

GnRH 主动免疫对 SD 雄鼠下丘脑 GnRH 合成及性腺反馈系统的影响

韩兴发, 曹晓涵, 杜小刚, 宋天增, 曾宪垠*

(四川农业大学生命科学与理学院 原子能农业应用研究室, 雅安 625014)

摘要: 探讨 GnRH 主动免疫对 SD 雄鼠下丘脑 GnRH 合成及性腺反馈系统的影响。36 只 SD 雄鼠随机分为免疫组、手术去势组及对照组, 免疫组于 12 周龄时初免, 8 周后加免。放免法测定血清抗体滴度、激素浓度及下丘脑正中隆起 GnRH 含量, 实时荧光定量 PCR 分析下丘脑生殖相关基因 mRNA 的变化。结果显示, GnRH 主动免疫后 12 只免疫鼠中 11 只血清 GnRH 抗体滴度显著升高, 血清 LH、FSH 及 T 浓度显著降低 ($P < 0.05$), 睾丸严重萎缩(免疫去势鼠)。与对照鼠相比, 免疫去势显著降低下丘脑 GnRH 含量 ($P < 0.01$), 且显著下调下丘脑雌激素 α 受体 ($ER\alpha$)、雄激素受体 (AR)、*Kiss-1*、*GPR54* 及 *GnRH* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。手术去势鼠除血清 LH、FSH 浓度及下丘脑 $ER\alpha$ 的 mRNA 表达水平显著高于对照鼠外 ($P < 0.05$), 其余指标均与免疫去势鼠类似。结果首次表明, GnRH 主动免疫抑制性腺负反馈调节作用及降低了下丘脑 GnRH 的合成。

关键词: GnRH; 主动免疫; 下丘脑; 性腺负反馈系统; mRNA; 大鼠

中图分类号: S814.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0562-08

Effects of Active Immunization against GnRH on the Hypothalamus GnRH Biosynthesis and Gonadal Feedback System in Sprague-Dawley Male Rats

HAN Xing-fa, CAO Xiao-han, DU Xiao-gang, SONG Tian-zeng, ZENG Xian-yin*

(Isotope Research Laboratory, College of Life and Basic Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To explore the effects of active immunization against GnRH on the hypothalamus GnRH biosynthesis and gonadal feedback regulation system in adult Sprague-Dawley (SD) rats. Thirty-six male adult SD rats at the age of 12 weeks were randomly allocated to three groups of 12 animals each. Briefly, 12 rats were immunized against GnRH with a booster vaccination 8 weeks later. 12 intact males and 12 castrated rats were not administrated and served as controls. The GnRH antibody titers and reproductive hormone levels in sera, and the content of GnRH in the median eminence were determined by radioimmunoassay (RIA). The mRNA expressions of reproduction-related genes in the hypothalamus were quantified by real-time fluorescence quantitative PCR technique. Active immunization against GnRH significantly increased serum GnRH antibody titers in eleven of twelve immunized rats, reduced serum LH, FSH and testosterone to around or undetectable levels ($P < 0.05$), and resulted in a subcutaneously atrophy of testes in these rats (immunocastrates). Compared with intact controls, immunocastration of rats significantly reduced the content of GnRH in the median eminence and mRNA levels of androgen-receptor (AR), estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), *kiss-1*, *GPR54* and *GnRH* in the hypothalamus ($P <$

收稿日期: 2012-09-18

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(2012HH0013); 四川农业大学双支计划(00770107)

作者简介: 韩兴发(1986-), 男, 四川凉山州人, 硕士生, 主要从事动物生殖免疫调控研究, E-mail: xfhan2012@163.com; 曹晓涵(1984-), 女, 四川成都人, 博士生, 主要从事动物生殖免疫调控研究, E-mail: caoxiaohan007@hotmail.com。韩兴发与曹晓涵同为第一作者

* 通信作者: 曾宪垠, 博士生导师, 主要从事动物生理与生殖免疫调控研究, Tel: 0835-2886138, E-mail: xyzeng1966@163.com

0.05)。As to surgical rats, excepting the serum LH and FSH levels, and the hypothalamic $ER\alpha$ mRNA levels were significantly higher than those in intact rats, the remaining experimental parameters were similar to those of immunocastrates. These data firstly indicate that the feedback regulations of gonads on the hypothalamus and the synthesis capacity of GnRH in the hypothalamus are both suppressed by active immunization against GnRH.

