

复幼颗粒对SD雌鼠性早熟治疗作用及相关机制

胡凯丽¹, 孙文燕¹, 李玉¹, 张波¹, 张萌², 郭春彦², 赵立波², 王晓玲^{2*}, 畅洪昇^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 首都医科大学附属北京儿童医院, 北京 100045)

[摘要] 目的:研究复幼颗粒对达那唑诱导大鼠性早熟模型的作用和有关机制。方法:将21窝SD雌鼠随机分为正常组,模型组,亮丙瑞林组(0.1 g·kg⁻¹)和复幼合剂组(37.9 g·kg⁻¹),复幼颗粒高、中、低剂量组(17.0, 8.5, 4.3 g·kg⁻¹)。于5日龄时注射达那唑300 μg建立性早熟模型,造模10 d后,开始给药干预。20日龄时开始检查阴道开口情况,通过苏木素-伊红(HE)染色观察性腺发育情况;通过放射性免疫检测血清中黄体生成素(LH),卵泡刺激素(FSH),雌二醇(E₂)的含量;通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH), Kiss-1, G蛋白偶联受体54(GPR54) mRNA表达。通过免疫组化检测下丘脑GnRH细胞表达情况。结果:与正常组比较,模型组阴道开口显著提前,子宫,卵巢系数明显增加(P<0.05),表明达那唑诱导性早熟模型成功建立, GnRH, Kiss-1, GPR54表达也均明显增加(P<0.05),表明达那唑模型可以提前启动下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴,从而诱发性早熟。与模型组比较,复幼颗粒中剂量组可显著延缓阴道开口时间(P<0.01),复幼颗粒高剂量可明显减轻子宫壁厚、子宫系数(P<0.05, P<0.01),中剂量可减轻卵巢系数和子宫壁厚(P<0.05),复幼颗粒高、中、低剂量均能明显下调血清激素E₂, LH, FSH的含量(P<0.05, P<0.01),降低下丘脑GnRH, Kiss-1, GPR54 mRNA的表达(P<0.05, P<0.01),降低GnRH细胞的表达水平(P<0.05)。结论:复幼颗粒可通过调节Kiss-1/GPR54系统,下调GnRH的表达从而抑制HPG轴的启动达到治疗性早熟目的。

[关键词] 复幼颗粒; 性早熟; Kiss-1/G蛋白偶联受体54(GPR54)系统; 促性腺激素释放激素(GnRH); 下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0039-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202203

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200923.1006.001.html>

[网络出版日期] 2020-9-23 10:41

Study on Therapeutic Effect and Related Mechanism of Fuyou Granule on Precocious Puberty in SD Female Rats

HU Kai-li¹, SUN Wen-yan¹, LI Yu¹, ZHANG Bo¹, ZHANG Meng², GUO Chun-yan², ZHAO Li-bo²,
WANG Xiao-ling^{2*}, CHANG Hong-sheng^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and related mechanism of Fuyou granule on danazol-induced precocious puberty model in rats. **Method:** Totally 21 cages of SD female rats were randomly divided into normal group, model group, Leuprorelin(0.1 g·kg⁻¹) and Fuyou mixture group(37.9 g·kg⁻¹), and high-dose, mid-dose and low dose Fuyou granule groups(17.0, 8.5, 4.3 g·kg⁻¹). Rats at 5 days of age were given a single subcutaneous injection of 300 μg danazol to establish the precocious puberty model. After 10 days of modeling, drug intervention was started. Vaginal opening was examined at the age of 20 days, and the gonadal development

[收稿日期] 20200701(013)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721003-002-001);首都卫生发展科研专项(首发2018-2-2097)

[第一作者] 胡凯丽,在读硕士,从事方向为性早熟疾病研究, E-mail: hkl1024@163.com

[通信作者] * 畅洪昇,副教授,从事神经和性早熟疾病研究, E-mail: chs1971@sina.com;

* 王晓玲,主任药师,副教授,硕士生导师,从事临床药学、临床药理研究, E-mail: wangxiaoling@bch.com.cn

was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of serum luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol (E_2) were determined by radioimmunoassay. The mRNA expressions of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH), Kiss-1, G protein-coupled receptor 54 (GPR54) were detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the expression of GnRH cells in the hypothalamus was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group, the vaginal opening of the model group was significantly earlier, and the uterus and ovarian coefficients were significantly increased ($P<0.05$), indicating that the danazol-induced precocious puberty model was successfully established. The expression levels of GnRH, Kiss-1, and GPR54 also increased significantly ($P<0.05$), indicating that the danazol model can activate the HPG axis in advance, thereby inducing precocious puberty. Compared with the model group, the mid-dose Fuyou granule group significantly delayed the time of vaginal opening ($P<0.01$), high-dose Fuyou granule group significantly reduced uterine wall thickness and uterine coefficient ($P<0.05, P<0.01$), mid-dose group reduced ovarian coefficient and uterine wall thickness ($P<0.05$). All the three dosage groups of Fuyou granule significantly reduced the content of serum hormones E_2 , LH and FSH ($P<0.05, P<0.01$), reduced the expression levels of hypothalamic GnRH, Kiss-1 and GPR54 mRNA ($P<0.05$), and decreased the expression of GnRH cells ($P<0.05$). **Conclusion:** Fuyou granule can achieve therapeutic precocity by regulating the Kiss-1/GPR54 system and down-regulating the expression of GnRH to inhibit the activation of the HPG axis.

