

· 实验研究 ·

Kiss-1 在雌性性早熟大鼠下丘脑中 mRNA 的表达

刘小辉, 刘方, 夏治, 林汉华

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨 Kiss-1 在雌性性早熟大鼠不同时期下丘脑中 mRNA 的表达。方法 正常 5 日龄清洁级 Sprague-Dawley 雌性大鼠 40 只, 随机分为 4 组, 对照 1 组 (正常青春前期), 对照 2 组 (正常青春早期), 模型 1 组 (青春早期), 模型 2 组 (青春中期), 每组 10 只, 达那唑 300 μg 皮下注射以诱导真性性早熟。半定量 RT-PCR 法检测对照 1 组, 对照 2 组, 模型 1 组, 模型 2 组的 Kiss-1 mRNA 的表达。结果 与对照 1 组相比, 模型 1 组和模型 2 组下丘脑 Kiss-1 mRNA 水平分别增加了 1.4 和 2.8 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。模型 2 组大鼠下丘脑 Kiss-1 mRNA 表达水平高于模型 1 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。对照 2 组与模型 1 组的 Kiss-1 mRNA 的表达差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 Kiss-1 mRNA 的表达与生长发育的时期密切相关, 提示 Kiss-1 可能与真性性早熟的发生有关。
[中国当代儿科杂志, 2007, 9(1): 59-62]

[关键词] Kiss-1; 真性性早熟; 基因表达; RT-PCR; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)01-0059-04

Expression of Kiss-1 mRNA in the hypothalamus of true precocious female rats

LIU Xiao-Hui, LIU Fang, XIA Zhi, LIN Han-Hua. Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Email: hhlhlin@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the gene expression of Kiss-1 in the hypothalamus of true precocious female rats at various stages of development. **Methods** Forty 5-day-old normal female Sprague-Dawley rats were randomly assigned into four groups of 10 rats: Control group 1, Control group 2, Model group 1 and Model group 2. The rats from the two model groups were injected with 300 μg of danazol at 5 days of age to induce true precocious puberty. The two control groups were injected with normal saline instead. For the determination of Kiss-1 mRNA expression in the hypothalamus, the rats of the Model group 1 were sacrificed during the first diestrus (early puberty) and meanwhile the rats of the Control group 1 were sacrificed when they were at prepuberty; the Control group 2 rats were sacrificed at the first diestrus (early puberty); the rats of the Model group 2 were sacrificed during the second diestrus (middle puberty). The expression of Kiss-1 mRNA in the hypothalamus in the four groups was detected using semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Kiss-1 mRNA expression in the hypothalamus in Model group 1 and Model group 2 increased by 1.4-fold and 2.8-fold, respectively, compared with that of Control group 1 ($P < 0.05$). Model group 2 showed significantly higher Kiss-1 mRNA levels than Model group 1 ($P < 0.05$). There were no statistical differences in the Kiss-1 mRNA expression between Control group 2 and Model group 1. **Conclusions** Gene expression of Kiss-1 is associated with the developmental period of true precocious puberty, suggesting that Kiss-1 might play a role in the pathogenesis of this disorder.
[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 9(1): 59-62]

Key words: Kiss-1; True precocious puberty; Gene expression; RT-PCR; Rats

Kiss-1 是一种与青春期相关的基因, 在雌性大鼠下丘脑的弓状核 (ARC), 视前区 (POA), 前腹室周核 (AVPV) 及下丘脑的其他核团均有表达^[1]。Kiss-1 的编码产物 Kisspeptin 与其受体 GPR54 结合后主要通过作用于 GnRH 神经元, 而导致青春期的启动^[2]。近年来性早熟的发病率呈上升趋势, 性早熟可使儿童产生心理行为和体格发育两方面的危

害。患儿多伴有骨骼的提前发育, 故开始身材较同龄儿童高, 但由于骨骼过早融合, 最终导致成年矮身材, 因此真性性早熟的发生和治疗倍受关注^[3]。青春期启动的提前可导致真性性早熟的发生, Kiss-1 在触发青春期启动时起着重要作用, 本实验以达那唑诱导的真性性早熟大鼠为模型, 通过对真性性早熟大鼠不同时期下丘脑中 Kiss-1 基因水平的检测,

[收稿日期] 2006-08-30; [修回日期] 2006-09-11

[作者简介] 刘小辉, 女, 硕士研究生, 医师。主攻方向: 遗传代谢内分泌疾病。

[通讯作者] 林汉华, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 邮编: 430030。

探讨 Kiss-1 在真性性早熟的发生过程中所起的作用,为进一步研究真性性早熟的发病机制和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