Key words: GnRH; active immunization; hypothalamus; gonadal feedback system; mRNA; rats

用外源性 GnRH 主动免疫动物,刺激动物机体产生大量抗 GnRH 特异性抗体,引起生殖内分泌系统平衡的失调,从而改变下丘脑-垂体-性腺轴之间的正常反馈调节关系,减少生殖激素的合成和分泌及终止配子而发生而达到免疫去势的目的。通常认为抗体免疫“中和”作用是造成 GnRH 主动免疫去势的原因,然而关于 GnRH 主动免疫去势的机理却不清楚。此外,GnRH 主动免疫打破动物生殖轴间的正常反馈调节关系,并使该系统长期处于平衡失调状态,这是否会破坏该反馈调节系统以及影响到下丘脑 GnRH 的正常合成,迄今鲜见报道。本研究以 SD 雄鼠为模型,沿着性激素反馈调节下丘脑 GnRH 合成和分泌的信号通路:下丘脑性激素受体-kiss-1/GPR54-GnRH^[1-2],系统性研究 GnRH 主动免疫对下丘脑 GnRH 及性腺反馈调节通路系列基因表达的影响,以探讨 GnRH 主动免疫去势的分子机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 10~11 周龄体重 275~311 g 左右的健康性成熟 SD 雄鼠 36 只(由四川大学华西实验动物中心提供),随机分为免疫组、完整对照组和手术去势组,每组各 12 只,饲养管理条件相同。

1.2 动物免疫

GnRH 并列二聚体卵清蛋白复合物(TDK-OVA)由荷兰 Meloen 教授馈赠,疫苗配置参照 H. B. Oonk 等^[3]方法进行。即将以 D 型赖氨酸(D-lysine)取代 6 位甘氨酸(Glycine)的 GnRH 并列二聚体卵清蛋白复合物(TDK-OVA)溶于 PBS(pH7.4)中,用等体积 Specol 佐剂充分乳化。12 周龄时每只免疫雄鼠于腿部肌肉注射 1 mL 乳化抗原(含 TDK 50 μ g),8 周后加免,注射剂量及方法同初始免疫。完整对照组雄鼠不做任何注射,手术去势对照组则在试验开始前一周进行手术去势。免疫注射当天记为 0 wpv。

1.3 样品采集

试验鼠于初免当天及初免后第 2、4、6、8、10 wpv(每 2 周 1 次,直至处死前 2 周)采集尾部动脉血样 1.5~2.0 mL,为方便血液采集,采血前先将大鼠尾巴浸入温水(50 $^{\circ}$ C)中 20~30 s。加免后 4 周,所有试验鼠眼球采血后颈椎脱臼处死。所有血样于 4 $^{\circ}$ C,3 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存,用于测定血清抗体及激素含量。

试验鼠处死后,迅速分离下丘脑及两侧睾丸,用电子天平分别称重,用游标卡尺测量每侧睾丸长度和宽度。睾丸体积采用公式: $v=(4\pi(\text{宽度}/2)^2(\text{长度}/2))/4$ 进行计算,记录为每对睾丸的平均体积。冰上从下丘脑中迅速分离出正中隆起,将正中隆起及剩余部分液氮速冻,随后转入-70 $^{\circ}$ C 保存,分别用于测定 GnRH 含量及下丘脑相关基因 mRNA 表达水平。

1.4 血清 GnRH 抗体及激素含量测定

应用 RIA 法测定血清 GnRH 抗体滴度,试剂盒由上海第二军医大学神经生物学教研室提供,具体测定过程参照 A. Ladd 等^[4]描述的方法进行测定。抗体滴度以稀释度为 1:3 200 时血清的¹²⁵I-GnRH 百分结合率表示。以免疫前血清测得血清抗体非特异性结合率<1%。

血清 LH、FSH 及 T 含量均采用 RIA 试剂盒(均购于北京北方生物技术研究所),于 FT-2008 免疫计数仪(西安二六二厂生产)上测定,相关操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 下丘脑正中隆起 GnRH 含量测定

将称量后的下丘脑正中隆起置于玻璃匀浆管内,加入 1 mL HCl(1 mol \cdot L⁻¹)充分匀浆后转入塑料试管中室温放置 100 min。然后将匀浆液于 4 $^{\circ}$ C,4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 20 min,取上清加入 0.8 mL NaOH(1 mol \cdot L⁻¹)中和酸后,应用 RIA 测定下丘脑正中隆起中的 GnRH 含量,试剂盒由上海第二军医大学神经生物学教研室提供,测量过程参照 C. E. Roselli 等^[5]的方法进行。

1.6 基因的检测

下丘脑切取正中隆起后的剩余部分用于基因表达检测,检测通过实时荧光定量 PCR 方法进行。首先通过苯酚-氯仿法提取组织总 RNA,然后电泳检测 5S RNA、18S RNA、28S RNA 以检测其完整性以及是否污染。所提取出来的 RNA 采用反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (大连宝生物公司) 将其反转录成 cDNA,相关操作严格按照操作说明书进行。

