

## 技术与方法

## GnRH 脉冲模式对 FSH 分泌的影响

王新<sup>1,2</sup> 谭建华<sup>3</sup> 赖小平<sup>2</sup> 万忠海<sup>3\*</sup> 韦旭斌<sup>4\*</sup><sup>1</sup> 青岛农业大学动物科学技术学院, 青岛 266109; <sup>2</sup> 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;<sup>3</sup> 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; <sup>4</sup> 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

**摘要** 本文目的是进行GnRH脉冲模式对FSH分泌影响的研究。用GnRH以不同的脉冲振幅、不同的频率对GTH细胞进行刺激后,检测FSH的24 h分泌量。结果表明,FSH的24 h分泌量,以频率为120 min、振幅20 nmol/L时的GnRH脉冲模式为最高,并且随着GnRH刺激频率的增快或减慢,FSH的分泌量均呈逐渐减少趋势。所以,GnRH脉冲频率本身就是一个调控信号,不同脉冲频率GnRH对FSH表达有着明显不同的影响,在相同振幅条件下,低频脉冲刺激(120 min间隔)时FSH的分泌达到高峰。

**关键词** FSH; GnRH; 脉冲

成年动物的生殖能力主要依赖于下丘脑-垂体-性腺轴的建立和完善,垂体处于轴系的中间环节,分泌的垂体促性腺激素(gonadotrophic hormone, GTH)是参与生殖的重要激素。促性腺激素细胞分泌的促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH)在哺乳动物生殖调控中占据中心地位,它们一方面与性腺内各自受体结合,直接参与性腺功能的调控,另一方面又接受中枢神经系统和内分泌系统的调节。长期以来,国外很多学者如 Childs<sup>[1]</sup>、Burger<sup>[2]</sup>、Shrim<sup>[3]</sup>、Reichler<sup>[4]</sup>、Lisowski<sup>[5]</sup>、Lopot<sup>[6]</sup>、Bastings<sup>[7]</sup>、Weiner<sup>[8]</sup>等在相关方面已经做了大量研究。促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是由下丘脑神经元分泌的一种含10个氨基酸的肽类激素,GnRH最重要的生理功能是作为生理系统的一种关键性神经调节物质,它以脉冲方式分泌,在垂体前叶内作用于促性腺激素分泌细胞,刺激LH及FSH的分泌,从而对生殖轴起作用,调节性腺内配子形成和激素功能。在本文实验中,重点进行GnRH脉冲频率对FSH分泌影响的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 4月龄雌性Wistar大鼠由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器 GnRH(Sigma); FSH 酶联

ELISA 检测试剂盒(RapidBio Lab); RPMI 1640 培养基(Gibco); 酶标仪(Tecan); 生物安全柜(Thermo Forma); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Kendro)。

### 1.2 方法

1.2.1 垂体前叶细胞的体外原代培养 参考Guillemin<sup>[9]</sup>的方法做适当修改。取大鼠,麻醉,心脏采血后断头,将头浸于75%的酒精中消毒。在生物柜中,打开颅骨找到脑垂体,挑去神经垂体,取出腺垂体,将其放入4℃的5 ml 0.3% BSA-CMF Hanks液中。用0.3% BSA-CMF Hanks漂洗2次,剪成不大于1 mm×1 mm×1 mm大小的腺垂体肉糜。以1 000 r/min离心5 min,沉淀用2 ml 0.25% 胶原酶II-CMF Hanks液重新悬浮,吹打。将离心管放入37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置30 min消化,每10 min吹打一次。终止消化。用滤网过滤,用台盼蓝计算细胞成活率,成活率90%以上才可以进行接种。将细胞调整到1×10<sup>6</sup>个/ml,接种在96孔板经过L-poly-lysine包被的细胞孔中,每孔加100 μl细胞悬液。37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

1.2.2 确定GnRH脉冲最佳振幅宽度 在96孔细

收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2010-11-25

国家自然科学基金(No.30571356), 青岛农业大学课题(No.630810, No.SYJK09-05, No.XJG0906)和广州中医药大学博士后科研启动金(No. B3YH1008)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0431-86985953, E-mail: wzh531@sohu.com; Tel: 0431-87836169, E-mail: weixub@163.com

