

# GHS-R1a 在大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的定位及其 mRNA 的周期性表达

王琳 方富贵 章孝荣 刘亚 王索路 蒲勇 李运生

安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

**摘要** 取成年 SD 大鼠的下丘脑、垂体、卵巢组织制成石蜡切片, 采用 PV-9000 两步法免疫组织化学检测 GHS-R1a 在下丘脑-垂体-卵巢轴上的定位。实时荧光定量 PCR 检测 GHS-R1a mRNA 在不同发情周期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的表达。结果表明: GHS-R1a 主要分布在下丘脑的弓状核、腹内侧核、正中隆起等, 腺垂体的嗜色细胞, 卵巢的黄体细胞内、卵母细胞、卵巢门间质细胞内。GHS-R1a mRNA 在不同发情周期大鼠的下丘脑、垂体中均有表达, 且受发情周期的控制, 在整个发情周期大鼠的卵巢中均未检测到 GHS-R1a mRNA 的表达。

**关键词** GHS-R1a; 免疫组织化学; 实时定量 PCR; 大鼠

**中图分类号** S 852.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0039-05

生长素(ghrelin)是一种由 28 个氨基酸组成的酰基肽, 为生长素促分泌素受体(growth hormone secretagogue, GHS-R)的内源性配基<sup>[1]</sup>。它不仅能促进生长激素(growth hormone, GH)分泌, 而且在摄食、能量代谢以及血液动力学等方面也发挥着重要作用。GHS-R 是典型的 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)家族中的一员, 有 2 个亚型, 分别为 GHS-R1a 和 GHS-R1b。功能性受体 GHS-R1a 主要在下丘脑、垂体中表达, 同时在甲状腺、脾、心肌等也有低水平表达<sup>[2-3]</sup>。ghrelin 能显著减少下丘脑水平上促性腺激素释放激素(gonadotrophin releasing hormone, GnRH)的释放, 体外能刺激发情前期和发情后期大鼠垂体促黄体素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)的释放, 而发情期不受影响<sup>[4]</sup>。Isabella 等<sup>[5]</sup>发现 ghrelin 在体外呈剂量依赖性地抑制人黄体细胞合成雌二醇(estrogen, E<sub>2</sub>)和孕酮(progesterone, P<sub>4</sub>), 添加受体阻剂则消除抑制作用。在垂体水平上, GHS-R1a mRNA 周期性表达。ghrelin 的一系列生物学功能均是与其功能性受体 GHS-R1a 相互作用来完成的, 越来越多的证据表明, 动物的下丘脑-垂体-卵巢轴上均存在 GHS-R1a, 且在生殖轴的不同水平发挥作用, 参与生殖轴的

理控制, 但目前关于 GHS-R1a mRNA 在不同发情周期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的表达规律仍不完整。本试验采用免疫组织化学和荧光定量 PCR 方法探讨 GHS-R1a 在大鼠的下丘脑-垂体-卵巢轴上的定位与其基因表达规律, 旨在为进一步阐明 ghrelin 对大鼠的下丘脑-垂体-卵巢轴的作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 试验动物。成年 SD 雌性大鼠(180~240 g) 40 只, 购自安徽医科大学实验动物中心, 置于室温(22~25 °C), 自由摄食与饮水。根据阴道图片观察法<sup>[6]</sup>判断其发情周期, 分 4 组, 处死大鼠, 取其下丘脑、脑垂体、卵巢, 用于免疫组织化学检测的组织经 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 采用 5 μm 连续切片, 其余的 -80 °C 保存, 用于基因定量分析。

2) 试验试剂。GHS-R1a 一抗为兔抗鼠 GHS-R1a 多克隆抗体, 购自德国 ACRIS 公司。PV-9000 两步法免疫组化检测试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司。RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)。SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(大连宝生物工程有

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(070411015)