然后以 cDNA 为模板在特定引物下进行定量检测,所采用的仪器为 CFX96 (BIO-RAD, Inc.),每个样品重复 3 次,PCR 程序:95 °C 10 s, 然后进行 40 循环的 PCR:95 °C 变性 5 s, 58~61 °C 退火+延伸 25 s, 最后进行溶解曲线以检测 PCR 扩增产物的特异性。目的基因 mRNA 相对表达水平采用标准曲线法进行计算。待检测基因及基因检测所采用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences of body tissue genes

基因 Gene	GenBank 收录号 GenBank accession No.	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
<i>Kiss-1</i>	AY196983	F: GCTGCTGCTTCTCCTCTGTGT R: CTGTTGGCCTGTGGGTCA	88
<i>GPR54</i>	NM_023992	F: GGAAGTCACTGGTCATCTTCGT R: GTACGCAGCACAGAAGGAAAGT	69
<i>AR</i>	NM_012502	F: GGCAGTCATTCAGTATTCC R: AGTAGAGCATCCTAGAGTTG	89
<i>ERα</i>	NM_012689	F: CAGGCTTTGGGGACTTGAATCT R: TGATTCCTGTCCAAGAGCAAGTTAG	148
<i>GnRH</i>	nm_012767	F: GGCAAGGAGGAGGATCAAA R: CCAGTGCATTACATCTTCTTCTG	142
<i>βactin</i>	NM_031144	F: CACAGCTGAGAGGGAAAT R: TCAGCAATGCCTGGGTAC	155

Kiss-1, Kiss 肽编码基因; *GPR54*, Kiss 肽受体编码基因; *AR*, 雄激素受体; *ER α* , 雌激素 α 受体; *GnRH*, 促性腺激素释放激素; *β actin*, β -肌动蛋白

Kiss-1, Kiss peptide encoding gene; *GPR54*, Kiss peptide receptor encoding gene; *AR*, Androgen receptor; *ER α* , Estrogen alpha receptor; *GnRH*, Gonadotropin-releasing hormone

1.7 数据的统计分析

利用 SAS 9.0 统计学软件中 GLM 对所测数据进行单因子方差分析,采用 Duncan 法进行数据间多重比较,结果以“平均值±标准误”表示。 $P < 0.05$ 表示数据差异显著。

2 结果

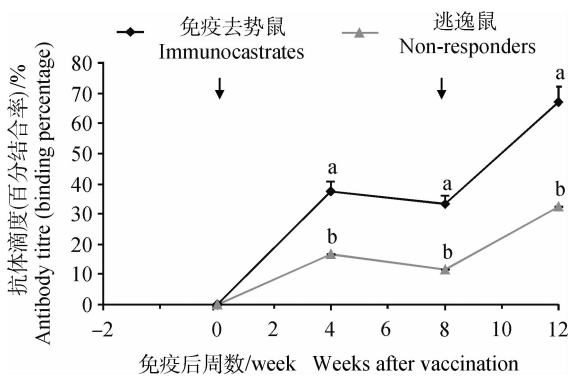
2.1 “逃逸”鼠

本研究中,将处死时血清睾酮浓度和睾丸重量及体积与对照组雄鼠相应指标均无显著差异 ($P > 0.05$) 的免疫鼠定义为“逃逸”鼠 (Non-responders),反之则定义为“免疫去势”鼠 (Immunocas-

trates)。本试验中,有 1 只“逃逸”鼠,在本研究基因表达的数据分析中不包括该雄鼠的基因表达数据。

2.2 血清抗 GnRH 抗体滴度

图 1 所示,GnRH 主动免疫后 12 只免疫雄鼠中 11 只产生了较好的抗体反应(免疫去势鼠),1 只反应较弱(逃逸鼠)。免疫去势鼠,初免及加免后血清抗 GnRH 抗体滴度均显著升高,处死时(加免后 4 周)抗体滴度上升到 67% (血清稀释度:1:3 200)。而逃逸鼠,初免及加免后血清抗体滴度上升缓慢,从 4 wpv 到处死时血清抗体滴度均极显著低于免疫去势鼠 ($P < 0.01$),处死时抗体滴度仅达 32% 的相对高值。



同天相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$), 不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。箭头表示免疫时间点, 下同
The same letter within day donates no significant difference ($P > 0.05$), a different letter within day donates an extremely significant difference ($P < 0.01$). Arrows indicate time-points of vaccination, the same as below

图 1 血清抗 GnRH 抗体滴度

Fig. 1 Serum anti-GnRH antibody titers

2.3 睾丸重量及大小

表 2 所示, GnRH 主动免疫后, 免疫去势雄鼠

表 2 睾丸重量、体积及下丘脑正中隆起 GnRH 含量

Table 2 Testicular weight, volume and the content of GnRH in the hypothalamus median eminence

