

# 大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin mRNA 的表达

张文龙 童德文\* 邢福姗

(西北农林科技大学动物医学院 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**为探索下丘脑 ghrelin mRNA 及 GnRH mRNA 在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 发情期和间情期的表达特点, 通过外部观察和阴道涂片相结合的方法确定发情期和间情期, 将 12 只未经产 SD 雌性大鼠分为 2 组, 即发情期组和间情期组, 每组 6 只。取动物下丘脑, 用实时荧光 RT-PCR 方法检测 ghrelin mRNA 和 GnRH mRNA 的表达丰度。结果表明, 间情期组大鼠下丘脑 ghrelin mRNA 的表达丰度显著高于发情期组 ( $P < 0.01$ ); 间情期组大鼠下丘脑 GnRH mRNA 的表达丰度显著低于发情期组 ( $P < 0.01$ )。研究发现, 下丘脑 ghrelin mRNA 和 GnRH mRNA 在发情期与间情期具不同的表达模式, 提示 ghrelin 可能在下丘脑水平上对 GnRH mRNA 的表达具下调作用。

**关键词:** Ghrelin mRNA; 发情期; 间情期; 实时荧光 RT-PCR; 大鼠

**中图分类号:** Q942 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)04-28-06

## Expression of Ghrelin mRNA in the Hypothalamus of Rats during Oestrous Cycle

ZHANG Wen-Long TONG De-Wen\* XING Fu-Shan

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate the expression of ghrelin mRNA in the hypothalamus of rats at the estrus and diestrus. Twelve virginal rats were classified into 2 groups as the estrus ( $n = 6$ ) and diestrus ( $n = 6$ ) which were determined by vaginal smears daily. All animals were killed by decapitation, and samples of hypothalamic tissue were obtained to detect the value of ghrelin and GnRH mRNA by real-time RT-PCR. Results showed that expression of ghrelin mRNA in the hypothalamus changed with the oestrous cycle, higher in the diestrus compared to that in the estrus ( $P < 0.01$ ), while on the contrary GnRH mRNA level was higher in the estrus than that in the diestrus ( $P < 0.01$ ). Results suggest that ghrelin may down-regulate the expression of GnRH mRNA in the hypothalamus.

**Key words:** Ghrelin mRNA; Estrus; Diestrus; Real-time RT-PCR; Rats

生长素 (ghrelin) 是日本科学家 Kojima 等人于 1999 年发现的一种由 28 个氨基酸组成的多肽, 能够促进生长激素释放, 故命名为 ghrelin<sup>[1,2]</sup>。Ghrelin 及其受体在动物体内广泛分布, 具有调节生长激素分泌、摄食、能量代谢、生殖调控等多种生物学作用<sup>[3,4]</sup>。Ghrelin 对生殖调控的研究近年来正成为热点, 在人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、猪 (*Sus scrofa*) 和

羊 (*Ovis aries*) 等动物都有报道<sup>[5~8]</sup>。成年雌性哺乳动物有典型的发情周期, 在一个发情周期中下丘脑-垂体-卵巢轴各个水平的性激素发生

基金项目 西北农林科技大学人才基金项目 (No. 01140502);

\* 通讯作者, E-mail: tdw4114@nwsuaf.edu.cn;

第一作者介绍 张文龙, 男, 博士后; 研究方向: 神经生殖内分泌; E-mail: zhangwenlong92@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2008-12-18; 修回日期: 2009-04-29

典型的周期性变化,从而调节正常发情周期的进程<sup>[9]</sup>。研究表明,ghrelin 在垂体水平上抑制 LH 的分泌,Fernandez 等<sup>[10]</sup>对大鼠的研究表明,脑室注射 ghrelin 可抑制青春前期以及性腺切除大鼠 LH 的释放,而 FSH 的释放则不受影响。Fernandez 等<sup>[10]</sup>给去卵巢雌性大鼠静脉注射 ghrelin 后发现,在发情周期的各个阶段都能抑制 LH 的释放。体外实验还表明,ghrelin 在大鼠整个发情周期都能抑制 GnRH 刺激引起的 LH 释放,而只在发情期抑制 GnRH 刺激引起的 FSH 释放。这些资料表明,ghrelin 在调节动物生殖轴方面是一个复杂的模式,在中枢水平上能抑制 GnRH 的释放以及由 GnRH 引起的 LH 的释放,能直接提高垂体 LH 和 FSH 释放的基础水平。给青春雄性大鼠注射 ghrelin 的实验显示出相似的结果,ghrelin 也能抑制雄性大鼠 LH 的释放<sup>[11]</sup>。

