

## LH在体外对GnRH脉冲模式的应答

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, 山东青岛 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:**为进行GnRH脉冲模式对FSH分泌影响的研究,并分析LH对GnRH脉冲应答的特点。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LH的24 h分泌量。结果表明,LH的24 h分泌量,以频率为30 min,振幅20 nM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,LH的分泌量都呈逐渐减少趋势。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LH表达有着明显不同的影响,在相同振幅条件下,高频脉冲刺激(30 min间隔)时LH的分泌达到高峰。

**关键词:**黄体生成素;促性腺激素释放激素;脉冲

中图分类号:S852.21

文献标志码:A

论文编号:2010-2927

### The Response of LH to GnRH Impulse Mode

Wang Xin<sup>1,2</sup>, Tan Jianhua<sup>3</sup>, Lai Xiaoping<sup>2</sup>, Wan Zhonghai<sup>3</sup>, Wei Xubin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Animal Science College of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109;

<sup>2</sup>Traditional Chinese Medical Academy of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006;

<sup>3</sup>Institute of Military Veterinary Academy of Military Medical Science, PLA, Changchun 130062;

<sup>4</sup>Pasturage and Theriatrics School, Jilin University, Changchun 130062)

**Abstract:** To research the influence of GnRH impulse mode on the secretion of LH and analyze the response feature of LH. 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 secretory volume of FSH reaches the top when the frequency of GnRH impulse was 30 min and the vibration amplitude of it was 20 nM, moreover, with the hurrying up or the stepping down of the frequency of GnRH stimulation, the secretion of LH was both reducing gradually. GnRH impulse frequency itself was a regulation signal for the GnRH of different impulse frequencies has clearly different influence on the expression of LH. In the condition of the same vibration amplitude, when the cells were stimulated by impulse at high frequency (at the interval of 30 min), the secretion of LH reached the top.

**Key words:** LH; GnRH; impulse

**基金项目:**国家自然科学基金“不同脉冲频率GnRH调节大鼠GTH表达的信号转导机制研究”(30571356);青岛农业大学高层次人才启动基金“ICA作用GTH细胞的受体后信号转导机制研究”(630810);实验技术课题“小鼠茜素红、Alcian蓝重染色骨组织标本制作方法的改进”(SYJK09-05);教学研究课题“《中兽医学》教学方法的研究”(XJG0906);广州中医药大学博士后科研启动金“不同脉冲频率GnRH调节大鼠GTH表达的信号转导机制研究”(B3YH1008)。

**第一作者简介:**王新,男,1971年出生,吉林松原人,副教授,博士,现在广州中医药大学做博士后研究。通讯地址:510006广州市番禺区广州大学城外环东路232号广州中医药大学药科楼A栋新药研发中心。E-mail: xinw2004me@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**万忠海,男,1968年出生,吉林长春人,博士,主要从事预防兽医学工作。通讯地址:130062长春市绿园区青龙路1068号军事兽医研究所。E-mail: wzh531@sohu.com; 韦旭斌,男,1950年出生,重庆人,教授,博士生导师,主要从事兽医临床中药学研究。通讯地址:130062吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院。E-mail: weixub@163.com。

**收稿日期:**2010-10-13, **修回日期:**2010-11-23。

### 0 引言

GnRH(促性腺激素释放激素)是由下丘脑神经元分泌的一种含十个氨基酸的肽类激素,它以脉冲方式分泌,刺激黄体生成素(LH)及卵泡生成素(FSH)的分泌,从而对生殖轴起作用。许多研究者通过动物体内实验证明了GTH(垂体促性腺激素)的表达对GnRH脉冲频率具有可应答性,不同的GnRH脉冲频率,表达的产物和量是不同的。在实验中,重点进行GnRH脉冲模式对LH分泌影响的研究,并分析LH对GnRH脉冲应答的特点。