1.1.1 分组 正常5日龄清洁级 Sprague-Dawley 雌性大鼠40只(购自华中科技大学同济医学院实验动物中心)与母鼠共同饲养在14 h光照和10 h黑暗环境中,自由摄食和饮水。动物随机分为对照1组(正常青春前期)、对照2组(青春前期)、模型1组(青春前期早期)、模型2组(青春前期中期),每组10只。

1.1.2 模型建立 参照田占庄等^[4,5]的真性性早熟模型,应用达那唑300 μg [江苏联环药业股份有限公司,国药准字H20023116,每300 μg 溶于25 μL 乙二醇/乙醇(1:1)混合液中]皮下注射建立真性性早熟模型。模型1组、模型2组于5日龄时每只皮下注射达那唑300 μg 。对照1组、对照2组每只皮下注射等体积的生理盐水。大鼠在生后23 d断奶,25 d起每天检查阴道口开放(vaginal opening, VO)情况,对于阴道口开放的大鼠,每日进行阴道涂片观察其性周期的变化和第一个发情间期(first diestrus, D1)的出现。模型1组在第一个发情间期处死,同时按1:1比例处死对照1组大鼠;对照2组在出现第一个发情间期时处死。处死前称量体重,内眦静脉丛采血,分离血清,-20℃冻存。处死后留取标本(下丘脑,卵巢和子宫)。模型2组在第一、第二个发情间期分别采血,在第二个发情间期处死(second diestrus, D2)。

1.2 性腺和性器官的检查

根据器官指数=器官湿重/体重,计算卵巢指数与子宫指数。

1.3 下丘脑总 RNA 的提取

动物断头取脑,分离下丘脑,范围为头侧至视交叉前3 mm,尾侧至乳头体,两侧至下丘脑沟,深度为3 mm,液氮冻存。用 TRIzol(上海华舜生物工程有限公司)一步法提取下丘脑总 RNA,紫外分光光度计(美国 Beckman. DU650 型)测定 RNA 的浓度和纯度,OD260/OD280 为1.8~1.9,总 RNA 在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,可见28 s,18 s,5 s条带,而且28 s的亮度大约是18 s的2倍,表明总 RNA 有较好的完整性。加 DEPC 水使 RNA 的终浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, -70℃保存备用。

1.4 引物设计

引物用 Primer 5.0 设计,由上海生工合成,Kiss-1 的引物序列为上游:5'-TGCTGCTTCTCCTCTGT-3',下游:5'-AGGAGTTCCAGTTGTAGGC-3',预期扩增片段长度为318 bp。 β -actin 引物序列为上游:5'-CAC-CCGCGAGTACAACCTTC-3',下游:5'-CCCATACCCAC-CATCACACC-3' 预期扩增片段长度为207 bp。

1.5 半定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

M-M μLV 逆转录酶(晶美试剂盒)催化合成 cDNA 第一链:RNA 模板2 μg ,Oligo(dT)₁₈ 1 μL ,5 $\times$ 缓冲液4 μL ,RNA inhibitor 1 μL ,dNTP 2 μL ,M-M μLV 逆转录酶1 μL ,ddH₂O 调整总体积至20 μL 。70℃ 5 min,37℃ 5 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。PCR 反应合成第二链:逆转录产物1 μL ,10 $\times$ 缓冲液2.5 μL ,上下游引物各1 μL ,dNTP 0.5 μL ,MgCl₂ 1.7 μL ,Taq 酶(美国 Promega 公司)0.15 μL ,ddH₂O 调整至总体积25 μL 。PCR 扩增条件:94℃ 预变性5 min,94℃ 变性1 min,43℃ 退火45 s,72℃ 延伸45 s,共30循环,最后72℃ 延伸10 min。PCR 产物5 μL 上样于2%琼脂糖进行电泳,电压100 V,应用凝胶成像系统(英国 UVP GPS8006 型)对电泳结果成像并检测各电泳条带密度,结果以 Kiss-1/ β -actin 光密度比值表示。

1.6 LH 的测定

血清 LH 用化学发光法测定。

1.7 统计学处理

数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数采用 ANOVA 分析,组间两两比较用 SNK 法。

2 结果

模型1组、模型2组大鼠阴道口开放时间和第一个发情间期出现时间较对照1组提前($P < 0.05$),提示模型组大鼠青春启动提前发生。模型1组、模型2组(D1)的 LH 水平与对照1组比较差异有显著性($P < 0.05$),但与对照2组比较差异无显著性。以上结果表明模型组为真性性早熟。

模型1组大鼠子宫、卵巢指数与对照2组比较差异均无显著性,但均大于对照1组($P < 0.05$)。模型2组(D2)大鼠子宫、卵巢指数均大于模型1组,差异有显著性($P < 0.05$)。