胞培养板里对垂体前叶细胞进行 GnRH 脉冲刺激。设 7 种 GnRH 脉冲振幅高度(GnRH 浓度): 0 nmol/L、0.1 nmol/L、1.0 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、500 nmol/L、1 000 nmol/L; 每种浓度设 4 种脉冲频率: 分别为间隔 30 min、60 min、120 min、240 min; 每种频率再分为三个振幅宽度(GnRH 作用持续时间): 10 min、20 min、30 min (图 1)。每种脉冲方式(振幅高度、宽度、持续时间)均连续刺激 24 h, 分别收集每种脉冲方式所得的细胞培养液, 用 FSH 酶联 ELISA 检测试剂盒检测并计算出每个细胞培养孔中 FSH 浓度, 从而算出每孔中 FSH 含量。再将每孔中细胞分别消化, 计数, 得到每孔细胞数。这样可以计算得到相应细胞培养孔中平均细胞 FSH 分泌量。在细胞培养孔加入和吸出液体时, 要轻柔操作, 消化的时间也要把握好, 以避免损伤细胞。

**1.2.3 确定 GnRH 脉冲最佳振幅高度和频率** 根据 1.2.2 的实验结果, 确定 GnRH 的作用时间(振幅宽度)为 30 min, 作用浓度(振幅高度)确定为 5 nmol/L、

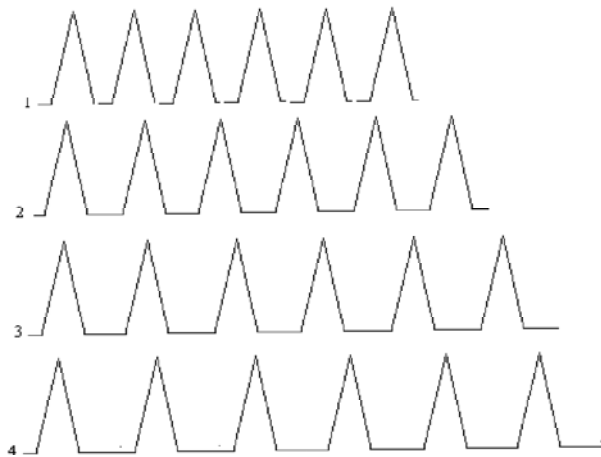


图 1 GnRH 脉冲方式示意图

脉冲频率 1: 间隔 30 min 刺激 1 次; 脉冲频率 2: 间隔 60 min 刺激 1 次; 脉冲频率 3: 间隔 120 min 刺激 1 次; 脉冲频率 4: 间隔 240 min 刺激 1 次。每种频率有不同的振幅。其中 GnRH 浓度(振幅高)设为 0 nmol/L、0.1 nmol/L、1.0 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、500 nmol/L 和 1 000 nmol/L 7 种, GnRH 作用的持续时间(振幅宽)设为 10 min、20 min、30 min 3 种。

Fig. 1 The diagram of the GnRH pulse mode

The first frequency: at the intervals of 30 min; The second frequency: at the intervals of 60 min; The third frequency: at the intervals of 120 min; The fourth frequency: at the intervals of 240 min. At each frequency, different amplitude of vibration was devised, the height of which (the concentration of GnRH) was respectively 0 nmol/L, 0.1 nmol/L, 1.0 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L and 1 000 nmol/L and the width of which (the functioning duration of GnRH) was respectively 10 min, 20 min and 30 min.

20 nmol/L、50 nmol/L、80 nmol/L 四种, 在此基础上, 设计 4 种脉冲频率, 分别为间隔 30 min、60 min、120 min、240 min 刺激一次。每种脉冲方式均连续刺激 24 h, 收集细胞培养液, 重复 5 次。用 FSH 酶联 ELISA 检测试剂盒检测并计算 FSH 浓度, 得到相应细胞培养孔中平均细胞 FSH 分泌量。检测在每一种 GnRH 脉冲振幅的高度下, 频率变化时, 细胞的 FSH 的平均分泌量。比较分析, 从而确定最佳脉冲振幅高度和频率。