王琳, 博士研究生, 研究方向: 动物生殖调控技术与机理。E-mail: wangl1120@sina.com

通讯作者: 章孝荣, 博士, 教授, 研究方向: 动物生殖调控。E-mail: zxr@ahau.edu.cn

限公司)

## 1.2 切片的免疫组织化学染色

免疫组织化学 PV-9000 两步法及染色程序均按试剂盒说明进行。(1)切片常规脱蜡至水。(2)热修复抗原,将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0),微波炉加热至沸腾,反复 2~3 次,冷却后 PBS (pH 7.2~7.6) 洗涤 3 次,每次 5 min。(3)3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (V/V) 去离子水室温孵育 10 min 以灭活内源性酶,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(4)滴加一抗 GHS-R1a (1:40),4 °C 过夜。对照组用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。(5)按照 PV-9000 两步法免疫组化检测试剂盒说明,滴加试剂 1:聚合物辅助剂 (polymer helper),37 °C 孵育 20 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(6)滴加试剂 2:辣根酶标记羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体 (HRP labeled goat anti rabbit/mouse IgG polymer) 37 °C 孵育 30 min,PBS 洗 4 次,每次 5 min。(7)DAB 显色 10~20 s,蒸馏水洗涤。(8)苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。显微镜观察,阳性产物呈棕黄色,阴性对照组则无阳性产物。

## 1.3 实时荧光定量 PCR

1)总 RNA 的提取和反转录。将组织从 -80 °C 中取出,添加液氮,研磨至粉末,按照 TRIzol 试剂盒抽提总 RNA。使用 Anchored Oligo(dT)<sub>18</sub> 引物对 RNA 样品按逆转录试剂盒操作说明进行逆转录反应,总体积 20 μL,反应体系如下:2 μL 总 RNA、1 μL Anchored Oligo(dT)<sub>18</sub>、10 μL 2×TS Reaction Mix、6 μL Rnase-free Water、1 μL TransScript RT Enzyme Mix。42 °C 孵育 50 min,70 °C 加热 15 min,反转录产物于 -20 °C 保存待用。

2)引物设计。GHS-R1a 和 β-actin 的引物序列分别参照 Fernandez 等<sup>[4]</sup>与 Kang 等<sup>[7]</sup>的序列,由上海生工生物技术有限公司合成,GHS-R1a:上游引物 5'-CCTCGCTCCGGGACCAGAACC-3',下游引物 5'-GTTGATGGCAGCGCTGAGGTAGAA-3';β-actin 上游引物 5'-CAGCCTTCCTTCCTGGG-TATG-3',下游引物 5'-TAGAGCCACCAATCCACACAG-3'。扩增片段分别为 205 bp 和 246 bp。

3)GHS-R1a mRNA 的实时荧光定量 PCR 检测。按每升 1×10<sup>0</sup>、1×10<sup>1</sup>、1×10<sup>2</sup>、1×10<sup>3</sup>、1×10<sup>4</sup> 拷贝数稀释 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 操作,制作标准曲线和溶解曲线,建立最佳的反应条件。反应体系为:上游引物 (10 μmol/L) 1 μL、下游引物

(10 μmol/L) 1 μL、SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μL、cDNA 2 μL 加无核酶水至 25 μL。反应条件为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,58 °C 20 s,72 °C 15 s,45 个循环。将目的基因的 CT 值 (Threshold cycle) 与标准曲线的 CT 值相比较,作为目的基因 mRNA 的相对含量。每个样本重复 3 次,以平均值表示最后结果。

## 1.4 统计学分析

所有数据采用 AVEDEV 统计,以 *t*-test 检验差异显著性,*P*<0.05 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 GHS-R1a 在大鼠生殖轴上的定位

