

论著·基础研究

青春发育期5-羟色胺合成下降对雌鼠青春启动的影响

董 婷, 尹小琴, 李 妍, 李 嫔

上海交通大学医学院附属儿童医院, 上海市儿童医院内分泌科, 上海 200062

[摘要] **目的**·初步探讨青春发育期下丘脑5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)合成下降对雌鼠青春启动的影响。**方法**·将72只21日龄SD雌性大鼠随机分为氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)组和生理盐水组(对照组), 每组36只。每日向PCPA组大鼠腹腔注射PCPA(以建立5-HT合成下降模型), 对照组则注射等量生理盐水, 给药处理均持续至处死前1 d。分别在28日龄、35日龄和42日龄处死大鼠, 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测2组大鼠下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)基因的表达, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测2组大鼠下丘脑组织中5-HT含量、GnRH含量以及血清中黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)水平。同时, 从28日龄开始, 每日9:00~10:00观察并记录2组大鼠阴门开放时间。**结果**·5-HT含量的ELISA结果显示, 对照组大鼠在28日龄最低、42日龄最高, 整体呈递增趋势, 与PCPA组的趋势相一致; 同对照组相比, PCPA组大鼠在上述3个时间点的5-HT含量均较低(均 $P<0.05$)。GnRH含量的qPCR及ELISA结果显示, 与对照组相比, PCPA组大鼠在上述3个时间点的GnRH mRNA相对表达量、GnRH含量均较低(均 $P<0.05$)。LH水平的ELISA结果显示, 同对照组相比, PCPA组大鼠在28日龄、35日龄有所下降且差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。阴门开放时间的观察结果显示, 与对照组相比, PCPA组大鼠的阴门开放时间有所延迟($P=0.035$)。**结论**·青春发育期5-HT合成下降可致SD雌性大鼠下丘脑组织中GnRH合成减少、血清LH水平下降、阴门开放延后, 从而推迟了其青春启动。

[关键词] 5-羟色胺; 大鼠; 青春发育期; 促性腺激素释放激素**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.03.007 **[中图分类号]** R725.8 **[文献标志码]** A

Effect of decreased 5-hydroxytryptamine synthesis during puberty development on the onset of puberty in female rats

DONG Ting, YIN Xiaoqin, LI Yan, LI Pin

Department of Endocrinology, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200062, China

[Abstract] **Objective**·To preliminarily explore the effects of decreased 5-hydroxytryptamine (5-HT) synthesis in the hypothalamus during puberty development on the onset of puberty in female rats. **Methods**·Seventy two 21-day-old female SD rats were randomly divided into para-chlorophenylalanine (PCPA) group and normal saline group (control group), with 36 rats in each group. The rats in the PCPA group were injected with PCPA intraperitoneally every day (to establish the model of decreased 5-HT synthesis), while the rats in the control group were injected with the same amount of normal saline. The administration treatment lasted until 1 d before death. The rats were sacrificed at the age of 28 days, 35 days and 42 days, respectively. The expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in the hypothalamus of the two groups was detected by quantitative real-time PCR (qPCR). The content of 5-HT and GnRH in the hypothalamus and the level of luteinizing hormone (LH) in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the same time, since the age of 28 days, the vaginal opening time in the two groups was observed and recorded from 9:00 to 10:00. **Results**·The ELISA results of 5-HT content showed that the rats in the control group had the lowest level at 28 days and the highest level at 42 days, and showed an overall increasing trend, which was consistent with the trend of the PCPA group. Compared with the control group, the content of 5-HT in the PCPA group was lower at the above three time points (all $P<0.05$). qPCR and ELISA results of GnRH content showed that compared with the control group, the expressions of GnRH mRNA and GnRH protein in the PCPA group were lower at the above three time points (all $P<0.05$). The results of ELISA showed that compared with the control group, LH levels of the PCPA group were lower at the age of 28 days and 35 days, and the difference was statistically significant (both $P<0.05$). The observation results showed that compared with the control group, vaginal opening time of the PCPA group was delayed ($P=0.035$). **Conclusion**·The decrease of 5-HT synthesis during puberty development can lead to decrease of GnRH synthesis in the hypothalamus, decrease of LH level in peripheral blood and

[基金项目] 国家自然科学基金(81871131); 上海市科学技术委员会“扬帆计划”人才项目(20YF1440700, 21YF1438100)。**[作者简介]** 董 婷(1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: dongting0126@163.com。**[通信作者]** 李 嫔, 电子信箱: lipin21@126.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81871131); Sailing Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (20YF1440700, 21YF1438100).**[Corresponding Author]** LI Pin, E-mail: lipin21@126.com.

delay of vaginal opening, thus delaying the onset of puberty in female SD rats.