在大鼠的一个发情周期中,发情期会出现 LH 的分泌峰,在其他发情阶段 LH 的水平很低,在间情期卵巢处于休整期,下丘脑和垂体性腺激素水平相对较低。大鼠下丘脑 GnRH mRNA 在发情期和间情期的表达特点未见报道。研究表明,ghrelin 在下丘脑和垂体水平上对 GnRH 和 LH 的分泌具抑制作用,那么,ghrelin 在发情周期中有何变化、与 GnRH 和 LH 的分泌模式有何关系,这些方面的研究值得深入探讨。本实验采用实时荧光 RT-PCR 方法对大鼠下丘脑 GnRH 和 ghrelin mRNA 在发情期与间情期的表达特点进行研究,为 ghrelin 在下丘脑水平上参与 GnRH 的调节提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂及仪器** 反转录酶(M-MLV)、DNA 聚合酶(*Taq* E)、RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor)为美国 Promega 公司产品;Oligo dT 购自上海生物工程有限公司。

Stratagene Mx 3000P 实时荧光定量 PCR 仪,为美国 Stratagene 公司产品;Biophotometer (RS232C),为德国 Eppendorf 公司产品。

**1.2 实验动物及分组** 健康雌性 SD 大鼠 12

只(体重 225 ~ 250 g),由第四军医大学实验动物中心提供。每只单独饲养,自由饮水和采食,控制相同的光照时间和室内温度。每天进行阴道涂片检查,连续观察 3 个发情周期,确定发情期和间情期,分为 2 组,发情期组和间情期组,每组 6 只。

**1.3 样品采集** 在相应的发情阶段对实验动物放血,快速打开颅腔(尽量避免损伤脑),参照鼠脑图谱确定下丘脑位置,迅速采取下丘脑,置于液氮中,然后置于 - 70 保存备用。

### 1.4 相对定量 RT-PCR

**1.4.1 总 RNA 提取** 利用 Trizol 一步法提取下丘脑总 RNA。每个样品称重后加适量 Trizol 试剂匀浆,按试剂说明书操作方法提取组织总 RNA。然后,用变性琼脂糖电泳鉴定 RNA 的质量。用核酸蛋白测定仪测定其浓度及纯度,稀释为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,分装。分装好的 RNA 样品放入 - 80 冰箱保存备用。

**1.4.2 RNA 反转录(RT)** 每个样品取总 RNA 2  $\mu\text{g}$ ,用 Oligo dT 引物对 RNA 样品进行反转录,获得各样品 RNA 的 cDNA(RT 产物)。RT 反应体系为 25  $\mu\text{l}$ ,包括 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,0.4  $\mu\text{mol/L}$  Oligo dT 引物,0.4 mmol/L dNTP,加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu\text{l}$ ,70 变性 5 min,立即放冰上冷却,再加 8 U RNA 酶抑制剂,100 U M-MLV 反转录酶,5  $\mu\text{l}$  5  $\times$ RT buffer (含 250 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl,15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,375 mmol/L KCl,50 mmol/L DTT),补充 DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{l}$ ,37 反应 60 min,95 反应 5 min。同时用不加反转录酶的反转录体系作为阴性对照,用于检测总 RNA 样品中是否有基因组 DNA 污染。反转录产物(RT 产物)分装,- 20 保存备用。

**1.4.3 引物设计** 从美国国立生物技术信息中心(NCBI)检索大鼠 *ghrelin* (NM 021669)、*GnRH* (NM 012767) 和 *GAPDH* (NM 017008) 基因序列,使用 Primer Primer 5.0 软件设计引物,由大连宝生物工程有限公司合成引物。*Ghrelin* 上游引物:5'-CCAGCAGGAAA GGAATCCA-3',下游引物:5'-GAGCTCCTGACAGCTTGATG-3',预计扩增片段长度 164 bp。*GnRH* 上游引物:5-

TGGGGGGAAGAGAAATAC-3, 下游引物: 5-TCAATCAGACGTTCCAGAGC-3, 预计扩增片段长度 156 bp。GAPDH 上游引物: 5-TTGTGATGGGTGTGAACCAC-3, 下游引物: 5-GCCATCCACAGICTTCTGAG-3, 预计扩增片段长度 179 bp。经 PCR 扩增后, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切取目的基因, 测序, 与 GenBank 上公布的大鼠 *ghrelin*、*GnRH* 和 *GAPDH* 基因序列比较, 序列同源性为 100%。