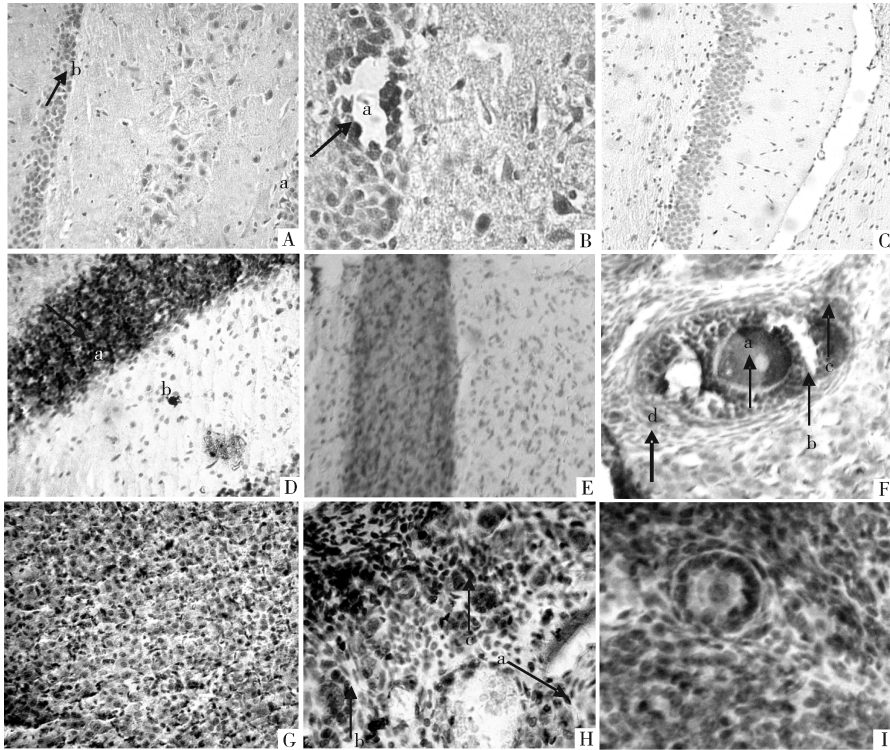
1)GHS-R1a 在下丘脑上的定位。GHS-R1a 主要分布在弓状核,腹内侧核 (图 1-A),正中隆起 (图 1-B) 的细胞内,胞体呈不规则的圆形、卵圆形、梭形、三角形等,神经元胞质内充满棕色的反应颗粒,核不着色,位于中央或偏向一侧。对照组无阳性细胞 (图 1-C)。

2)GHS-R1a 在脑垂体上的定位。GHS-R1a 主要分布在腺垂体的嗜色细胞内,胞体呈圆形、卵圆形、多角形等,胞质内充满棕色的反应颗粒,核周有少量着色,神经垂体则无阳性细胞 (图 1-D)。对照组无阳性细胞 (图 1-E)。

3)GHS-R1a 在卵巢上的定位。GHS-R1a 在卵母细胞 (图 1-F)、黄体细胞 (图 1-G)、卵巢门间质细胞 (图 1-H) 均有分布,初级卵泡的粒层细胞、有腔卵泡的内膜层和粒层细胞有少量 GHS-R1a 分布 (图 1-F、H),在原始卵泡的粒层细胞、有腔卵泡阶段外膜层细胞没有 GHS-R1a 分布 (图 1-F、H)。对照组无阳性细胞 (图 1-D)。

### 2.2 GHS-R1a mRNA 在发情周期大鼠生殖轴上的表达

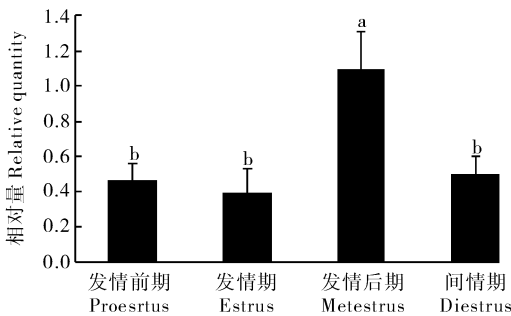
在整个发情周期中,大鼠下丘脑中均表达 GHS-R1a mRNA,其中 GHS-R1a mRNA 在发情期最低,到发情后期达到最高值,其中发情后期与发情前期、发情期、间情期差异显著 (图 2)。在整个发情周期中,大鼠脑垂体中均表达 GHS-R1a mRNA,其中 GHS-R1a mRNA 在发情前期最高,发情后期达到最低值,发情前期与发情期、发情后期、间情期差异显著 (图 3)。而在整个发情周期中,大鼠卵巢中均没有 GHS-R1a mRNA 的表达。