[Key words] 5-hydroxytryptamine (5-HT); rat; puberty development; gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

在个体从幼年到成熟的过程中,下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴发挥着重要的调控作用。其中,下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元通过脉冲方式释放GnRH,该激素可作用垂体并刺激其合成、分泌黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激素,而后2种激素可再与性腺受体结合,促进性腺发育。对人类个人而言,乳房发育、睾丸增大等第二性征的发育预示着其青春期的启动;对雌性大鼠而言,阴门开放则是其青春期启动的标志。有研究^[1]发现,GnRH神经元被认为是调节青春期启动的关键神经元。该神经元起源于嗅觉上皮细胞,其胞体主要位于下丘脑的视前区、内侧隔区-斜角带,其神经纤维随犁鼻神经尾侧迁移入下丘脑,最终到达终板血管器和正中隆起。在人体中,GnRH神经元约有2 000个,啮齿动物约有800个^[2-3]。在婴儿时期,该神经元表现较为活跃,之后会变得相对平静;而当青春期开始时,其又被“重新激活”。相关研究^[4-5]发现,影响GnRH神经元脉冲式释放的因素较多,包括遗传、环境条件、营养代谢、心理状态和疾病等,但具体机制尚未被明确。

SPERGEL^[6]研究发现,小鼠来源的永生GnRH神经元(GT1-7)细胞可表达5-HT_{1A}、5-HT_{2C}、5-HT₄和5-HT₇受体。CAMPBELL等^[7]向成年雌性GnRH-Cre转基因小鼠的下丘脑喙侧视前区注射Ba2001(一种狂犬病毒),分析GnRH神经元的传入神经元分布以及类型,结果显示位于中缝核的5-HT能神经元是GnRH神经元的上级神经元之一,表明存在5-HT对GnRH神经元调节的解剖基础。在哺乳动物中,5-HT由必需氨基酸色氨酸在限速酶——色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)的作用下转化得到,是一种重要的神经递质。且有研究^[8]发现,在上述过程中,TPH可被氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)竞争性抑制,从而减少5-HT的合成。当前发现,TPH存在2种亚型,即TPH1和TPH2。前者主要由肠道嗜铬细胞和其他非神经元类细胞(如脂肪细胞)表达;后者主要由中缝核的5-HT能神经元表达^[9]。目前,有关单胺类神经递

质5-HT对GnRH合成和释放影响的研究多以成年动物为实验对象,且有关5-HT对GnRH神经元的调控作用尚无一致结论。基于此,本研究以21日龄雌性大鼠为研究对象,通过腹腔注射5-HT合成抑制剂——PCPA或生理盐水,检测大鼠性发育的相关指标,初步评估青春发育期5-HT合成减少对大鼠青春期启动的影响。

1 对象与方法

1.1 实验动物及分组

21日龄清洁级健康雌性SD大鼠72只,体质量为45~50 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0011。实验大鼠饲养于北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,使用许可证号:SYXK(沪)2017-0014。饲养环境为平均温度(21±2)℃,相对湿度(55±10)%,12 h明暗周期,自由摄食、饮水。动物饲养条件符合《实验动物管理条例》,所有动物操作均遵循国家及上海交通大学附属儿童医院实验动物管理及伦理委员会规定的相关条例。

将上述大鼠随机分为2组,即PCPA组和生理盐水组(对照组),每组36只。每日,向PCPA组大鼠腹腔注射PCPA(按100 mg/kg的剂量,构建5-HT合成下降模型)^[9],向对照组大鼠注射等量生理盐水,持续至大鼠被处死的前1 d。设置28日龄、35日龄和42日龄为每组的处死时间点。

1.2 主要试剂及仪器

氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司),PCPA(上海源叶生物科技有限公司),酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),TRIzol试剂(Invitrogen,美国),RNA引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],反转录试剂盒、实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒(TaKaRa,日本),超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),紫外分光光度计(Thermo

Fisher, 美国), 实时荧光定量PCR仪 (Roche, 瑞士), 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国) 等。

1.3 组织分离及qPCR检测

分别于28日龄、35日龄和42日龄处死大鼠, 随后用眼科剪剪开颅骨, 分离下丘脑组织。

用TRIzol法提取下丘脑总RNA, 并用紫外分光光度计探测RNA的浓度和纯度。取1 μ g RNA反转录合成cDNA, 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s; 以cDNA为模板进行PCR反应, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s (共45个循环)。每个样本设置3个复孔, 以 β -actin为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