项目 Items	对照鼠 Intact controls (n=12)	免疫去势鼠 Immunocastrates (n=11)	逃逸鼠 Non-responders (n=1)	手术去势鼠 Surgical castrates (n=12)
睾丸重量/g Testes weight	3.118 5 ± 0.130 6 ^{Aa}	0.621 9 ± 0.052 5 ^B	3.238 3 ^a	-
睾丸体积/mm ³ Testes volume	1.078 0 ± 0.033 9 ^{Aa}	0.210 9 ± 0.022 2 ^B	0.917 5 ^a	-
GnRH 含量/(ng · g ⁻¹ tissue) GnRH content	73.66 ± 2.38 ^{Aa}	44.81 ± 2.37 ^B	69.31 ^{Aa}	34.70 ± 1.23 ^C

同行相同上标字母表示差异不显著, $P > 0.05$; 不同上标小写字母表示差异显著, $P < 0.05$; 不同上标大写字母表示差异极显著, $P < 0.01$

The same superscript letter within row donates no significant difference ($P > 0.05$); different lower-case superscript letters within row donates significant difference ($P < 0.05$); different upper-case superscript letters within row donates extremely significant difference ($P < 0.01$)

图 3 所示, 完整对照组雄鼠血清 LH 浓度整个试验期间维持稳定, 在 $3.30 \sim 4.49 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上下波动, 平均值为 $3.46 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而手术去势组雄鼠, 手术去势后血清 LH 浓度升高, 整个试验期间维持稳定且显著高于完整对照组雄鼠血清 LH 浓度 ($P < 0.05$)。初免当天, 免疫去势鼠及逃逸鼠与完整对照雄鼠血清 LH 浓度无显著差异 ($P > 0.05$), GnRH 主动免疫后, 免疫去势鼠血清 LH 浓度缓慢下降, 加免后 2 周降至检测限 ($1 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以

睾丸严重萎缩, 其重量及体积均下降到对照组睾丸的 20% ($P < 0.01$), 而对逃逸鼠睾丸无萎缩迹象, 其重量及体积均与对照组雄鼠睾丸无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 血清激素含量

血清睾酮浓度如图 2 所示, 整个试验期间对照组雄鼠血清睾酮浓度维持平稳, 在 $3.44 \sim 3.57 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 小幅波动, 平均浓度为 $3.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。免疫当天, 免疫去势鼠及逃逸鼠的血清睾酮浓度与对照组雄鼠血清睾酮浓度均无显著差异 ($P > 0.05$)。GnRH 主动免疫后, 免疫去势雄鼠血清睾酮浓度缓慢下降, 加免后 2 周及处死时血清睾酮浓度下降到检测限 ($0.02 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以下, 从初免后 2 周至处死时其血清睾酮浓度均极显著低于对照组雄鼠及逃逸雄鼠血清睾酮浓度 ($P < 0.01$)。而逃逸鼠, 初免后血清睾酮浓度略低于与对照组血清睾酮浓度, 但在整个试验期间与对照组雄鼠血清睾酮浓度无显著差异 ($P > 0.05$)。

下, 从初免后 2 周至处死时均显著低于完整对照组雄鼠血清 LH 浓度 ($P < 0.05$)。而逃逸鼠, GnRH 主动免疫后血清 LH 浓度略微下降, 但从初免后 4 周至处死时均显著高于免疫去势鼠血清 LH 浓度 ($P < 0.05$), 且整个试验期间与完整对照组雄鼠血清 LH 浓度无显著差异 ($P > 0.05$)。

血清 FSH 浓度如图 4 所示, 完整对照及手术去势雄鼠整个试验期间血清 FSH 均维持相对稳定, 手术去势雄鼠手术去势后血清 FSH 浓度升高但整个

试验期间与完整对照雄鼠血清 FSH 浓度均无显著差异 ($P>0.05$)。初免当天,免疫去势鼠及逃逸鼠与完整对照雄鼠血清 FSH 浓度无显著差异 ($P>0.05$),GnRH 主动免疫后,免疫去势鼠血清 FSH 浓度缓慢下降,处死时降至检测限($1 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$)附近,从初免后 2 周至处死时均显著低于完整对照组雄鼠血清 FSH 浓度 ($P<0.05$)。而逃逸鼠,GnRH 主动免疫后血清 FSH 浓度略微下降,但从初免后 2 周至处死时均显著高于免疫去势鼠血清 FSH 浓度 ($P<0.05$),且整个试验期间与完整对照雄鼠血清 LH 浓度无显著差异 ($P>0.05$)。