**1.4.4 标准曲线的制作** 将下丘脑 cDNA 样品分别做混合样(各待测样品等比例混合), 用混合样进行预实验, 选择目的基因和内标基因上下游引物的适宜稀释浓度、反应的退火温度等, 确定优化反应条件。然后在优化好的反应条件下用适宜的梯度稀释法稀释 cDNA 混合样, 荧光定量 PCR 仪检测, 每个样品两个重复, 根据 Ct 值以及稀释梯度制作标准曲线。下丘脑样品 cDNA 混合样以 5 倍浓度梯度进行稀释, 用 1、1/5、1/25、1/125 和 1/625 浓度的 5 个稀释样品作模板, 在优化好的反应条件下进行荧光定量 PCR 反应。实时荧光定量 PCR 仪会根据各个 Ct 值和稀释倍数之间的关系自动生成每对引物的标准曲线。

**1.4.5 实时荧光定量 PCR (SYBR Green)** 用 25  $\mu$ l 的反应体系在已优化好的反应条件下进行扩增, 25  $\mu$ l 的 Real-time 扩增体系包括: 12.5  $\mu$ l 的 SYBR Green Real time PCR Master Mix, 0.5  $\mu$ mol/L 的上、下游引物各 2  $\mu$ l, 2  $\mu$ l 已稀释的 cDNA (根据制作标准曲线的稀释倍数做适宜的稀释), 用灭菌双蒸水补齐到 25  $\mu$ l。在 Stratagene Mx 3000P 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。目的基因 *ghrelin* 和内标基因 *GAPDH* 的 PCR 反应条件为: 95 预变性 10 min; 95 变性 10 s, 64 退火 20 s, 72 延伸 20 s, 共 45 个循环。目的基因 *GnRH* 和内标基因 *GAPDH* 的 PCR 反应条件为: 95 预变性 10 min; 95 变性 10 s, 62 退火 20 s, 72 延伸 20 s, 共 45 个循环。均用去离子水取代模板作阴性对照。每个样品及阴性对照均设 2 个平行, 用另一次反转录的 cDNA 进行一次重复实验。温度反应结

束, 由熔解曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据目的基因荧光扩增曲线的 Ct 值和内标基因荧光扩增曲线的 Ct 值进行定量分析。

**1.5 统计分析** 所有数据采用 SPSS 11.0 统计软件统计, 结果以平均值  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 表示, 差异显著性检验采用独立样本 *t* 检验。检验结果以  $P < 0.05$  代表差异显著,  $P < 0.01$  代表差异极显著。

## 2 结果

**2.1 荧光定量 PCR 的灵敏性和可靠性** 以梯度稀释的 cDNA 混合样为模板进行实时荧光定量 PCR 反应, 得到的扩增曲线(图 1)可见, 不同拷贝数的检测范围较广, 扩增前期, 曲线重合性好且未出现杂峰, 呈现典型的 S 型荧光扩增曲线。荧光扩增曲线基线平整, 也无引物二聚体产生, 一直是水平线; 指数区较明显, 斜率大且固定(平行线); 线性范围广, 为较理想的扩增曲线。说明所建立的实时荧光定量 PCR 方法检测具有较好的敏感性和准确性。图 1 为下丘脑 cDNA 混合样以 5 倍浓度梯度进行稀释后目的基因 *ghrelin* 标准曲线的扩增曲线。

**2.2 标准曲线** 下丘脑目的基因 *ghrelin* 和内标基因 *GAPDH* 标准曲线分别为:  $Y = -3.284X + 23.58$ , 一致系数 0.998;  $Y = -3.398X + 26.12$ , 一致系数 0.999。下丘脑目的基因 *GnRH* 和内标基因 *GAPDH* 标准曲线分别为:  $Y = -3.242X + 23.90$ , 一致系数 1.000;  $Y = -3.415X + 16.26$ , 一致系数 1.000。其中,  $Y$  代表 Ct 值,  $X$  代表模板量的对数值。结果显示, 4 条标准曲线的斜率都接近理想值 -3.322, 一致系数也接近 1.000, 同时从熔解曲线可以看出, 扩增产物特异性非常好, 荧光曲线能够准确地反映目的产物的扩增。图 2 为下丘脑目的基因 *ghrelin* 的标准曲线, 图 3 为下丘脑目的基因 *ghrelin* 标准曲线的熔解曲线图, 其余基因的标准曲线及熔解曲线相似。通过标准曲线可以知道目的基因与内标基因的扩增效率都在 0.8 ~ 1.2 范围内, 并且目的基因与内标基因的扩增效率很接近, 经分析都可采用  $2^{-Ct}$  方法计算