**1.2.4 数据处理与统计分析** 采用生物统计软件 SPSS12.0 对数据进行统计分析, 数值用 mean±SE 表示。

## 2 结果

### 2.1 确定 GnRH 脉冲最佳振幅宽度

图 2 表示在脉冲频率相同、振幅高度相同、振幅宽度不同下的 FSH 分泌的比较。由图 2 可以看出, 只要在频率相同、振幅高度相同的 GnRH 脉冲刺激下, 大鼠垂体细胞在体外分泌 FSH 能力在振幅宽度为 30 min 时是最高的。所以确定振幅宽度是 30 min。

### 2.2 确定 GnRH 脉冲最佳振幅高度和频率

图 3 表示在四种不同频率 GnRH 脉冲下 FSH 的 24 h 分泌量(ng/100 cells)。由图 3 看出, FSH 的 24 h 分泌量, 以频率为 30 min, 振幅 20 nmol/L 时的 GnRH 脉冲模式为最高(与其它组别比,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

GnRH 是性腺轴上的最高一环, 主要由下丘脑促垂体区肽能神经元分泌, 进入垂体门脉系统, 刺激垂体前叶促性腺激素细胞合成释放 FSH 和 LH。Clarke<sup>[10]</sup>、Levine<sup>[11]</sup> 等研究, 下丘脑 GnRH 间歇地释放到垂体门脉循环中, 进而调节 LH 和 FSH 的脉冲式分泌。体外的情形已有许多报道证实是与体内相似的<sup>[12-14]</sup>。

在本实验中, 为了摸索在体外 LH 应答的最佳 GnRH 脉冲方式, 我们进行了不同频率、不同振幅 GnRH 刺激下 FSH 的应答实验。在有关资料的 GnRH 灌注<sup>[13,14]</sup> 实验中, GnRH 作用时间是 10 min 左右, 但是考虑在本实验里, 在相同浓度的 GnRH 作用时, 作用时间是 30 min 时, FSH 的分泌比其它时间(10 min、20 min) 高, 所以最后确定 30 min 为最佳振幅宽度。而在频率一定, 幅宽相同的时候, 1 nmol/L ~ 100 nmol/L 幅高时, FSH 的分泌量最大。这个结果表明, 适合于 FSH 幅高是在 1 nmol/L ~ 100 nmol/L 之间, 再参考

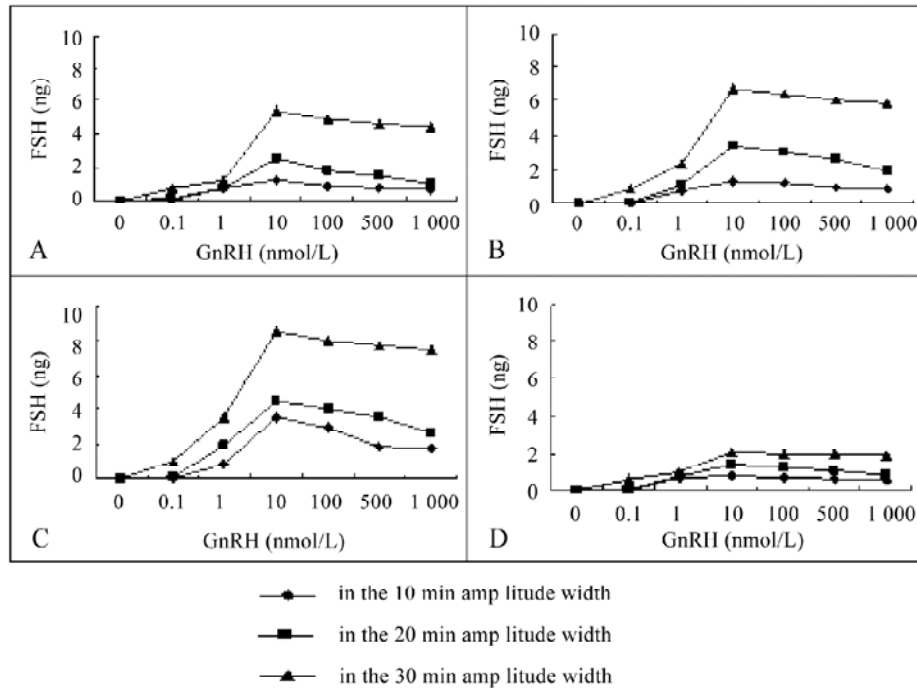


图 2 在不同 GnRH 脉冲频率时 FSH 24 h 的分泌量(ng/100 个细胞)