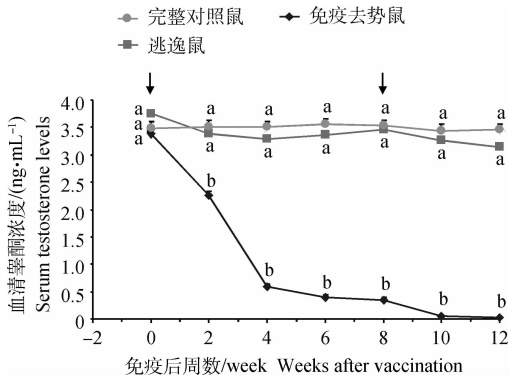


图 2 血清睾酮浓度
Fig. 2 Serum testosterone levels

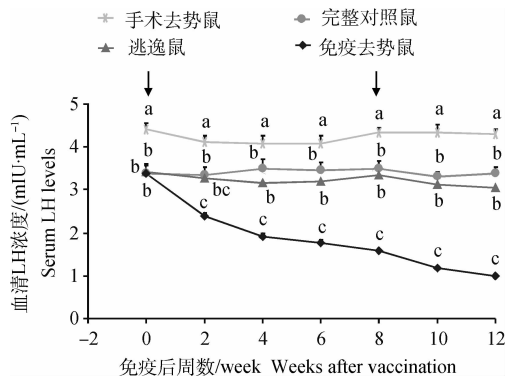


图 3 血清 LH 浓度
Fig. 3 Serum LH levels

2.5 下丘脑正中隆起 GnRH 含量

如表 2 所示,与完整对照组相比,GnRH 主动免疫去势和手术去势均极显著降低下丘脑正中隆起

GnRH 含量 ($P<0.01$),而手术去势鼠下丘脑正中隆起 GnRH 含量又极显著低于 GnRH 免疫去势鼠下丘脑正中隆起 GnRH 含量 ($P<0.01$)。GnRH 主动免疫有降低逃逸鼠下丘脑正中隆起 GnRH 含量的趋势,但与完整对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

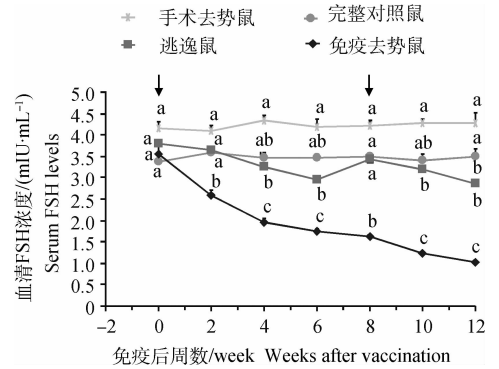


图 4 血清 FSH 浓度
Fig. 4 Serum FSH levels

2.6 下丘脑基因 mRNA 表达变化

如图 5 所示,与完整对照组相比,GnRH 主动免疫极显著下调雄鼠下丘脑雌激素 α 受体 ($ER-\alpha$)、雄激素受体 (AR) 及促性腺激素释放激素 ($GnRH$) 基因 mRNA 表达水平 ($P<0.01$),显著下调 $kiss-1$ 及其受体 $GPR54$ mRNA 表达水平 ($P<0.05$)。与 GnRH 免疫去势相似,手术去势极显著下调 AR 、 $GPR54$ 及 $GnRH$ 基因 mRNA 表达水平 ($P<0.01$),显著下调 $kiss-1$ mRNA 表达水平 ($P<0.05$),但极显著上调 $ER\alpha$ 的 mRNA 表达水平 ($P<0.01$)。

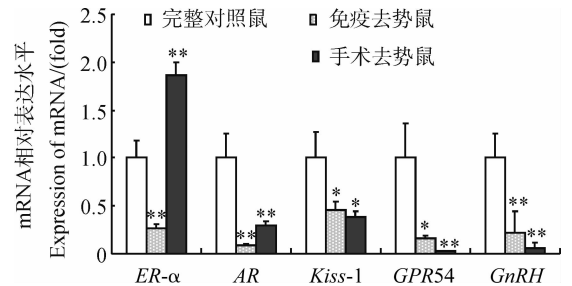


图 5 GnRH 主动免疫对下大鼠下丘脑 $ER\alpha$ 、 AR 、 $Kiss-1$ 、 $GPR54$ 及 $GnRH$ mRNA 表达水平的影响

与对照组相比,*表示差异显著 ($P<0.05$),**表示差异极显著 ($P<0.01$)

Fig. 5 Effects of active immunization against GnRH on the mRNA expression levels of hypothalamus $ER-\alpha$, AR , $Kiss-1$, $GPR54$ and $GnRH$ in rats

与完整对照组相比,*表示差异显著 ($P<0.05$),**表示差异极显著 ($P<0.01$)