[Key words] Fuyou granule; precocious puberty; Kiss-1/G protein-coupled receptor 54 (GPR54); hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH); hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis

性早熟是指儿童青春期提前启动,生长发育异常的一种内分泌紊乱疾病,一般以女童在8岁,男童在9岁之前出现第二性征为判定界限^[1]。女童的患病率远高于男童,为男童的5~10倍^[2-3]。根据发病机制,性早熟可细分为中枢性性早熟,外周性性早熟,和不完全性早熟。以下丘脑-垂体-性腺轴(HPGA)提前启动引起的中枢性性早熟最为常见^[4]。西药促性腺激素释放激素类(GnRH-a)是治疗中枢性性早熟的一线药物,其治疗性早熟疗效虽值得肯定,但其治疗费用昂贵并且伴有一系列副作用,如局部红斑、暂时性阴道出血、骨质疏松、高脂血症等^[5-7]。

中药治疗性早熟安全有效^[8],并且在抑制促黄体生成素(LH)的效果上,中药的效果较西药好^[9]。中医认为性早熟与肝、肾、脾密切相关,主要病机为肝经湿热,脾肾不足,阴不潜阳,相火妄动。常以滋阴泻火、疏肝解郁、化痰散结为治疗原则^[10]。根据中医理论,北京儿童医院研制了复幼合剂,研究表明,复幼合剂对于女童真性性早熟具有显著的治疗作用^[11-12]。复幼颗粒是在复幼合剂上做剂型和药方改良的新复方。用黄柏苦寒之性清下焦之火;知母苦甘寒之性滋阴泻火;生地黄、炙鳖甲甘寒之性滋阴益肾;夏枯草辛苦寒之性清肝热,散郁结;地骨皮性淡而寒,宜清下焦肝肾虚火;龙胆草苦寒,善走肝

胆、下焦,宜泻肝降火,清利下焦湿热;诸药合用共奏滋补肝肾、清热泻火,疏肝解郁的功效。已经显示其在治疗女童性早熟上疗效显著,但其主要作用机制仍未知,且缺少相关实验数据及理论依据的支持,本研究旨在通过建立达那唑诱导性早熟模型探究复幼颗粒治疗性早熟的作用机制。为临床上复幼颗粒治疗性早熟提供更多实验数据支撑。

1 材料

1.1 动物 清洁级5日龄SD新生雌鼠,21窝(共126只,其中雌鼠107只),体质量7~9g,购于北京斯贝福生物技术有限公司,许可证号SYXK(京)2016-0038。每笼出生鼠由亲母自养,每笼6只,若每笼出生雌鼠数量不足6只,则用该亲母生的雄仔鼠凑足6只,确保每笼内饲养密度一致。将动物饲养在相对湿度约为42%,温度为24℃且光照/黑暗周期为12h的房间中。该研究得到北京中医药大学研究伦理委员会的批准,并按照实验室动物护理和实验认可标准进行实验操作,动物伦理审查编号BUCM-4-2019110801-4307。

1.2 药物与试剂 复幼颗粒由知母、生地黄、玄参、鳖甲、黄柏、地骨皮、牡丹皮、泽泻、夏枯草、龙胆草、麦芽等组成,以上药材均购置北京本草方源药物有限公司。经北京本草方源药物有限公司研究助理王颖鉴定为正品。颗粒由河北神威药业有限公司

生产,每g相当于生药3.03g。复幼合剂由北京儿童医院提供(批号182004);亮丙瑞林(上海丽珠制药有限公司,批号190813);达那唑,4%吕氏碱性美蓝染色液(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为Z18J10J93407,L10M10G88019);4%多聚甲醛(南京凯基生物科技发展有限公司,批号20191031);RNA提取试剂盒(广州美基生物科技有限公司,批号R4111-02);反转录试剂盒(美国Thermo Scientific公司,批号00757430);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国Invitrogen公司,批号1908593);LH,雌二醇(E₂),促卵泡生成素(FSH)放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号均为20200102);GnRH抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号SC-32292);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB23301);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号202005)。