### 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,吉林大学基础医学院实验动物中心提供。

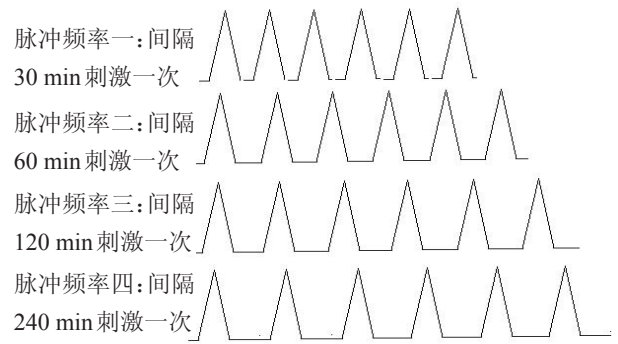
1.1.2 主要试剂和仪器 GnRH(SIGMA); LH酶联ELISA检测试剂盒(RapidBio Lab); RPMI 1640培养基(GIBCO); 酶标仪(TENCAN); 生物安全柜(Thermo Forma); CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Kendro)。

#### 1.2 方法

(1)垂体前叶细胞的体外原代培养。

(2)共设计4种脉冲频率,分别为间隔30、60、120、240 min刺激一次,每种频率下,又设定了不同的振幅。其中振幅高度(GnRH浓度)分为0, 0.1, 1.0, 10, 100, 500, 1000 nM七种,振幅宽度(GnRH作用持续时间)分为10, 20, 30 min。每种脉冲方式均连续刺激24小时(图1)。

(3)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5.0, 20, 50, 80 nM四种,在此基础上,设计4种脉冲频率,分别为间隔30、60、120、240 min刺激一次。每种脉冲方式均连续刺激24 h,重复5次。检测在每一种



每种频率又有不同的振幅,其中GnRH浓度(振幅高)分为0.01~1000 nM 7种;GnRH的作用持续时间(振幅宽)分为10、20、30 min三种

图1 GnRH脉冲方式示意图

GnRH脉冲振幅的高度下,频率变化时,细胞的LH的平均分泌量。确定最佳脉冲振幅高度和频率。

(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 结果与分析

在相同脉冲频率相同振幅不同振幅宽度下的LH分泌的比较,见图2~5。

由图2~5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LH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。

四种不同频率GnRH脉冲下LH的24 h分泌量见图6。

由图6看出,LH的24 h分泌量,以频率为30 min,振幅20 nM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