模型1组大鼠下丘脑 Kiss-1 mRNA 表达水平和血 LH 与对照2组比较差异均无显著性,但均大于对照1组($P < 0.05$)。模型2组大鼠下丘脑 Kiss-1 mRNA 表达水平和血 LH 均大于模型1组(D2),差异有显著性($P < 0.05$)。见表1,图1。

表1 各组 VO,LH,D1,Kiss-1 mRNA,子宫指数,卵巢指数检测结果 (x±s)

组别	例数	VO (d)	D1 (d)	LH (mU/mL)	子宫指数 (×10 ⁻⁴)	卵巢指数 (×10 ⁻³)	Kiss-1/β-actin
对照1组	10	—	—	5.25±0.064	4.56±0.12	3.24±0.32	17.1±0.0003
对照2组	10	35.5±0.8	40.3±1.1	6.75±0.072	6.92±0.14	5.61±0.19	23.2±0.1040
模型1组	10	26.5±1.5 ^a	31.3±1.6 ^a	6.74±0.073 ^a	6.88±0.23 ^a	5.58±0.21 ^a	23.8±0.2110 ^a
模型2组	10	26.4±1.2 ^a	31.4±1.2 ^a	6.75±0.075 ^a	7.96±0.17 ^b	6.78±0.18 ^b	47.3±0.0025 ^b
7.93±0.077 ^b (D2)							

注:VO:阴道口开放时间,D1 第一个发情间期出现时间;Kiss-1/β-actin:Kiss-1 与 β-actin 的光密度比值。a 与对照1组比较,P<0.05 ,b 与模型1组比较,P<0.05

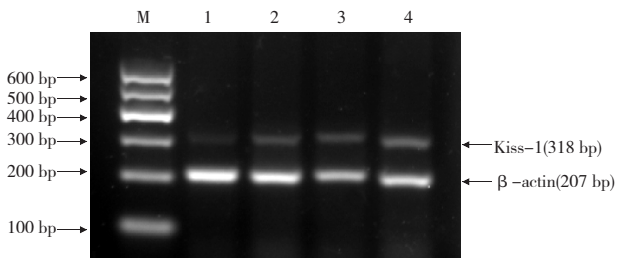


图1 下丘脑不同时期 Kiss-1 mRNA 的表达 M 为 DNA Marker I,从1~4 分别为正常青春前期组,性早熟青春早期组,正常青春早期组,性早熟青春期中期组。Kiss-1 mRNA 在1,2,4 的表达逐渐增高,2,3 的表达无差异。

3 讨论

青春期启动是一个十分复杂的过程,婴儿在出生时就具有完整的分泌生殖激素的功能,从生后的几分钟到生后的6个月,婴儿 GnRH, LH 和 FSH 等激素的水平会有轻微的波动。但在生后4~6个月时,两性的 GnRH 系统都进入静止状态,下丘脑-垂体-性腺轴的活动也处于低水平状态,并一直维持到青春期启动^[6]。正常青春期启动的时候,下丘脑释放促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH), GnRH 作用于垂体前叶 LH 和 FSH 分泌细胞上的 GnRH 受体,促进垂体 LH 和 FSH 的分泌,LH 和 FSH 再作用于性腺,促进性腺成熟并产生成熟配子和性激素的分泌。最近的研究发现人在达到青春期的时候,下丘脑中的 Kiss-1 基因会突然被激活,下丘脑 Kiss-1 mRNA 表达增加, Kiss-1 基因的编码产物 Kisspeptin 与其受体 GPR54 结合后通过中枢和外周作用,刺激 GnRH 依赖性的 LH 和 FSH 的释放,增加血循环中促性腺激素的浓度并可能受到下丘脑促性腺释放激素的调节^[7]。研究认为^[2], Kiss-1 基因可能象定时开关一样,到了一定时期会被激活并促进性激素的分泌,导致青春期启动。模型1组、模型2组大鼠阴道口开放时间和第一个发情间期出现时间提前表明大鼠发生了性早熟,而其在阴道开口后第一个发情间期时血 LH 水平的升高则说

明下丘脑-垂体-性腺轴的全面激活,表明大鼠发生的性早熟为真性性早熟。

大鼠的青春期发育过程与人类近似,且生命周期短(2~3年)、性成熟期短(2~3月)、性周期短(4~5d)^[8]。雌性大鼠青春前期(20d~)、青春早期(30d~)、成年期(>60d)、30~60d为青春早期^[9]。青春早期相当于D1期(30d左右),青春早期中期相当于D2期^[10](38d左右)。