Tab 1 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward sequence (5' \rightarrow 3')	Reverse sequence (5' \rightarrow 3')	Length/ bp
<i>GnRH</i>	CCGCTGTTGTTCTGT TGACTGTG	GGGGTTCTGCCATTT GATCCTC	150
β -actin	GTCAGGTCATCACT ATCGGCAAT	AGAGGTCTTTACGG ATGTCAACGT	147

1.4 ELISA检测

1.4.1 下丘脑组织匀浆制备 向装有下丘脑组织的离心管加入1 \times 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS), 于超声下制备组织匀浆, 即每500 μ L PBS中含有50 mg脑组织。而后, 于4 $^{\circ}$ C、1 500 \times g条件下离心20 min, 收集上清液并存储在-80 $^{\circ}$ C, 用于后续ELISA分析。

1.4.2 血清提取 将大鼠麻醉后, 打开胸腔, 用2 mL注射器进行心脏采血。采集的全血于4 $^{\circ}$ C、1 500 \times g条件下离心20 min, 收集上清液并储存在-80 $^{\circ}$ C, 用于后续ELISA分析。

1.4.3 GnRH、5-HT及LH含量测定 按照ELISA试剂盒的说明步骤, 对下丘脑组织中的GnRH含量、5-HT含量以及血清中LH水平进行检测, 每个样品设置3个复孔。GnRH的检测范围是2.5~80 ng/mL, 5-HT的检测范围是0.75~24 ng/mL, LH的检测范围是1.5~48 ng/mL。

1.5 阴门开放观察

从大鼠28日龄起, 每日上午9:00~10:00观察并记录2组大鼠的阴门开放情况, 直至阴门开放全部完成。以阴门呈“隧道”状作为阴门开放的标志。

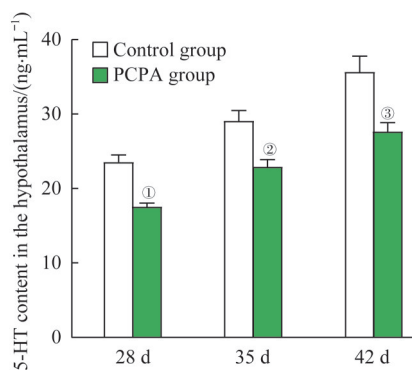
1.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据统计分析。定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用Student's *t*检验进行组间比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCPA对大鼠下丘脑中5-HT含量的影响

通过对28日龄、35日龄、42日龄大鼠下丘脑中5-HT含量进行ELISA分析, 结果 (图1) 显示: 2组大鼠的5-HT含量均随日龄的增大而增加; 与对照组相比较, PCPA组大鼠下丘脑中5-HT含量在3个时间点均有下降 (均 $P<0.05$)。



Note: ① $P=0.000$, ② $P=0.005$, ③ $P=0.009$, compared with the control group.

图1 2组大鼠下丘脑中5-HT含量分析

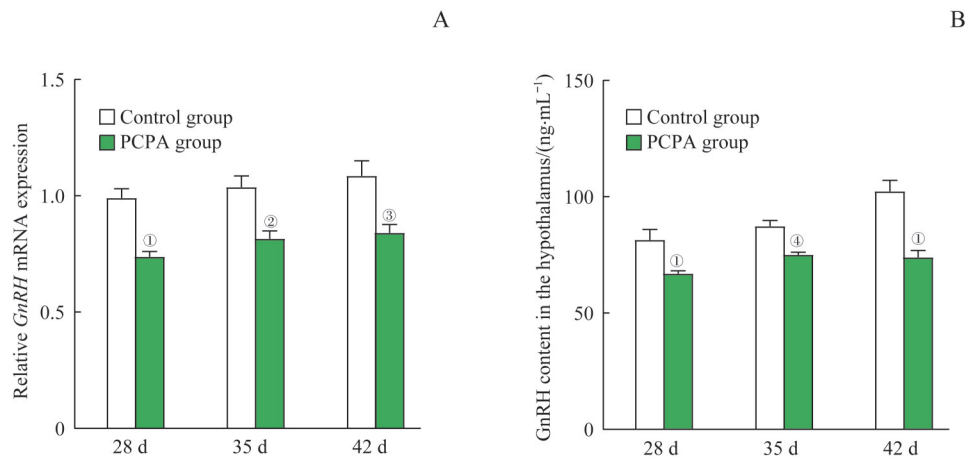
Fig 1 Analysis of 5-HT content in the hypothalamus of the two groups