1.3 仪器 TS2R型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);CFX96™型Optics Module Real-time PCR, T100™型Thermal Cycler PCR机(美国Bio-Rad公司);UV-2000型紫外分光光度计(上海尤尼柯公司);GL-21M型低温离心机(卢湘仪器厂);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);GT1001型组化笔(美国基因泰克公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将21窝雌鼠(总共126只,其中雌鼠107只)随机分为正常组、模型组、亮丙瑞林组、复幼合剂组、复幼颗粒高剂量组、复幼颗粒中剂量、复幼颗粒低剂量组,共7组。母乳喂养至23日龄。在第5日龄时,除正常组外,其余6组均一次性皮下注射达那唑溶液25 μL,以建立性早熟模型,溶液配制方法为每300 μg达那唑溶于25 μL乙醇-乙醇溶液(1:1, V/V)^[13-14]。造模10 d后,阳性药组皮下注射亮丙瑞林,剂量为100 μg·kg⁻¹。复幼合剂、复幼颗粒组每天给予相应中药灌胃。正常、模型组灌胃给予等量生理盐水。20日龄时每天上午定时观察各组阴道开口情况,对已阴道开口的雌鼠进行阴道脱落细胞涂片检查,在出现一个完整的动情周期后,于动情间期处死。同时其他各组按1:1处死。其中复幼合剂、复幼颗粒中剂量以临床上6岁女童用量折算而成,为8.5 g·kg⁻¹。复幼颗粒高剂量为中剂量的2倍(17.0 g·kg⁻¹),低剂量为中剂量的1/2倍(4.39 g·kg⁻¹)。采用以下公式^[15]换算中药的给

药剂量。每隔3天称1次体质量,重新计算1次给药量。换算公式为 $d_b=d_a \times R_b/R_a \times (W_a/W_b)^{1/3}$ 。式中 d_b 为求算的动物/人的kg体质量剂量, d_a 为已知动物/人的kg体质量剂量, W_a, W_b 是已知人/动物的体质量(单位一致), R_a, R_b 是已知人/动物的体型系数。

2.2 指标和检测方法

2.2.1 子宫系数、卵巢系数、子宫壁厚、卵巢黄体生成率测定 大鼠处死后,解剖取出子宫和卵巢并称质量,以评估器官系数[$\text{mg} \cdot (100 \text{g})^{-1}$]。随后,将子宫、卵巢样品用多聚甲醛固定,用石蜡包埋,切片,并用HE染色。检测子宫壁厚和卵巢黄体生成率。

2.2.2 血清激素水平检测 麻醉后,腹主动脉取血,4℃离心取血清,在-20℃保存直至分析,根据说明书测定血清E₂,FSH和LH水平,E₂试剂盒的灵敏度为5 ng·L⁻¹,批内精密密度<10%,批间精密密度<15.2%。LH试剂盒的灵敏度为0.2~5.0 U·L⁻¹,批内精密密度2.0%~2.4%,批间精密密度为4.2%~7.5%。FSH试剂盒的灵敏度为0.25 U·L⁻¹,批内精密密度为2.2%~2.5%,批间精密密度为3.7%~8.7%。

2.2.3 Real-time PCR检测下丘脑GnRH, Kiss-1, GPR54 mRNA表达 各组挑出9个样本,通过Real-time PCR检测各组大鼠下丘脑GnRH, Kiss-1, GPR54 mRNA的水平,根据HiPure Total RNA Mini Kit的说明提取总RNA,使用紫外分光光度计测量RNA浓度。根据说明书,使用Reveraid First Strand cDNA Synthesis试剂盒和power sybr green pcr master mix在T100 Thermal Cycler PCR机上进行逆转录。在Real-time PCR机上进行扩增和定量检测。Real-time PCR条件如下,在95℃下初始变性10 min,然后在95℃下变性10 s,最后在55℃下退火并延伸30 s,(Kiss-1/GPR54的退火温度为60℃)总共进行50个循环,加样时,每一个样品做3个复孔。选择β-肌动蛋白(β-actin)作为内参,引物由北京博迈德基因技术有限公司合成,使用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达水平。引物序列见表1。

2.2.4 免疫组化检测下丘脑GnRH细胞的表达 取大鼠脑组织用4%多聚甲醛灌注固定,常规冠状位石蜡切片,二甲苯脱蜡,切片置于柠檬酸抗原修复缓冲液进行抗原修复,3%双氧水溶液孵育阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,在切片上滴加磷酸盐缓冲液(PBS)按1:100配好的一抗(1:100)4℃孵育过夜,二抗(1:200)室温孵育50 min, DAB显色,苏木素复染3 min左右,用梯度乙醇脱水,中性树胶封片。镜检,苏木素染细胞核为蓝色, DAB显出的阳