A: 在 30 min 脉冲频率时; B: 在 60 min 脉冲频率时; C: 在 120 min 脉冲频率时; D: 在 240 min 脉冲频率时。

Fig. 2 The FSH secretion at different GnRH impulse frequencies in 24 hours (ng/100 cells)

A: at the frequency of 30 min; B: at the frequency of 60 min; C: at the frequency of 120 min; D: at the frequency of 240 min.

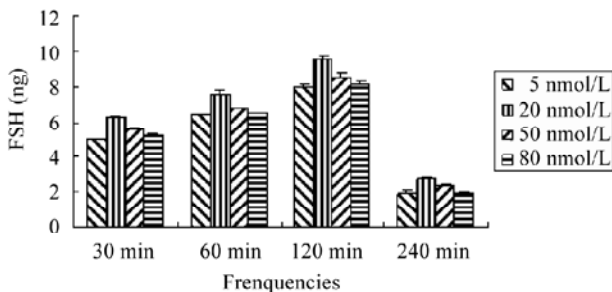


图 3 四种不同频率 GnRH 脉冲下 FSH 的 24 h 分泌量 (ng/100 个细胞)

Fig.3 The FSH secretion at four different GnRH impulse frequencies in 24 hours (ng/100 cells)

谢表明等的实验数据<sup>[12,13]</sup>, 尤其是 Kaiser 等<sup>[14]</sup>的实验, 在这些实验中, GnRH 的振幅在 5 nmol/L ~25 nmol/L 之间(有的使用 25 ng/ml, 由于 GnRH 的分子量是 1.182 kDa, 所以换算过来, 也在这个范围), Kaiser 等的实验认为刺激 FSH 分泌的最佳振幅是 20 nmol/L 和 120 min。在进一步确定幅高和频率的实验中, 确定幅高为 5 nmol/L、20 nmol/L、50 nmol/L、80 nmol/L, 由于在第 1 个实验中设了阴性对照组, 并且其数值和施药组相比, 相差太远, 所以第 2 个实验不设 0 nmol/L

实验组。从实验结果可以看到, 无论用哪个浓度的 GnRH 刺激, 在同一振幅的情况下, 以 120 min 的频率刺激时, 平均每个细胞 FSH 的分泌量显著高于其他频率, 其中又以浓度为 20 nmol/L 的 GnRH 刺激时, FSH 分泌量最高。文献资料报导<sup>[11,15,16]</sup>, 不同生理条件下, GnRH 频率和振幅是不同的, GnRH 持久或高频脉冲(约 10 min)使共有的  $\alpha$  亚基表达, 在卵泡期表现为低频脉冲(约 30 min ~60 min), 促使 LH  $\beta$  亚基表达, 而在黄体期较其更为低的频率(约 120 min ~180 min), 促使 FSH  $\beta$  亚基表达。本实验结果也符合在生理条件下的情况。

以上结果说明, 引起 FSH 的表达最合适 GnRH 脉冲频率是 120 min, 振幅高度是 20 nmol/L, 振幅宽度是 30 min。本文实验也支持了一个假说: GnRH 脉冲频率本身就是一个调控信号, 不同脉冲频率 GnRH 对 FSH 表达有着明显不同的影响, 在相同振幅条件下, 低频脉冲刺激(120 min 间隔)时 FSH 的分泌达到高峰。

参考文献(References)

- 1 Childs GV. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc Res Tech* 1997; 39: 114-30.
- 2 Burger LL, Haisenleder DJ, Wotton GM, Aylor KW, Dalkin