A. 下丘脑(×250), a. 弓状核, b. 腹内侧核; B. 下丘脑(×400), a. 正中隆起; C. 阴性对照组下丘脑(×250); D. 垂体(×250), a. 神经垂体, b. 腺垂体; E. 阴性对照脑垂体(×250); F. (×250), a. 卵母细胞, b. 有腔卵泡的粒层细胞, c. 有腔卵泡的内膜层细胞, d. 有腔卵泡的外膜层细胞; G. 黄体细胞(×250); H. (×250), a. 卵巢间质细胞, b. 初级卵泡的粒层细胞, c. 原始卵泡的粒层细胞; I. 阴性对照组卵巢(×250)。  
 A. Hypothalamus(×250), a. Arcuate nuclei, b. Ventromedial nucleus; B. Hypothalamus(×400), a. Median eminence; C. Negative control group, hypothalamus(×250); D. Pituitary(×250), a. Posterior pituitary, b. Anterior pituitary; E. Negative control group, pituitary(×250); F. (×250), a. Oocyte, b. Granulosa cells of antral follicle, c. Interna thecal cells of antral follicle, d. Externa thecal cells of antral follicle; G. Luteal cells (×250); H. (×250), a. Hilus interstitial cells, b. Primary follicle granulosa cells, c. Primordial follicle granulosa cells; I. Negative control group, ovaries(×250).

图 1 GHS-R1a 阳性细胞在大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的分布

Fig. 1 The distribution of GHS-R1a immunopositive cells in the hypothalamus-pituitary-ovarian axis



不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。Different letter denotes a significant different ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图 2 GHS-R1a mRNA 在不同发情周期大鼠下丘脑中的表达  
 Fig. 2 Expression of GHS-R1a mRNA in hypothalamus of female rats with the estrous cycle

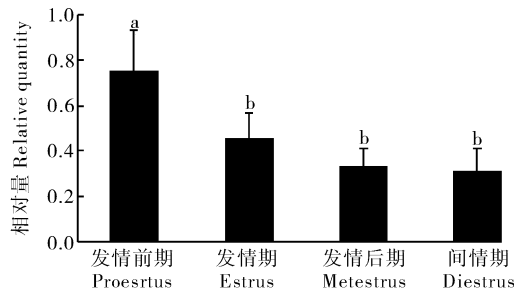


图 3 GHS-R1a mRNA 在不同发情周期大鼠脑垂体中的表达

Fig. 3 Expression of GHS-R1a mRNA in pituitary glands of female rats with the estrous cycle

### 3 讨论

Guan 等<sup>[8]</sup> 通过原位杂交实验发现 GHS-R

mRNA 在大鼠下丘脑中的弓状核、腹内侧核有分布, 室旁核呈少量分布。我们首次通过免疫组化技术检测 GHS-R1a 在大鼠下丘脑中的定位, 结果显

示 GHS-R1a 免疫阳性细胞主要分布在弓状核、腹内侧核,正中隆起,这和 GHS-R1a 在绵羊<sup>[9]</sup>、人类<sup>[10]</sup>的下丘脑中分布一致,说明 GHS-R1a 在种系发生上具有保守性。下丘脑弓状核是动物生殖调控中心,GHS-R1a 免疫阳性细胞在此分布,意味 ghrelin 可以通过其功能性受体 GHS-R1a 参与动物生殖调控。