Real-time PCR 反应结果。

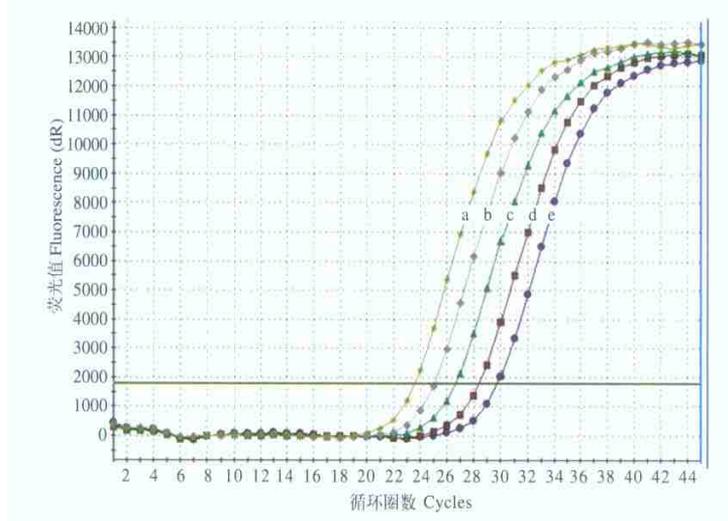


图 1 下丘脑目的基因 ghrelin 浓度梯度扩增曲线

Fig.1 Real-time PCR amplification curves of ghrelin gene

a、b、c、d 和 e 分别表示 1、1/5、1/25、1/125 和 1/625 浓度的 5 个稀释样品的扩增曲线。

a、b、c、d and e represent the amplification curves of 1, 1/5, 1/25, 1/125, and 1/625 samples, respectively.

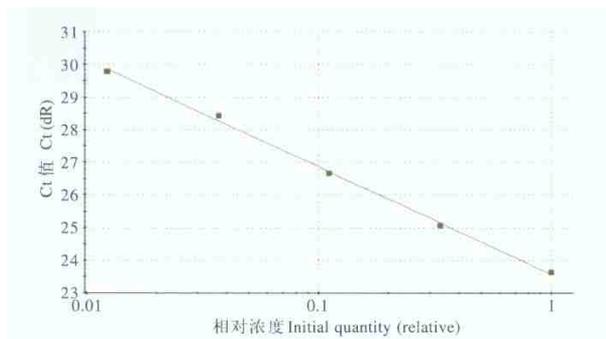


图 2 目的基因 ghrelin 的标准曲线

Fig.2 Standard curve of ghrelin gene

**2.3 熔解曲线与假阳性** 样品 cDNA 在实时荧光定量 PCR 反应的后期,产物经熔解、冷却后得到熔解曲线,可见熔解曲线成单峰,说明扩增产物单一,与 SYBR Green 荧光染料结合的为目标 DNA 片段,较好地避免了定量检测过程中假阳性结果的出现。熔解曲线显示,扩增产物特异性好,荧光曲线能够准确反映目的产物的扩增结果变化。图 4 为目的基因 *ghrelin* 上样的熔解曲线图,其余基因的上样熔解曲线图相似。

**2.4 大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin 和**

**GnRH mRNA 的表达**

**2.4.1 大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin mRNA 的表达** 大鼠下丘脑 ghrelin mRNA 在发情期和间情期都有表达,其表达丰度在间情期水平较高,显著高于发情期水平(图 5,  $P < 0.01$ )。