成年动物的生殖能力主要依赖于下丘脑-垂体-性

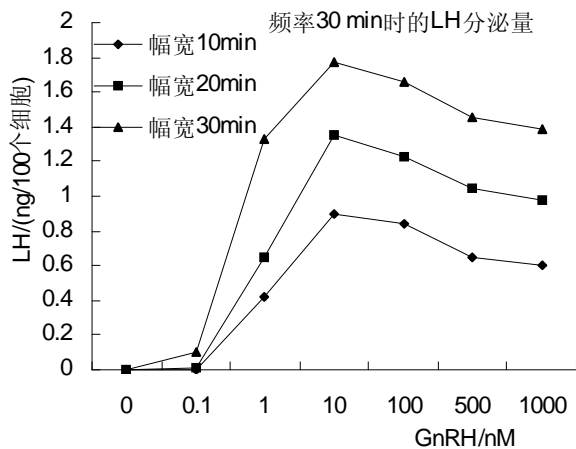


图2 30 min脉冲频率下24 h的LH分泌量

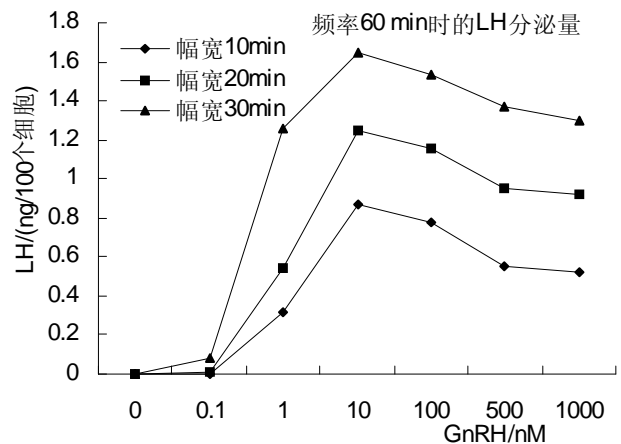


图3 60 min脉冲频率下24 h的LH分泌量

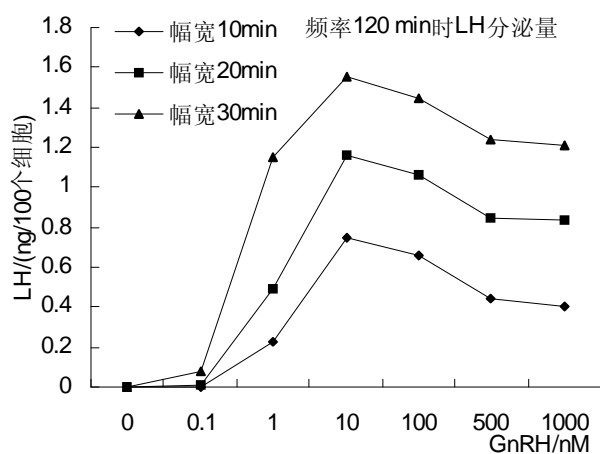


图4 120 min 脉冲频率下 24 h 的 LH 分泌量

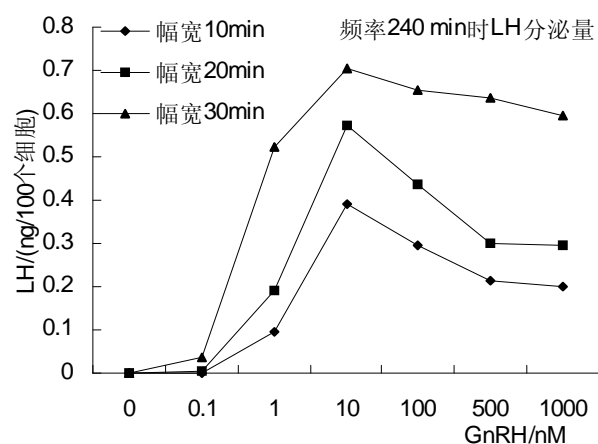


图5 240 min 脉冲频率下 24 h 的 LH 分泌量

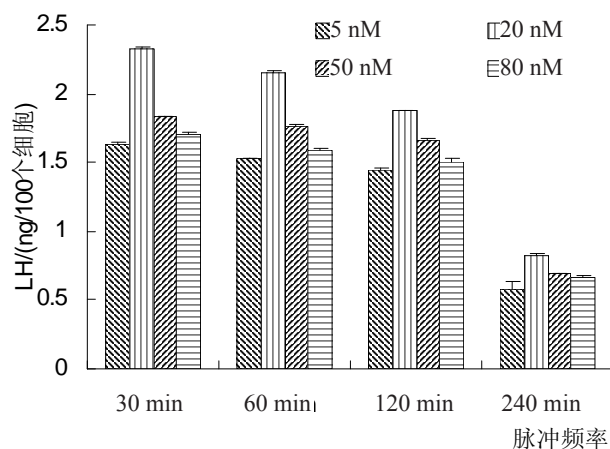


图6 四种不同频率 GnRH 脉冲下 LH 的 24 h 分泌量

腺轴的建立和完善,垂体处于轴系的中间环节,分泌的 GnRH 是参与生殖的重要激素。GnRH 分泌的 FSH 和 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,国内外很多学者在相关方面做了大量研究,例如 GnRH 源泉细胞的三个假说<sup>[1-3]</sup>,在医学上的应用研究<sup>[4-6]</sup>等。在指导畜牧兽医实践中也得到大量应用<sup>[7-9]</sup>。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>。

在实验中,为了摸索在体外 LH 应答的最佳 GnRH 脉冲方式,进行了不同频率、不同振幅 GnRH 刺激下 LH 的应答实验。在相同浓度的 GnRH 作用时,当作用时间是 30 min 时 LH 的分泌是最高的。而在频率一