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GNRH	上游 GGAGCTCTGGAACGTCTGATT	100
	下游 CAGCGTCAATGTCACACTCG	
KISS-1	上游 GCTGCTGCTTCTCCTCTGTGT	88
	下游 CTGTTGGCCTGTGGGTTCA	
GPR54	上游 GCGGCCACAGATGTCACCTTT	70
	下游 AGGTGGGCAGCGGATAGAG	
β-actin	上游 TGACAGGATGCAGAAGGAGA	104
	下游 TAGAGCCACCAATCCACACA	

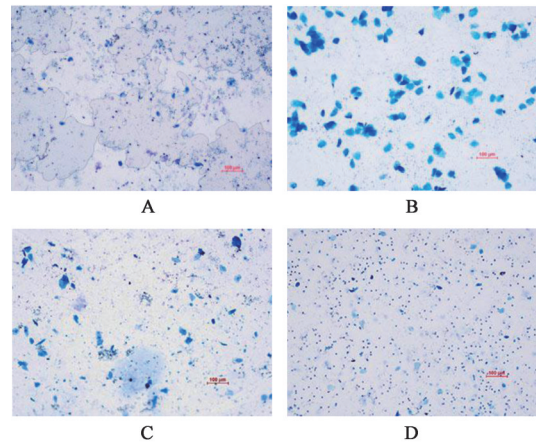
性表达为棕黄色,采集图像,用Image-Pro Plus进行分析。

2.3 统计学方法 使用SAS 8.2软件来进行统计分析,当数据符合正态分布时,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,多重比较采用LSD检验进行统计,2组间比较采用独立样本t检验,非正态分布的数据使用非参数检验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阴道开口的时间和阴道细胞涂片 观察各组间阴道开口情况,直至处死最后1d即29日龄时,正常组仍未出现阴道开口。模型组平均阴道开口时间,与正常组相比显著提前,说明达那唑诱导性早熟模型建立成功。与模型组比较,亮丙瑞林组、复幼合剂组、复幼颗粒中剂量组有延缓阴道开口的效果,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。对阴道开口的动物每日进行阴道细胞涂片检查,可见规

律的性周期出现。通常一个规律的性周期包括动情前期、动情期、动情后期和动情间期。动情前期主要以有核上皮细胞为主,动情期以角化上皮细胞为主,动情后期同时存在等量的核上皮细胞、角化细胞、白细胞。动情间期主要以白细胞为主。见图1。



A. 动情前期; B. 动情期; C. 动情后期; D. 动情间期

图1 大鼠动情周期阴道涂片(0.4%碱性美蓝,×10)

Fig. 1 Vaginal smears of rats at estrous cycle (0.4% Methylene blue, ×10)

3.2 对性早熟大鼠子宫、卵巢系数的影响 与正常组比较,模型组子宫、卵巢系数显著升高($P < 0.01$),表明达那唑可促进子宫、卵巢的提前发育。与模型组比较,亮丙瑞林组子宫、卵巢系数均显著下降($P < 0.01$),复幼颗粒高剂量组可明显降低子宫系数($P < 0.05$),中剂量组可明显降低卵巢系数($P < 0.05$)。其他各组系数与模型组相比有降低趋势,但未出现显著性差异。见表2。

表2 复幼颗粒对性早熟大鼠阴道开口、子宫系数、卵巢系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Fuyou granule on vaginal opening, uterine coefficient and ovarian coefficient in precocious rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	阴道开口/d	子宫系数/×10 ⁻⁵	卵巢系数/×10 ⁻⁵
正常		15	—	64.332±13.860	21.503±1.675
模型		17	20.118±0.322	86.367±32.881 ¹⁾	24.679±4.111 ¹⁾
亮丙瑞林	0.1	14	21.071±1.033 ⁴⁾	22.030±4.665 ^{2,4)}	9.580±3.152 ^{2,4)}
复幼合剂	37.9	15	20.933±1.062 ⁴⁾	71.830±17.294	22.551±3.305
复幼颗粒	17.0	15	20.533±0.806	65.908±14.489 ³⁾	21.742±3.456
	8.5	16	20.813±0.726 ⁴⁾	75.987±36.982	20.178±3.465 ³⁾
	4.3	15	20.133±0.340	76.963±16.748	22.086±3.015