2.2 PCPA对大鼠下丘脑中GnRH表达的影响

通过对28日龄、35日龄、42日龄大鼠下丘脑中GnRH基因表达进行qPCR分析, 结果 (图2A) 显示, 与对照组相比较, PCPA组大鼠的GnRH mRNA表达量有所下降 (均 $P<0.05$); 且对该3个时间点的GnRH蛋白含量进行ELISA分析, 结果 (图2B) 显示, PCPA组大鼠下丘脑中GnRH含量亦均低于对照组 (均 $P<0.05$)。

2.3 PCPA对大鼠血清LH水平的影响

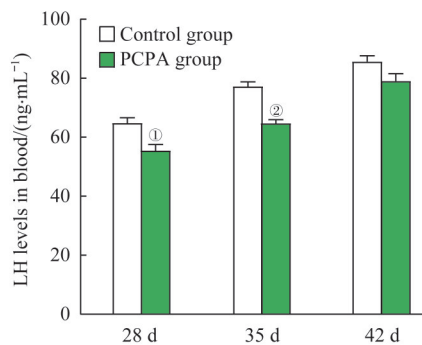
通过对28日龄、35日龄、42日龄大鼠血清LH水平进行ELISA分析, 结果 (图3) 显示: 2组大鼠的LH水平均随日龄的增加而升高; 其中, 与对照组相比较, PCPA组大鼠的LH水平在28日龄和35日龄有所下降且差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。



Note: A. Relative expression of *GnRH* mRNA detected by qPCR. B. Expression of GnRH protein detected by ELISA. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.004$, ^③ $P=0.009$, ^④ $P=0.001$, compared with the control group.

图2 2组大鼠下丘脑中 *GnRH* mRNA 及 GnRH 蛋白的表达

Fig 2 Expression of *GnRH* mRNA and GnRH protein in the hypothalamus of the two groups



Note: ^① $P=0.020$, ^② $P=0.000$, compared with the control group.

图3 2组大鼠的血清 LH 水平分析

Fig 3 Analysis of LH levels in serum of the two groups

2.4 PCPA 对大鼠阴门开放时间的影响

对大鼠阴门开放时间进行观察, 结果 (图4) 显示, 当出现 5-HT 长期合成下降时, PCPA 组大鼠的阴门开放时间为 (33.17 ± 2.48) d, 对照组大鼠为 (31.33 ± 1.37) d, 且差异具有统计学意义 ($P=0.035$)。

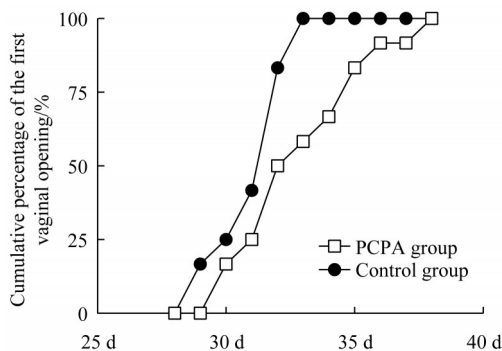


图4 2组大鼠阴门开放时间分析

Fig 4 Analysis of vaginal opening time in the two groups

3 讨论

本研究通过向 SD 大鼠腹腔注射 PCPA 构建 5-HT 合成下降模型, 检测大鼠下丘脑组织 *GnRH* mRNA 及 GnRH 蛋白表达、血清 LH 水平, 并观察阴门开放时间。结果显示, 5-HT 的合成下降对 *GnRH* 基因表达及生物合成均产生了抑制作用, 降低了血清 LH 水平, 并延迟了阴门开放时间; 继而初步评价了雌鼠 5-HT 合成下降对青春期启动的影响。

青春期是由幼年期向性成熟期过渡的阶段, 是生殖功能完善的重要环节。HPG 轴的激活和调控对青春期启动至关重要^[10]。作为一种重要的神经递质, 5-HT 在调节情绪、睡眠以及食欲中发挥了重要作用^[11], 且近年来在生殖内分泌领域也备受关注。研究^[12]发现, PCPA 给药后的妊娠大鼠的 5-HT 合成受到抑制, 胚胎前脑 GnRH 神经元的数量多于下丘脑。另有研究^[13]发现, 鸡胚嗅板区 5-HT_{1A} 受体在发育过程中表达递增, 当使用 5-HT_{1A} 抑制剂后 GnRH 神经元迁移受阻。因此, 5-HT 水平或将对 GnRH 神经元的起源、分化和迁移发挥调控作用。MAHMOUDI 等^[14]向雄性大鼠第 3 脑室注射 5-HT 后发现, 大鼠血清 LH 水平出现了升高。而在本研究中, 抑制下丘脑 5-HT 的合成, 可导致血清 LH 水平下降, 这与先前的研究结果相一致。BARBOSA 等^[15]发现, 在母鼠怀孕及哺乳期间给予其氟西汀 (一种提高突触间隙 5-HT 含量的试剂) 处理, 子代雌鼠的阴门开放时间无差异。分析其原因, 可能是因为: ① 幼鼠虽可通