本实验中,模型1组和模型2组大鼠首先发生阴道口开放,模型1组大鼠在阴道口开放后第一个发情间期被处死,对照1组与其1:1比例同时处死,处死之时对照1组大鼠尚未发生阴道口开放,仍处于青春前期,所以对照1组可作为正常青春前期对照组,由于对照2组大鼠是在进入青春早期后(出现第一个发情间期)处死,所以可作为正常青春早期对照组,模型2组在第二个发情间期处死(相当于青春早期中期)。

与对照1组(正常青春前期)相比,模型1组(青春早期)和模型2组(青春早期中期)的 Kiss-1 mRNA 的水平分别增加1.4和2.8倍,差异具有显著性意义(P<0.05),模型1组 Kiss-1 mRNA 的表达与正常青春早期相似。结果显示,对照1组(正常青春前期)、模型1组(青春早期)、模型2组(青春早期中期)的 Kiss-1 mRNA 的表达逐渐增高,提示 Kiss-1 mRNA 的表达与生长发育的各个时期密切相关。另外这三个时期的子宫、卵巢指数、LH 也逐渐增高,模型2组最高,对照1组最低,模型1组与正常青春早期相似。可能青春前期由于 GnRH 系统处于静止状态,下丘脑-垂体-性腺轴的活动也处于低水平状态,因此下丘脑 Kiss-1 mRNA 的表达、垂体释放 LH 的水平和子宫、卵巢指数均较低。随着青春期启动的触发,下丘脑-垂体-性腺轴的全面激活,因此在模型组青春早期 Kiss-1 mRNA 的表达、LH 的水平和子宫、卵巢指数逐渐增加。随着发育的逐渐成熟,下丘脑-垂体-性腺轴的分泌进一步增

高,导致 Kiss-1 mRNA 的表达、LH 的水平和子宫、卵巢指数在模型组青春期中期达到较高水平。

总之,Kiss-1 在真性性早熟雌性大鼠青春早期和青春期中晚期的表达逐渐升高,表明 Kiss-1 可能与真性性早熟的发生机制有关。

[参 考 文 献]

- [1] Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling [J]. J Reproduction, 2006, 131 (4): 623-30.
- [2] Murphy KG. Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonada axis [J]. J Neuroendocrinol, 2005, 17 (8): 519-525.
- [3] 陈少科,郭先鸣. 醋酸亮丙瑞林缓剂对中枢性性早熟女童生长和成年终身高预测的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4 (6): 506-508.
- [4] 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): 399-401.
- [5] Morishita H, Takemoto M, Kondo H, Higuchi K, Aono T. Induction of true precocious puberty by neonatal treatment with danazol in

female rats [J]. Neurosci Lett, 1993, 157(1): 33-36.

- [6] Ebling, FJP, Cronin AS. The neurobiology of reproductive development [J]. Neuroreport, 2000, 11 (16): 23-33.
- [7] Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KISS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54 [J]. J Physiol, 2004, 561 (Pt 2): 379-386.
- [8] 苗明三. 常用实验动物:大鼠[M]. //苗明三. 实验动物和动物实验技术. 北京:中国中医药出版社,1997, 97.
- [9] Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, 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.
- [10] Olazabal DE, Kalinichev M, Morrell JI, Rosenblatt JS. MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior [J]. Horm Behav, 2002, 41(2): 126-138.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

全军第十届儿科学专业学术年会暨第三次全国儿科热点研讨会 征文通知

由全军儿科学专业学会主办的全军第十届儿科学专业学术年会、以及由全军儿科学专业学会与中国当代儿科杂志合作主办的第三次全国儿科热点研讨会拟订于2007年8月在内蒙古自治区首府呼和浩特市召开。要求军内儿科以及相关专业的专业工作者投稿、参会,同时欢迎军外各单位儿科以及相关专业的专业工作者踊跃投稿、参会交流。征集论文内容包括儿科学及其相关专业各领域临床、科研、教学、护理和学科建设的学术成果、经验总结以及前沿进展。请将论文全文并附800至1000字摘要发Email到:zhifengze@126.com;如欲以纸质稿件形式投稿,请按以上篇幅要求打印好稿件并录入3.5'软盘一并寄北京市东城区朝内北小街2号北京军区总医院儿科研究所孔祥永收(邮编100700),联系电话010—66721787。地方参会者也可将征文发到中国当代儿科杂志编辑部,地址:湖南长沙市湘雅路87号中国当代儿科杂志社,邮编410008。Email:ddek7402@163.com。投稿主题注明“会议征文”字样。截稿日期为2007年5月31日。

全军儿科学专业学会
中国当代儿科杂志编辑部
2006年10月15日