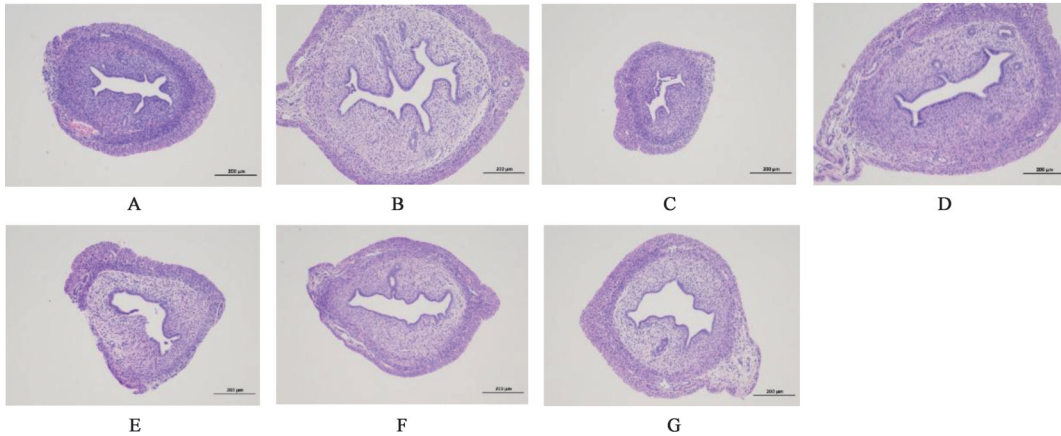
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表5同)。

3.3 对性早熟大鼠子宫壁厚度、卵巢黄体生成数的影响 从每组中挑选10个样本做病理切片,观察子宫、卵巢的发育情况。观察病理切片,模型组子

宫、卵巢较正常组结构层次分明,细胞形态正常,无明显的病理变化。表明达那唑对性器官不会造成病理性增长。与模型组比较,复幼颗粒高、中剂

量组子宫壁厚度明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 差异有显著统计学意义。其中亮丙瑞林抑制效果最为显著($P<0.01$)。各组卵巢发育情况大致相同, 均

可见初级、次级、成熟卵泡。各组的卵巢黄体数均较少, 未产生差异, 因此不做予统计。见图2, 3, 表3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 亮丙瑞林组; D. 复幼合剂组; E. 复幼颗粒高剂量组; F. 复幼颗粒中剂量组; G. 复幼颗粒低剂量组(图3, 4同)

图2 复幼颗粒对性早熟大鼠子宫形态的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Fuyou granule on uterine morphology in precocious rats(HE, $\times 100$)

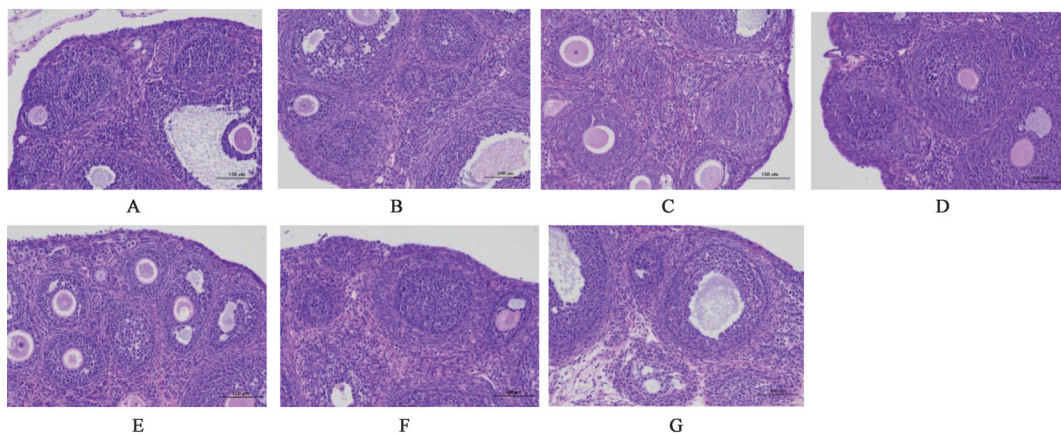


图3 复幼颗粒对性早熟大鼠卵巢形态的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Fuyou granule on ovarian morphology in precocious rats(HE, $\times 200$)

表3 复幼颗粒对性早熟大鼠子宫壁厚的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Fuyou granule on uterine wall thickness in precocious rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	子宫壁厚/mm
正常		8	0.349 \pm 0.038
模型		10	0.413 \pm 0.083
亮丙瑞林	0.1	8	0.204 \pm 0.056 ^{1,3)}
复幼合剂	37.9	9	0.419 \pm 0.086
复幼颗粒	17.0	9	0.303 \pm 0.068 ³⁾
	8.5	10	0.336 \pm 0.049 ²⁾
	4.3	9	0.359 \pm 0.048

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4同)。

3.4 对性早熟大鼠血清激素的影响 与正常组比较,模型组 E_2 , LH, FSH均显著升高($P<0.01$),符合性早熟病证。与模型组比较,亮丙瑞林仅LH的水平明显降低($P<0.05$),复幼合剂可明显抑制造模后的血清激素的升高($P<0.05$, $P<0.01$)。复幼颗粒高、中剂量组可明显抑制 E_2 , LH的分泌($P<0.05$, $P<0.01$),对FSH的抑制效果不显著。复幼颗粒低剂量组对于3种血清激素均产生显著的抑制作用($P<0.01$)。见表4。

