	葛秦生	董竞成	董福慧	韩济生
谢竹藩	谢明村	谢 恬	蔡定芳	裴正学	廖福龙	衡先培	戴瑞鸿	Yung-chi CHENG(美国)		

Sheng-xing MA(美国) Qun-hao ZHANG(美国)

(以上名单按姓氏笔画为序)