过胎盘屏障和乳汁摄入药物,但药物进入下丘脑的浓度无法保证,同时该实验也未检测用药后幼鼠下丘脑5-HT含量,因此无法确定药物的作用效果。②幼鼠在断奶后,即停止了药物的摄入,其下丘脑组织5-HT含量可能恢复了正常。因此,在本研究中,为保证药物摄入的有效性及持续性,我们选择直接对大鼠用药且持续至处死前1 d,以确保5-HT合成长期受到影响,从而获得了与上述研究不一样的结果。SOGA等^[16]利用社会隔离雄性大鼠建立下丘脑5-HT合成下降模型,发现大鼠的*GnRH* mRNA合成有所下

降,性发育延迟。在本研究中,我们给予PCPA处理后抑制了大鼠5-HT合成,结果发现下丘脑*GnRH*基因表达下降,阴门开放延迟,意味着雌鼠青春启动延迟,这与先前研究结论相一致。

综上,本研究初步表明青春发育期5-HT合成减少可延迟SD雌鼠正常的青春发育,这种效应可通过减少下丘脑*GnRH*合成、降低血清LH水平来实现。该结果为5-HT在青春启动中的作用提供了理论基础,然而,对于5-HT调控*GnRH*神经元的具体机制将有待更进一步的探讨。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] TONSFELDT K J, SCHOELLER E L, BRUSMAN L E, et al. The contribution of the circadian gene *Bmal1* to female fertility and the generation of the preovulatory luteinizing hormone surge[J]. *J Endocr Soc*, 2019, 3(4): 716-733.
- [2] LATRONICO A C, BRITO V N, CAREL J C. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(3): 265-274.
- [3] ABBASI J. Chemicals in consumer products associated with early puberty[J]. *JAMA*, 2019, 321(16): 1556.
- [4] HILL J W, ELIAS C F. Neuroanatomical framework of the metabolic control of reproduction[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2349-2380.
- [5] AVENDAÑO M S, VAZQUEZ M J, TENA-SEMPERE M. Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 737-763.
- [6] SPERGEL D J. Modulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and secretion in mice by non-peptide neurotransmitters, gasotransmitters, and gliotransmitters[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 329.
- [7] CAMPBELL R E, HERBISON A E. Definition of brainstem afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in the mouse using conditional viral tract tracing[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 5884-5890.
- [8] GHADERI S, NIAPOUR A, SAKHAIE N, et al. Postnatal depletion of serotonin affects the morphology of neurons and the function of the hippocampus in male rats[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2022. DOI: 10.1002/jdn.10174.
- [9] TRUJILLO V, VALENTIM-LIMA E, MENCALHA R, et al. Neonatal serotonin depletion induces hyperactivity and anxiolytic-like sex-dependent effects in adult rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(3): 1036-1051.
- [10] MORAN M J, AYALA M E, GALLEGOS E, et al. Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25(8): 1105-1114.
- [11] MARTIN A M, YOUNG R L, LEONG L, et al. The diverse metabolic roles of peripheral serotonin[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(5): 1049-1063.
- [12] PRONINA T, UGRUMOV M, ADAMSKAYA E, et al. Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses[J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(6): 549-558.
- [13] POOPALASUNDARAM S, CHAMBERS D, GRAHAM A, et al. Serotonin receptor 1A (HTR1A), a novel regulator of *GnRH* neuronal migration in chick embryo[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(12): 4632-4640.
- [14] MAHMOUDI F, HAGHIGHAT GOLLO K. Influences of serotonin hydrochloride on *adiponectin*, *ghrelin* and *Kiss1* genes expression[J]. *Galen Med J*, 2020, 9: e1767.
- [15] BARBOSA M A, VERÍSSIMO L F, GERARDIN D C C, et al. Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation does not alter plasma concentrations of testosterone, oestrogen or corticosterone in peripubertal offspring[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31(5): 1002-1008.
- [16] SOGA T, TEO C H, CHAM K L, et al. Early-life social isolation impairs the gonadotropin-inhibitory hormone neuronal activity and serotonergic system in male rats[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 172.

[收稿日期] 2021-12-16

[本文编辑] 邢宇洋