3.5 对性早熟大鼠下丘脑GnRH, Kiss-1, GPR54 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组下丘脑GnRH, Kiss-1 mRNA的表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),GPR54较正常组比较也有上升趋势。与模型

表4 复幼颗粒对性早熟大鼠血清激素的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Fuyou granule on serum hormone in precocious rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	E ₂ /ng·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹
正常		15	31.954±20.476	8.126±3.917	2.175±1.115
模型		17	57.179±25.251 ¹⁾	13.156±2.559 ¹⁾	3.300±1.031 ¹⁾
亮丙瑞林	0.1	14	48.972±26.945	10.611±3.856 ²⁾	3.212±1.054
复幼合剂	37.9	15	31.252±14.121 ³⁾	8.953±4.035 ³⁾	2.578±0.445 ³⁾
复幼颗粒	17.0	15	39.933±15.294 ²⁾	7.923±3.894 ³⁾	2.767±0.849
	8.5	16	39.391±17.820 ²⁾	9.797±2.368 ³⁾	2.731±0.953
	4.3	15	30.086±17.017 ³⁾	8.405±3.285 ³⁾	2.221±0.697 ³⁾

组比较,复幼颗粒高剂量对于GnRH,Kiss-1 mRNA的表达明显降低($P<0.05$),而复幼颗粒中、低剂量组对于抑制Kiss-1,GPR54 mRNA表达明显降低($P<$

$0.05, P<0.01$)。亮丙瑞林效果最为显著,可显著抑制GnRH,Kiss-1,GPR54的表达($P<0.01$),复幼合剂与模型组比较差异无统计学意义。见表5。

表5 复幼颗粒对性早熟大鼠下丘脑GnRH,Kiss-1,GPR54 mRNA的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Fuyou granule on GnRH, Kiss-1 and GPR54 mRNA in hypothalamus of precocious rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GnRH	Kiss-1	GPR54
正常		1.046±0.333	1.120±0.385	1.059±0.324
模型		5.277±2.801 ²⁾	1.747±0.526 ¹⁾	1.414±0.390
亮丙瑞林	0.1	1.658±1.035 ⁴⁾	0.796±0.326 ⁴⁾	0.801±0.200 ⁴⁾
复幼合剂	37.9	3.893±2.072	2.018±1.315	1.831±1.529
复幼颗粒	17.0	2.089±1.651 ³⁾	0.732±0.607 ³⁾	1.390±1.109
	8.5	2.994±2.474	0.892±0.457 ⁴⁾	0.869±0.541 ³⁾
	4.3	2.828±1.831	0.676±0.293 ⁴⁾	0.823±0.578 ³⁾

3.6 对性早熟大鼠下丘脑GnRH蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组GnRH细胞的平均吸光度明显增加($P<0.05$),亮丙瑞林组可显著抑制模型后GnRH细胞的积分吸光度($P<0.01$),各中药给药组也明显降低GnRH细胞的积分吸光度($P<0.05$)。显微镜下可见深浅不等的棕黄色GnRH阳性细胞,细胞结构清晰,核仁明显,且以Broca斜角带分布最为集中。见表6,图4。

表6 复幼颗粒对性早熟大鼠下丘脑GnRH细胞表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Fuyou granule on GnRH cells expression in hypothalamus of precocious rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	积分吸光度
正常		0.048±0.015
模型		0.067±0.006 ¹⁾
亮丙瑞林	0.1	0.052±0.007 ³⁾
复幼合剂	37.9	0.050±0.011 ²⁾
复幼颗粒	17.0	0.046±0.012 ²⁾
	8.5	0.057±0.006 ²⁾
	4.3	0.053±0.010 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

性早熟是一种由GnRH神经元提前活化而导致的生长发育异常性疾病,GnRH是存在于下丘脑内侧的十肽小分子^[16],在神经系统和内分泌系统之间起着重要的连接作用,通过与垂体前叶促性腺激素细胞表面高亲和力的GnRH受体(GnRH-R)结合,驱动垂体释放GTH,包括LH和FSH。促性腺激素又作用于卵巢或睾丸分泌雌二醇或睾酮等性激素,促进性腺发育,最终进入青春期。本研究采用3组不同剂量的复幼颗粒。以亮丙瑞林作为西药对照组,亮丙瑞林是一种黄体生成素类似物,大量外源LH,可以对垂体-性腺功能产生抑制,减少促性腺激素的释放,是临床上常用的一种治疗药。复幼合剂是由北京儿童医院提供的旧方,复幼颗粒是在其基础上进行改良的复方。复幼合剂在临床上治疗女童性早熟上疗效显著^[11-12],以其作为本实验的中药对照组。

研究表明,对新生幼鼠给予达那唑可以快速的促进HPG轴的启动^[17],使其提前进入青春期。本实验以达那唑给药5日龄SD雌鼠以建立性早熟模型。为了检测模型是否建立成功,检测了阴道开口、子