免疫组织化学表明,GHS-R1a 主要分布在大鼠腺垂体的嗜色细胞内,而神经垂体则无。腺垂体是促性腺激素分泌中心,GHS-R1a 免疫阳性细胞在腺垂体中的大量分布说明了 ghrelin 可能参与促性腺激素的分泌。Fernandez 等<sup>[4]</sup>通过体内、体外试验证实 ghrelin 对促卵泡素和促黄体素的分泌起着重要的调控功能。

GHS-R1a 在绵羊有腔卵泡的粒层细胞和大卵泡的膜层细胞均有分布,在卵母细胞内少有表达<sup>[9]</sup>。目前,关于 GHS-R1a 在大鼠卵巢上的定位仍未见报道,免疫组织化学结果表明 GHS-R1a 主要分布在黄体细胞、卵母细胞上,初级卵泡的粒层细胞、有腔卵泡的粒层和内膜层细胞有少量 GHS-R1a 分布,而原始卵泡的粒层细胞、有腔卵泡阶段外膜层细胞无。GHS-R1a 在大鼠卵巢上的分布和人基本一致<sup>[11]</sup>,和绵羊相比稍有区别<sup>[9]</sup>,GHS-R1a 在卵母细胞上的分布导致 ghrelin 对卵母细胞的发育、成熟可能产生一定的影响,但目前这方面的报道较少。

我们探讨 GHS-R1a 在不同发情周期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的表达时发现,GHS-R1a 在不同发情周期大鼠的下丘脑、垂体均有表达,其中下丘脑中的 GHS-R1a mRNA 在发情前期达到最高值,在间情期最低。这和 Tamar 等<sup>[12]</sup>所报道大鼠下丘脑中的 GnRH mRNA 在发情周期中的变化趋势一致,由于 GHS-R1a 与 GnRH 都主要在下丘脑弓状核和腹内侧核中表达,且 ghrelin 可以通过其受体 GHS-R1a 抑制下丘脑 GnRH 的释放,这提示了 GnRH 的表达可能受到 GHS-R1a 表达的调控。Abizaid 等<sup>[13]</sup>发现脑垂体内的 GHS-R1a mRNA 的水平在大鼠哺乳期迅速上升。在本试验中,大鼠脑垂体中 GHS-R1a mRNA 在间情期仍然维持较低水平,这和 Fernandez 等<sup>[4]</sup>的结果并不完全一致,究其原因,可能是在发情周期中,由于间情期占有很大的比重,对间情期的判断标准并不完全一致,导致本试验间情期 GHS-R1a mRNA 水平接近发情后期,而 Fernandez 等<sup>[4]</sup>的结果接近发情前期。张文龙<sup>[14]</sup>在

苏钟猪上也得出和文献<sup>[4]</sup>类似的结论,这说明 GHS-R1a mRNA 在哺乳动物脑垂体上的表达可能不存在物种的差异性。在大鼠整个发情周期卵巢中未检测到 GHS-R1a mRNA 的表达,免疫组织化学结果却显示大鼠卵巢中存在 GHS-R1a。在女性卵巢中也发现类似的情况,Gnanapavan 等<sup>[2]</sup>在女性卵巢中未检测到 GHS-R1a mRNA 的,但免疫组织化学结果显示卵巢中有 GHS-R1a<sup>[11]</sup>。其原因仍不清楚。Gaytan 等<sup>[15]</sup>报道 GHS-R 的 2 种亚型呈阶段性表达,在初情期前雄性大鼠的睾丸中主要是 GHS-R1b mRNA,而后以 GHS-R1a mRNA 为主。Isabella 等<sup>[5]</sup>发现在妇女颗粒黄体细胞中 GHS-R1a mRNA 和 GHS-R1b mRNA 均存在,但后者显著高于前者。Hossein 等<sup>[16]</sup>报道在猪的卵泡液细胞中有 GHS-R1b mRNA 大量存在,而 GHS-R1a mRNA 未被发现。在雌性大鼠中 GHS-R1a mRNA 和 GHS-R1b mRNA 是否也是阶段性表达有待于进一步研究。