3 讨论

用外源性 GnRH 主动免疫动物,刺激动物机体产生大量 GnRH 抗体以特异性中和内源性 GnRH 的活性,降低血清促性腺激素(LH 和 FSH)及性激素浓度,致使性腺萎缩。本试验中,GnRH 主动免疫后 12 只免疫雄鼠中 11 只产生良好的抗体反应(免疫去势鼠),与相同疫苗在免疫去势猪上引起强烈抗体反应结果一致^[6]。免疫去势鼠伴随着免疫后抗体滴度上升,血清 LH、FSH 及 T 浓度显著降低,睾丸严重萎缩,其重量和体积均下降到对照组睾丸的 20%,这与 GnRH 主动免疫大鼠^[7]、猪^[8-9]及牛^[10]动物后的研究结果一致。动物主动免疫后 LH、FSH 及 T 合成和分泌的减少是导致动物性腺萎缩的主要原因^[7-9],而 GnRH 主动免疫后所产生的大量 GnRH 特异性抗体是否会直接作用于睾丸组织或睾丸内细胞因子,进而也成为导致免疫动物睾丸萎缩的原因,值得进一步研究。本试验 12 只免疫鼠中存在 1 只“逃逸”鼠,该“逃逸”鼠 GnRH 主动免疫后血清抗体反应显著低于免疫去势鼠,与较弱的抗体反应一致,GnRH 主动免疫后其血清促性腺激素 LH 及 FSH 及性腺激素 T 只是轻微下降,同时睾丸无萎缩迹象,其重量及体积与完整对照组雄鼠睾丸相比均无明显差异。GnRH 主动免疫后,也在大鼠^[7]、猪^[6]及猫^[11]上观察到部分动物个体存在免疫“逃逸”现象。分析上述研究及本试验中的免疫“逃逸”个体,均发现 GnRH 免疫后较弱的抗体反应是导致动物出现免疫“逃逸”现象的直接原因,提示 GnRH 主动免疫后血液 GnRH 抗体可能需要达到一定的阈值才能成功免疫去势动物。

促性腺激素释放激素(GnRH)由下丘脑 GnRH 神经元合成并储存,通过下丘脑-垂体-性腺轴控制着动物性腺激素的合成及配子的发生。反过来,性激素通过反馈调节环作用于下丘脑(调节下丘脑 GnRH 的合成和/或分泌)或直接作用于垂体以间接或直接地影响促性腺激素的合成和分泌,从而维持生殖内分泌的稳态。本试验中,GnRH 主动免疫显著降低免疫去势鼠下丘脑中隆起 GnRH 的含量,且逃逸鼠下丘脑中隆起 GnRH 含量也有下降的趋势,与 GnRH 主动免疫雄猴和雌鼠后的研究结果一致^[12-13]。然而,前人用 GnRH 主动免疫马和母绵羊后却发现 GnRH 主动免疫不影响下丘脑中隆起 GnRH 的含量^[14-15],与本试验及上述研究结

果不一致,这可能是由于免疫后各试验采样时间点不一样所致,具体原因有待进一步研究。

分析免疫去势鼠下丘脑中隆起 GnRH 含量下降的原因,可能是 GnRH 主动免疫降低动物外周循环性腺激素后负反馈引起下丘脑 GnRH 分泌增加或是 GnRH 主动免疫降低了下丘脑 GnRH 自身合成或者是两者同时受影响所致。本试验中通过手术摘除大鼠两侧睾丸解除外周循环性激素对下丘脑 GnRH 激素的反馈抑制作用后,也发现其下丘脑中隆起 GnRH 含量显著降低且比 GnRH 免疫去势鼠含量还低。前人以雄性大鼠为模型,研究手术去势后下丘脑 GnRH 含量及分泌的变化,结果不一。有研究发现手术去势后大鼠下丘脑 GnRH 含量及分泌水平均显著下降^[16-18],表明手术去势后大鼠下丘脑 GnRH 含量的下降是由于下丘脑 GnRH 激素合成下降而非分泌增加所致。此外,上述试验中大鼠手术去势后下丘脑 GnRH 分泌减少而其血清 LH 及 FSH 水平却显著升高^[17-18],也同时表明大鼠手术去势后血清 LH 及 FSH 的升高不是由于下丘脑 GnRH 分泌增加所致而可能是由于大鼠手术去势后垂体对 GnRH 的敏感性增加所致^[19-21]。但也有研究发现手术去势后大鼠下丘脑 GnRH 分泌增加,因而推测其下丘脑中隆起含量的下降是由于下丘脑 GnRH 分泌增加所致^[22]。本试验中,经 Real-time PCR 检测大鼠下丘脑 GnRH mRNA 表达水平后发现大鼠手术去势后下丘脑 GnRH mRNA 表达水平显著降低,与 Y. Park 等^[16]的研究结果一致。下丘脑 GnRH mRNA 表达水平降低提示手术去势可能降低了大鼠下丘脑 GnRH 激素的合成能力。此外,本试验中手术去势鼠下丘脑 GnRH mRNA 表达水平的下降与其正中隆起组织中 GnRH 含量下降的结果一致,也进一步表明其下丘脑中隆起 GnRH 含量下降是由于下丘脑 GnRH 合成下降所致。研究显示手术去势后大鼠下丘脑 GnRH 含量及分泌水平的下降能通过注射补充睾酮而使其恢复^[16,18]。Y. Park 等^[16]发现大鼠手术去势后下丘脑 GnRH mRNA 表达水平的下调也能通过注射补充睾酮而使其表达上调。上述试验结果均表明大鼠下丘脑 GnRH 激素的正常合成和分泌需要性腺激素的参与。本试验中,免疫去势鼠 GnRH 主动免疫后血清睾酮下降到检测不出水平,同时其下丘脑 GnRH 含量及 mRNA 表达水平均显著降低,与本试验中雄鼠手术去势后的变化一致,表明 GnRH 主动免