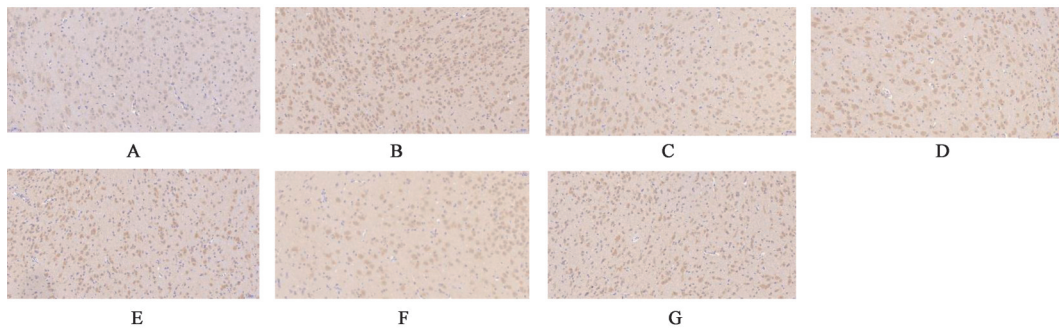


图4 复幼颗粒对性早熟大鼠下丘脑GnRH细胞表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of Fuyou granule on GnRH cells expression in hypothalamus of precocious rats (IHC,×200)

宫、卵巢系数、子宫壁厚等。结果显示,模型组可提前阴道开口时间,增加子宫、卵巢系数,子宫壁厚。表明达那唑诱导性早熟模型成功建立。复幼颗粒可显著抑制造模后引起的阴道开口提前,子宫、卵巢系数增高,子宫壁厚增加。提示复幼颗粒可明显延缓大鼠青春期的启动,抑制外周性腺的发育。而复幼合剂在子宫、卵巢指标上与模型组比较有降低趋势但未见显著性差异,说明复幼颗粒治疗效果在一定程度上比旧方复幼合剂的好。

血清激素是临床上反映药效的最直观指标^[18-19],造模后各组血清LH,FSH,E₂含量升高,经给药后,复幼颗粒、复幼合剂组均可显著抑制造模后的血清激素升高,以复幼颗粒低剂量最低。而亮丙瑞林组仅LH产生显著性差异,在FSH,E₂上未产生显著性差异,可能是受动物生长周期和生理周期的影响,同一日期,动物可能处于不同的动情周期,导致组内数据差距较大而不能很好的反应情况^[20-21]。

GnRH是HPG轴行使功能的使动因素和核心物质^[22],该神经元的激活受多种神经肽的调节。已有不少文献研究表明Kiss-1/GPR54系统与GnRH的释放密切相关。GPR54是视紫红家族的G蛋白偶联受体^[23],是调控青春发育的关键分子。其内源性配体是Kiss-1基因编码产物kisspeptin。通过向绵羊脑内注射kisspeptin10,在脑脊液中可直接观察到大量GnRH,并伴随着血清LH的升高^[24]。已经被证明,GPR54功能丧失的患者,其性腺功能低下,性腺机能减退。通过GnRH/GPR54双标记原位杂交发现在大鼠中GPR54与GnRH神经元共定位表达^[25]。提示Kiss-1基因编码产物kisspeptin与GPR54结合可直接作用于GnRH神经元进而促进GnRH的表达,从而导致生殖系统的发育。为了探讨复幼颗粒对性早熟的作用机制,本研究检测了下丘脑GnRH,Kiss-1,GPR54 mRNA和GnRH细胞的表达。免疫

组化结果显示,与模型组比较,各组GnRH阳性细胞表达均降低,与GnRH mRNA表达结果一致。复幼颗粒可抑制造模后GnRH,Kiss-1,GPR54 mRNA的升高。但是模型组、复幼颗粒组在这3个指标上未产生一致的作用趋势。与正常组比较,模型组GnRH,Kiss-1显著升高,GPR54有升高趋势,但差异无统计学意义。复幼颗粒中、低剂量组可显著降低Kiss-1,GPR54的表达,但是GnRH表达未见显著性。复幼颗粒高剂量组可显著降低GnRH,Kiss-1的表达,而GPR54差异无统计学意义。有文献报导,GPR54对GnRH表达的影响不仅仅与GPR54的表达有关,还可能与GPR54受体功能特性有关^[26]。因此,对GnRH表达的影响,与GPR54的数量并无绝对关系。并且生物的遗传信息表达需经过转录、翻译等一系列环节,需要经过一定的过程,即青春期的发育过程,GnRH,Kiss-1,GPR54 mRNA的表达处于一个不同步的状态^[4]。猜测这可能是造成以上指标差异不同步现象的原因。