**2.4.2 大鼠发情期和间情期下丘脑 GnRH mRNA 的表达** 大鼠下丘脑 GnRH mRNA 在发情期和间情期都有表达,其表达丰度在间情期水平低,与发情期相比差异达极显著水平(图 6,  $P < 0.01$ )。

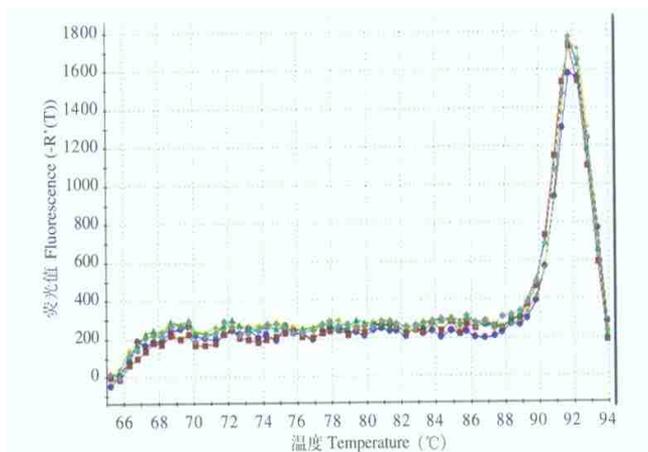


图3 目的基因 ghrelin 的熔解曲线

Fig.3 Melt curve of ghrelin gene

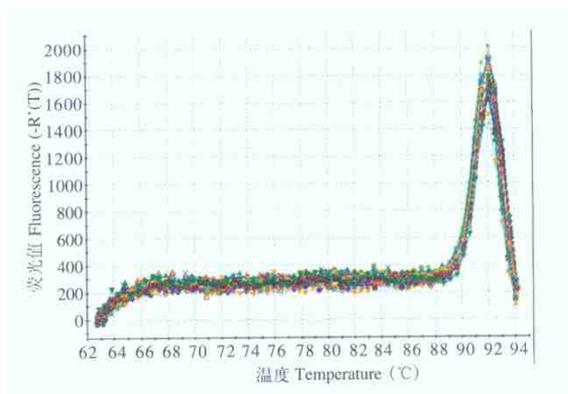


图4 目的基因 ghrelin 上样的熔解曲线

Fig.4 Melt curve of ghrelin gene

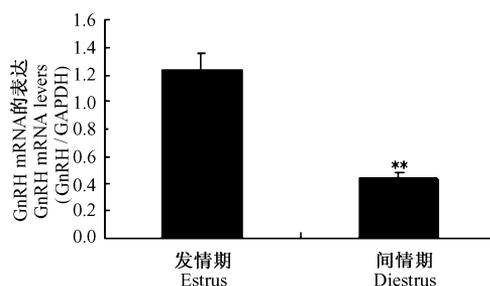


图6 大鼠发情期和间情期下丘脑 GnRH mRNA 的表达

Fig.6 Expression of GnRH mRNA in the hypothalamus of rats

\*\*表示差异极显著,  $P < 0.01$ 。 \*\* Shows  $P < 0.01$ .

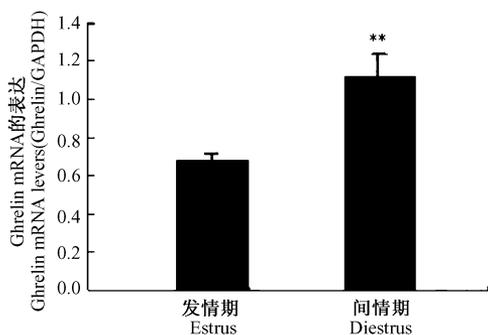


图5 大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin mRNA 的表达

Fig.5 Expression of ghrelin mRNA in the hypothalamus of rats

\*\*表示差异极显著,  $P < 0.01$ 。 \*\* Shows  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

本实验采用实时荧光 RT-PCR 方法对大鼠下丘脑 ghrelin 和 GnRH mRNA 在发情期及间情期的表达特点进行了研究,结果表明,在大鼠发情期和间情期下丘脑 ghrelin 与 GnRH mRNA 都有表达,并具不同的表达模式。Ghrelin mRNA 在间情期的表达丰度显著高于发情期,而 GnRH mRNA 则与 ghrelin mRNA 的表达模式正好相反,在间情期水平低,间情期表达丰度显著低于发情期。