疫降低了大鼠下丘脑 GnRH 激素的合成,且下丘脑 GnRH 激素合成的下降也是由于 GnRH 主动免疫降低大鼠体内性激素所致。这是首次发现 GnRH 主动免疫下调了下丘脑 GnRH 基因的表达及降低下丘脑 GnRH 激素的合成。其中,GnRH 免疫去势鼠下丘脑 mRNA 表达水平及 GnRH 含量仍然显著高于手术去势鼠的相应值,这可能是由于 GnRH 免疫去势鼠体内还存在少量的性腺激素所致。下丘脑 GnRH 激素的正常合成和分泌是动物生殖功能得以产生和维持的前提^[23]。因此,GnRH 主动免疫后动物下丘脑 GnRH 激素合成的下降可能是导致动物免疫去势的重要或根本原因。I. J. Clarke 等^[15]利用 GnRH 主动免疫初生母绵羊后,发现受试绵羊下丘脑正中隆起 GnRH 含量没受影响而其垂体门脉 GnRH 分泌频率降低,从而维持了绵羊长达 3~4 年的去势状态。上述研究及本研究结果表明 GnRH 主动免疫可通过影响下丘脑 GnRH 合成和/或分泌来达到和维持动物免疫去势的目的和状态。

对于雄性动物,雄激素包括可芳香化的睾酮及不可芳香化的二氢睾酮通过直接与下丘脑上雄激素受体结合,或睾酮经芳香化转化为雌激素后与下丘脑上雌激素受体结合,从而直接或间接实现雄激素对下丘脑 GnRH 激素合成和分泌的反馈调控。本研究中,雄鼠手术去势后下丘脑雄激素受体(AR) mRNA 表达水平显著下调,与 R. Singh 等^[24]研究结果一致。和手术去势结果类似,GnRH 主动免疫后免疫去势鼠下丘脑 AR mRNA 表达水平也显著下调。然而对于下丘脑雌激素 α 受体($ER\alpha$)mRNA 的表达,GnRH 免疫去势和手术去势结果相反,GnRH 主动免疫后显著下调而手术去势后却显著上调。这表明大鼠免疫去势后下丘脑雄性激素受体基因表达的下调可能主要是由大鼠去势后性激素分泌降低或终止所致,而至于免疫去势后下丘脑雌激素受体基因表达的变化则可能是由包括雌激素在内的多种因素共同参与调控的,具体原因有待进一步研究。免疫去势鼠下丘脑雄雌激素受体 mRNA 表达水平下调,表明 GnRH 主动免疫很可能减少下丘脑雄及雌激素受体的数量。近年来研究表明下丘脑雄激素或雌激素受体不存在于 GnRH 神经元上而存在于 kiss 神经元上^[25],性激素对下丘脑 GnRH 的反馈调节作用是正是通过中间调节元件 Kiss-1/GPR54 系统介导完成的,其中 GPR54 为视黄酸家族 G 蛋白偶联受体,kisspeptin 肽为其内源性配体,

kiss-1 编码蛋白 kisspeptin 通过与 GPR54 结合来调控下丘脑 GnRH 的合成和分泌^[1-2]。本研究中检测到 GnRH 主动免疫及手术去势后下丘脑 *Kiss-1* 及 *GPR54* mRNA 表达水平均显著下调,表明 GnRH 主动免疫后下丘脑 *GnRH* 基因的表达的下调是通过下调性激素受体及其上游调控元件 *kiss-1*/*GPR54* 来实现的。

4 结 论

GnRH 主动免疫通过下调性腺负反馈调信号通路:AR/ $ER\alpha$ -*kiss-1*/*GPR54* 基因表达,抑制了性腺负反馈调节作用及降低下丘脑 GnRH 激素的合成。

参考文献:

- [1] GARCÍA-GALIANO D, PINILLA L, TENA-SEM-PERE M. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(1): 22-33.
- [2] ROA J, CASTELLANO J M, NAVARRO V M, et al. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents [J]. *Peptides*, 2009, 30(1):57-66.
- [3] OONK H B, TURKSTRA J A, SCHAAPER W M, et al. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH [J]. *Vaccine*, 1998, 16(11-12):1074-1082.
- [4] LADD A, PRABHU G, TSONG Y Y, et al. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone combined with androgen supplementation is a promising antifertility vaccine for males [J]. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1988, 17(4):121-127.
- [5] ROSELLI C E, KELLY M J, RONNEKLEIV O K. Testosterone regulates progonadotropin-releasing hormone levels in the preoptic area and basal hypothalamus of the male rat [J]. *Endocrinology*, 1990, 126(2):1080-1086.
- [6] ZENG X Y, TURKSTRA J A, MELOEN R H, et al. Active immunization against gonadotrophin-releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development [J]. *Anim Reprod Sci*, 2002, 70(3-4): 223-233.
- [7] FRASER H M, GUNN A, JEFFCOATE S L, et al.

- Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on serum and pituitary gonadotrophins, testes and accessory sex organs in the male rat [J]. *J Endocrinol*, 1974, 63(2):399-406.
- [8] EINARSSON S, BRUNIUS C, WALLGREN M, et al. Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs [J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 127(1-2):50-55.
- [9] TURKSTRA J A, VAN DER STAAY F J, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, et al. Pharmacological and toxicological assessment of a potential GnRH vaccine in young-adult male pigs [J]. *Vaccine*, 2011, 29(21):3791-3801.
- [10] JANETT F, GERIG T, TSCHUOR A C, et al. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls [J]. *Theriogenology*, 2012, 78(1):182-188.
- [11] LEVY J K, MILLER L A, CYNDA CRAWFORD P, et al. GnRH immunocontraception of male cats [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(6):1116-11130.
- [12] CHAPPEL S C, ELLINWOOD W E, HUCKINS C, et al. Active immunization of malarhesus monkeys against luteinizing hormone releasing hormone [J]. *Biol Reprod*, 1980, 22(2):333-342.
- [13] OKON E, LIVNI N, KOCH Y. Immunization against gonadotrophin-releasing hormone: histopathological and hormonal changes in the female rat [J]. *Br J Exp Pathol*, 1980, 61(6):579-589.
- [14] RABB M H, THOMPSON D L, BARRY B E, et al. Effects of active immunization against GnRH on LH, FSH and prolactin storage, secretion and response to their secretagogues in pony geldings [J]. *J Anim Sci*, 1990, 68(10):3322-3329.
- [15] CLARKE I J, BROWN B W, TRAN V V, et al. Neonatal immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) results in diminished GnRH secretion in adulthood [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(4):2007-2014.
- [16] PARK Y, PARK S D, CHO W K, et al. Testosterone stimulates LH-RH like mRNA level in the rat hypothalamus [J]. *Brain Res*, 1988, 451(1-2):255-260.
- [17] KALRA S P, KALRA P S. Do testosterone and estradiol-17 beta enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion ? [J]. *Biol Reprod*, 1989, 41(4):559-570.
- [18] RUDENSTEIN R S, BIGDELI H, MCDONALD M H, et al. Administration of gonadal steroids to the castrated male rat prevents a decrease in the release of gonadotropin-releasing hormone from the incubated hypothalamus [J]. *J Clin Invest*, 1979, 63(2):262-267.
- [19] BADGER T M, WILCOX C E, MEYER E R, et al. Simultaneous changes in tissue and serum levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone releasing factor after castration in the male rat [J]. *Endocrinology*, 1978, 102(1):136-141.
- [20] DEBELJUK L, VILCHEZ-MARTINEZ J A, ARIMURA A, et al. Administration of gonadal steroids to the castrated male rat prevents a decrease in the release of gonadotropin-releasing hormone from the incubated hypothalamus [J]. *J Clin Invest*, 1979, 63(2):262-267.
- [21] CHEUNG C Y, DAVIDSON J M. Effects of testosterone implants and hypothalamic lesions on luteinizing hormone regulation in the castrated male rat [J]. *Endocrinology*, 1977, 100(2):292-302.
- [22] LEVINE J E, DUFFY M T. Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats [J]. *Endocrinology*, 1988, 122(5):2211-2221.
- [23] 刘 宵,王树迎,尹玉涛,等. 济宁青山羊生后发育阶段 GnRH 与 GnRHR 阳性细胞在下丘脑分布规律的研究[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(8):1186-1191.
- [24] SINGH R, PERVIN S, SHRYNE J, et al. Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(7):3672-3677.
- [25] HERBISON A E, DE TASSIGNY X, DORAN J, et al. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(1):312-321.