- AC, Marshall JC. Theregulation of FSH beta transcription by gonadal steroids: testosterone and estradiol modulation of the activin intracellular signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1): E277-85.
- 3 Shrim A, Elizur SE, Seidman DS, Rabinovici J, Wisner A, Dor J. Elevated day 3 FSH/LH ratio due to low LH concentrations predicts reduced ovarian response. *Reprod Biomed Online* 2006; 2: 418-22.
- 4 Reichler IM, Welle U, Sattler W, Jöchle M, Roos M, Hubler M, *et al.* Comparative quantitative assessment of GnRH- and LH-receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs. *Theriogenology* 2007; 67(6): 1134-42.
- 5 Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, Blitek A, Kaczmarek MM, Gajewska A, Kochman H, *et al.* Development of real-time PCR assays in the study of gonadotropin subunits, follistatin and prolactin genes expression in the porcine anterior pituitary during the preovulatory period. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(6): 958-64.
- 6 Lopot M, Ciechanowska M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Changes in the GnRH mRNA and GnRH receptor (GnRH-R) mRNA levels in the hypothalamic-anterior pituitary unit of anestrous ewes after infusion of GnRH into the third cerebral ventricle. *Reprod Biol* 2008; 8(2): 149-61.
- 7 Bastings E, Beckers A, Reznik M, Beckers JF. Immunocytochemical evidence for production of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in separate cells in the bovine. *Biol Reprod* 1991; 45(5): 788-96.
- 8 Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol* 1992; 13(2): 95-119.
- 9 Guillemin R, Rosenberg B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 1955; 57(5): 599-607.
- 10 Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111(5): 1737-9.
- 11 Levine JE, Ramirez VD. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 1982; 111(5): 1439-48.
- 12 Goodyer CG, Guyda H, Robert F, Giroud CJ. Human fetal pituitary in culture: hormone secretion and response to somatostatin, luteinizing hormone releasing factor, thyrotropin releasing factor and dibutyryl cyclic AMP. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45(1): 73-85.
- 13 谢表明, 毛全福, 徐美红, 顾佩德, 谢衷洁. 雌性大鼠离体垂体前叶内在促黄体生成激素释放节律性现象. *生理学报* 1997; 49(6): 649-56.
- 14 Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels *in vitro*. *Endocrinology* 1997; 138(3): 1224-31.
- 15 Wurmbach E, Yuen T, Ebersole BJ, Sealfon SC. Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47195-201.
- 16 欧阳五庆, 王秋芳. 与 GnRH 分泌相关的电生理变化. *动物医学进展* 1997; 18(2): 14-8.

## The Effect of GnRH Impulse Mode on FSH

Xin Wang<sup>1,2</sup>, Jian-Hua Tan<sup>3</sup>, Xiao-Ping Lai<sup>2</sup>, Zhong-Hai Wan<sup>3\*</sup>, Xu-Bin Wei<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Science College of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; <sup>2</sup>Traditional Chinese Medical Academy of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; <sup>3</sup>Institute of Military Veterinary Academy of Military Medical Science, PLA, Changchun 130062, China; <sup>4</sup>Pasturage and Theriatrics School, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract** This article aims to research the influence of GnRH impulse mode on the secretion of FSH. The stimulation experiment of GnRH at different frequencies and with different amplitude lasted 24 h, and then the secretory volume of FSH was detected. The result shows the secretory volume of FSH reaches the top when the frequency of GnRH impulse is 120 min and the vibration amplitude of it is 20 nmol/L, moreover, with the hurrying up or the stepping down of the frequency of GnRH stimulation, the secretion of FSH is both reducing gradually. So, GnRH impulse frequency itself is a regulation signal, and the different impulse frequencies of GnRH have clearly different influence on the expression of FSH. In the condition of the same vibration amplitude, when the cells are stimulated by impulse at low frequency (at the interval of 120 min), the secretion of FSH reaches the top.

**Key words** FSH; GnRH; impulse

Received: October 21, 2010 Accepted: November 25, 2010

This work was supported by the National Science Foundation of China (No.30571356), Qingdao Agriculture University Research Program (No.630810, No.SYJK09-05, No.XJG0906) and Guangzhou University of Chinese Medicine Program (No.B3YH1008)

\*Corresponding author. Tel: 86-431-86985953, E-mail: wzh531@sohu.com; Tel: 86-431-87836169, E-mail: weixub@163.com