总之,大鼠下丘脑、垂体、卵巢中均存在 GHS-R1a,这预示 chrelin 对生殖激素的分泌、性腺的发育以及生殖细胞的成熟可能均有潜在的调控作用。下丘脑、垂体中的 GHS-R1a 的表达受到发情周期的控制,至于其作用机制有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] KOJIMA M, HOSODA H, NALAZATO M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated from stomach[J]. Nature, 1999, 402: 656-660.
- [2] GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN S A, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87 (6): 2988-2991.
- [3] NOGUEIRAS R, TOVAR S, MITCHELL S, et al. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the avcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin[J]. Diabetes, 2004, 53: 2552-2558.
- [4] FERNANDEZ R, TENA-SEMPEPERE M, VICTOR M, et al. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats; *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Neuroendocrinology, 2005, 82: 245-255.
- [5] ISABELL A V, ALESSANDRA V, FRANCESCO T, et al. Ghrelin inhibit steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(4): 1476-1481.
- [6] 张森, 王新, 韦旭斌, 等. 大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 69-72.

- [7] KANG K S, KYUNG S, JEONG-HWAN C, et al. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl-hydroxybenzoic acid[J]. *Toxicology*, 2002, 64(3): 227-235.
- [8] GUAN X M, YU H, PALYHA O C, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues[J]. *Molecular Brain Research*, 1997, 48(1): 23-29.
- [9] MILLER D, HARRISON J, BROWN Y, et al. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 3: 60.
- [10] JUDIT M, GÁBOR W, ERIK H, et al. Distribution of ghrelin-immunoreactive neuronal networks in the human hypothalamus[J]. *Brain Research*, 2006, 1125: 31-36.
- [11] GAYTAN F, BARREIRO M, CHOPIN L, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 879-887.
- [12] TAMAR D, SCHIRMAN H, TZACHI B, et al. Differential gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression patterns in different tissues of the female rat across the estrous cycle[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(8): 3401-3408.
- [13] ABIZAID A, SCHIAVO L, DIANO S, et al. Hypothalamic and pituitary expression of ghrelin receptor message is increased during lactation[J]. 2008, 440(3): 206-210.
- [14] 张文龙. Ghrelin 在下丘脑-垂体-卵巢轴对母猪生殖调控的研究[D]. 南京: 南京农业大学动物科技学院, 2008.
- [15] GAYTAN F, BARREIRO M, CAMINOS J, et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 400-409.
- [16] HOSSEIN H, ROBERT N. The role of ghrelin and ghrelin receptors in polycystic ovary syndrome[J]. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2005, 3(2): 68-73.

## Location of GHS-R1a in rats hypothalamus-pituitary-ovarian axis and GHS-R1a mRNA expression during estrous cycle

WANG Lin FANG Fu-gui ZHANG Xiao-rong LIU Ya WANG Suo-lu PU Yong LI Yun-sheng

*College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China*

**Abstract** The distribution of GHS-R1a in hypothalamus-pituitary-ovarian axis were detected by PV-9000 two-step immunohistochemical. Real-time quantitative PCR was used to detect expression of GHS-R1a mRNA during estrous cycle. The results showed that GHS-R1a were mainly distributed in hypothalamus of the arcuate nucleus, ventromedial nucleus, median eminence, the chromophil cells of anterior pituitary, luteal cells, hilus interstitial cells, and oocyte. GHS-R1a mRNA were expressed in hypothalamus and pituitary of rats throughout the estrous cycle and regulated by estrous cycle. GHS-R1a mRNA was not observed in ovary of rats.

**Key words** GHS-R1a; immunohistochemical; real-time quantitative PCR; rat

(责任编辑:边书京)