大鼠发情具有一个典型的发情周期,一般一个周期大约 4~5 d 左右。下丘脑-垂体-卵巢轴对发情周期的调控起着关键作用,下丘脑、垂

体和卵巢产生的各种性激素有不同的分泌模式,这些激素维持和调节着大鼠的发情周期。垂体 LH 在发情周期中也呈周期性的分泌,在发情期雌激素水平急剧下降,此阶段会诱导产生 LH 分泌的高峰,随着卵泡破裂、排卵,LH 水平下降,在发情后期、间情期和发情前期 LH 水平都较低。垂体 LH 的分泌受下丘脑 GnRH 的调节,GnRH 对 LH 的分泌起促进作用,发情期 LH 分泌峰必然会反馈性地引起下丘脑 GnRH 分泌的变化,有关间情期和发情期 GnRH mRNA 表达的特点在大鼠未见报道。本实验检测了下丘脑 GnRH mRNA 的表达,结果发现间情期 GnRH mRNA 的表达丰度显著低于发情期,这与 GnRH 在发情周期中的分泌模式一致。

近来的研究表明,ghrelin 在下丘脑和垂体水平上对生殖起抑制性的调节作用,即抑制 GnRH 和 LH 的分泌释放<sup>[12,13]</sup>。免疫组织化学方法的研究表明,ghrelin 和其功能性受体 GHS-R1a 在垂体前叶广泛分布,体内外实验也证明,ghrelin 在垂体水平上可以抑制 LH 的分泌释放<sup>[14]</sup>。下丘脑弓状核、腹内侧核和室旁核等部位都有 ghrelin 和 GHS-R1a 的分布,这些区域主要与调节动物生长、摄食和能量代谢等活动有关,这与 ghrelin 在中枢的生理功能一致,即参与对生长、摄食和能量代谢等的调节。同时也提示,ghrelin 可能通过 GHS-R1a 参与了对生殖的调节,因为 GnRH 神经元也位于这些区域,体内外的实验也表明,ghrelin 在下丘脑水平上对 GnRH 的分泌起抑制作用<sup>[10]</sup>。我们的实验结果表明,下丘脑 ghrelin mRNA 在间情期表达丰度显著高于发情期,这种表达特点与垂体 LH 在发情周期的分泌模式是相适应的,在发情期,LH 要出现一个高水平,即发情期的 LH 峰,在这个阶段 ghrelin 表达水平低,ghrelin 对 GnRH 和 LH 释放的抑制作用减小,有利于 LH 峰的形成,从而引起动物发情和排卵。

实验结果表明,大鼠下丘脑 ghrelin 和 GnRH mRNA 在发情期和间情期具不同的表达模式,该结果支持 ghrelin 在下丘脑和垂体水平

上对 GnRH 和 LH 的分泌起抑制性调节作用的观点。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kojima M, Hsoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth hormone - releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, **402**: 656 ~ 660.
- [ 2 ] 雷治海. Ghrelin 研究进展. 畜牧与兽医, 2005, **37**(5): 54 ~ 57.
- [ 3 ] Horvath T L, Diano S, Sotonyi P, *et al.* Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance - a hypothalamic perspective. *Endocrinology*, 2001, **142**: 4 163 ~ 4 169.
- [ 4 ] Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, *et al.* Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **276**: 905 ~ 908.
- [ 5 ] Gaytan F, Barreiro M L, Chopin L K, *et al.* Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003, **88**: 879 ~ 887.
- [ 6 ] Caminos J E, Tena-Sempere M, Gaytan F, *et al.* Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*, 2003, **144**(4): 1 594 ~ 1 602.
- [ 7 ] Iqbal J, Kurose Y, Canny B, *et al.* Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in Sheep. *Endocrinology*, 2005, **147**(1): 510 ~ 519.
- [ 8 ] Zhang W L, Lei Z H, Su J, *et al.* Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 2008, **109**: 356 ~ 367.
- [ 9 ] 谢启文. 现代神经内分泌学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999, 239 ~ 275.
- [ 10 ] Fernandez R, Sempere T M, Aguilar E, *et al.* Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Letters*, 2004, **362**(2): 103 ~ 107.
- [ 11 ] Martini A C, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, *et al.* Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*, 2006, **147**: 2 374 ~ 2 382.
- [ 12 ] Gill C J, Rissman E F. Female sexual behavior is inhibited by short and long-term food restriction. *Physiol Behav*, 1997, **61**: 387 ~ 394.
- [ 13 ] Bronson F H, Heideman P D. Short-term hormonal responses to food intake in peripubertal female rats. *Am J Physiol*, 1990, **259**: 25 ~ 31.
- [ 14 ] Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro V M, *et al.* Effects of ghrelin upon gonadotropin - releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female Rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Neuroendocrinology*, 2006, **82**: 245 ~ 255.