综上,本研究提示复幼颗粒可以通过下调下丘脑Kiss-1,GPR54 mRNA的表达,进而减少GnRH的分泌,从而延缓HPG轴的启动,达到治疗性早熟的目的。目前中药治疗性早熟主要从“肾”入手,以滋阴泻火方最为常用,而采用以“肝”“肾”入手,用复幼颗粒治疗性早熟的实验性研究显示报告鲜少。本次研究提示中药复方治疗性早熟可以从多角度入手,同时也为复幼颗粒在临床上的应用提供了相关数据和理论支撑。但是在本实验中,各剂量间未产生量效关系,仍需进一步研究分析。

[参考文献]

- [1] SORIANO-GUILLÉN L, ARGENTE J. Central precocious puberty, functional and tumor-related[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(3): 101262.

- [2] KLEIN KAREN O, AHMED M, BONAFEDE M, et al. Treatment patterns, health resource utilization and costs among central precocious puberty patients treated with leuprolide or histrelin: an examination of the commercial and medicaid populations[J]. *J Med Econ*, 2020, 23(4):407-414.
- [3] 冯凡, 曹卫平, 白玲, 等. 镇江市城区4~10岁儿童性早熟发育的现状调查及其危险因素分析[J]. *中国儿童保健杂志*, 2018, 26(6):651-653.
- [4] 陈永霞, 程敏, 缪云萍, 等. 大补阴丸对真性性早熟模型大鼠的治疗作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(1):47-51.
- [5] LI W J, GONG C X, GUO M J, et al. Efficacy and safety of domestic leuprorelin in girls with idiopathic central precocious puberty: a multicenter, randomized, parallel, controlled trial [J]. *China Med J*, 2015, 128(10):1314-1320.
- [6] CANTAS-ORSDEMIR S, EUGSTER E A. Update on central precocious puberty: from etiologies to outcomes [J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2019, 14(2):123-130.
- [7] YU C H, LIU P H, VAN Y H, et al. Traditional Chinese medicine for idiopathic precocious puberty: a hospital-based retrospective observational study [J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22(2):258-265.
- [8] 李康健, 王璋, 周期, 等. 基于数据挖掘研究性早熟的中药用药规律[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(4):777-782.
- [9] 欧光顺, 王舒雅, 陈虹, 等. 中药治疗女童性早熟有效性及安全性的系统评价[J]. *儿科药学杂志*, 2015, 21(9):8-13.
- [10] 张叶, 李竞成, 胡淑萍. 女童特发性性早熟中医证候特点综述[J]. *中医儿科杂志*, 2019, 15(6):117-120.
- [11] 刘慧丽, 柳静, 刘桂琴. 复幼合剂治疗女童真性性早熟60例临床研究[J]. *北京中医药*, 2009, 28(8):588-589, 611.
- [12] 潘宇琛, 柳静, 刘慧丽. 中药复幼合剂治疗女童卵巢囊肿合并性早熟的临床观察[J]. *北京中医药*, 2019, 38(7):700-703.
- [13] 戴方伟. 达那唑诱导雌性大鼠性早熟模型的建立及其评估[D]. 杭州:浙江大学, 2009.
- [14] 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.
- [15] 陈琦. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:33-34.
- [16] PLANT T M. Neuroendocrine control of the onset of puberty[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2015, 38:73-88.
- [17] TIAN Z 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.
- [18] LEE H L, LEE Y B, CHOI J Y, et al. Herbal medicine for idiopathic central precocious puberty: a protocol for a systematic review of controlled trials [J]. *Medicine*, 2018, 97(13):267.
- [19] SILVERMAN L A, NEELY E K, KLETTER G B, et al. Long-term continuous suppression with once-yearly histrelin subcutaneous implants for the treatment of central precocious puberty: a final report of a phase 3 multicenter trial [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(6):2354-2363.
- [20] 程敏, 叶小弟, 缪云萍, 等. 大补阴丸治疗雌性大鼠真性性早熟的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(3):386-390.
- [21] 孙青, 李海浪, 郑意楠, 等. 滋阴泻火方对性早熟模型大鼠下丘脑-垂体-性腺轴的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(1):39-41, 58.
- [22] STAMATIADIS G A, KAISER U B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: signaling and gene expression [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 463:131-141.
- [23] LEE D K, NGUYEN T, O'NEILL G P, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors [J]. *FEBS letters*, 1999, 446(1):103-107.
- [24] MESSENGER S, CHATZIDAKI E E, MA D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5):1761-1766.
- [25] IRWIG M S, FRALEY G S, SMITH J T, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat [J]. *Neuroendocrinology*, 2004, 80(4):264-272.
- [26] WACKER J L, FELLER D B, TANG X B, et al. Disease-causing mutation in GPR54 reveals the importance of the second intracellular loop for class A G-protein-coupled receptor function [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):3106-3178.

[责任编辑 周冰冰]