定,幅宽相同的时候,1~100nM 幅高时, LH 的分泌量最大。这个结果表明,适合于 LH 幅高是在 1~100 nM 之间,再参考谢表明等的实验数据<sup>[12,13]</sup>,尤其是 URSULA B. KAISER 等人的实验<sup>[14]</sup>,在这些实验中, GnRH 的振幅在 5~25 nM 之间(有的使用 25 ng/mL,由于 GnRH 的分子量是 1182,所以换算过来,也在这个范围),KAISER 等人的实验认为刺激 LH 分泌的最佳振幅和频率是 5 nM 和 30 min。确定在进一步确定幅高和频率的实验中,确定幅高为 5、20、50、80 nM,由于在第一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,所以第二个实验不设 0 nM 实验组。从实验结果可以看到,在用同一种频率的 GnRH 刺激时,振幅在 20 nM 以下,随着振幅增加而垂体细胞合成与释放 LH 增加,符合受体的升调节作用理论<sup>[15]</sup>。振幅在 20 nM 以上的时候,随着振幅的增大,垂体细胞合成与分泌 LH 受抑制,这符合受体的降调节作用理论。无论在用哪个浓度的 GnRH 刺激,在同一振幅的情况下,以 30 min 的频率刺激时,平均每个细胞 LH 的分泌

量显著高于其他频率。这也与文献资料相符<sup>[16]</sup>。

以上结果说明,引起LH的表达最合适GnRH脉冲频率是30 min,振幅高度是20 nM,振幅宽度是30 min。

### 参考文献

- [1] Bastings E, Beckers A, Reznik M, et al. Immunocytochemical evidence for production of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in separate cells in the bovine[J]. *Biol Reprod*,1991,45(5):788.
- [2] Weiner R I, Wetsel W, Goldsmith P, et al. Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines[J]. *Grontiers Neuroendocrinology*, 1992,13(2):95-119.
- [3] Childs G V. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes [J]. *Microsc Res Tech*,1997,39:114-130.
- [4] Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, et al. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients[J]. *Andrologia*,2007,39(1):22-7.
- [5] Barmat LI, Chaivtilis S J, Hurst B S, et al. A randomized prospective trial comparing gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) versus GnRH-agonist/rFSH in women pretreated with oral contraceptives before in vitro fertilization[J]. *Fertil Steril*,2005,83 (2):321-30.
- [6] Shrim A, Elizur S E, Seidman D S, et al. Elevated day 3 FSH/LH ratio due to low LH concentrations predicts reduced ovarian response[J]. *Reprod Biomed Online*,2006,2:418-422.
- [7] 方富贵,蒲勇,王索路,等.重组GnRH主动免疫公猪的效果及对垂体GnRH受体、FSH $\beta$ 和LH $\beta$ 基因表达的影响[J].*中国免疫学杂志*, 2009,25(9):824-827.
- [8] 宾红,贾晶,邱玉莹.促性腺素释放素拮抗剂在体外受精-胚胎移植中的LH峰抑制[J].*生殖与避孕*,2008,28(7):432-435.
- [9] 乔跃兵,马秀艳,崔慧先.瘦素与生殖[J].*生殖与避孕*,2008,28(5): 312-317.
- [10] Clarke I J, Cummins J T. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes[J]. *Endocrinology*,1982,111 (5):1737-1739.
- [11] Levine J E, Ramirez V D. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae[J]. *Endocrinology*,1982,111(5): 1439-1448.
- [12] Goodyer C G, Hall C S, Guyda H, et al. Human fetal pituitary in culture:hormone secretion and response to somatostatin,luteinizing hormone releasing factor,thyrotropin releasing factor and dibutyryl cyclic AMP[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,1977,45(1):73.
- [13] 谢衷明,毛全福,徐美红,等.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[J].*生理学报*,1997,49(6):649-656.
- [14] Ursulab Kaiser, Andrzej Jakubowiak, Anna Steinberger, et al. Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone(GnRH) Pulse Frequency on Gonadotropin Subunit and GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels in Vitro[J].*Endocrinology*,1997, 138(3):1224-1230.
- [15] Conn P M, Crowley W F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs[J]. *Ann Rev Med*,1994,45:391-405.
- [16] Wurmbach E, Yuen T, Ebersole B J, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization[J]. *Biol Chen*, 2001,276(50):47195-47201.