



雌、雄大鼠去势对 HPA 轴分泌功能影响的比较

姚慧娟, 徐嘉兴, 马尚清, 樊竹, 赵方晓, 陈幼楠

(北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察去势手术后雌、雄大鼠在低性激素状态下, 下丘脑—垂体—肾上腺 (HPA) 轴功能的变化, 证实性激素可对 HPA 轴的功能产生影响, 并分析这种影响是否存在性别差异和时长效应。**方法** 选用 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠 80 只 (雌雄各半), 体重 180 ~ 220 g, 采用完全随机设计法, 利用随机数字表将其分为雄性模型组、雄性对照组、雌性模型组、雌性对照组, 每组 20 只大鼠, 适应性饲养一周后行去势手术, 于造模后第 3 周及第 13 周心脏取血, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质酮 (CORT) 含量并进行统计分析。**结果** 经检测造模第 3 周雄性模型组大鼠血清 CRH、CORT 含量显著低于对照组 ($P < 0.01$), 血清 ACTH 含量低于对照组 ($P < 0.05$); 雌性模型组大鼠血清 CRH、CORT 含量均低于对照组 ($P < 0.05$), 血清 ACTH 含量有下降趋势。造模第 13 周, 雄性模型组大鼠血清 CORT 含量显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其他激素含量变化不明显; 雌性模型组大鼠血清 CORT 含量低于对照组 ($P < 0.05$), 其他激素含量变化不明显。雌、雄模型组大鼠造模后第 13 周与第 3 周内相比 CRH、ACTH、CORT 的含量均无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 无论雌、雄, 去势均可造成大鼠 HPA 轴功能的紊乱, 表现为外周血 CRH、ACTH、CORT 水平下降, 雄激素对雄鼠 HPA 轴的影响要大于雌激素对雌鼠的影响。推测雄激素可能更加有利于上述三种激素的产生。当雌、雄大鼠处于稳定的低性激素状态, 其 HPA 轴分泌功能不随着大鼠周龄的增长而发生改变。

【关键词】 去势; 促肾上腺皮质激素释放激素; 促肾上腺皮质激素; 皮质酮; 性激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0097-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.018

Comparison of effects of castration on the secretory function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female rats

YAO Hui-juan, XU Jia-xing, MA Shang-qing, FAN Zhu, ZHAO Fang-xiao, CHEN You-nan

(Department of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis secretory function in male and female castrated rats, and to confirm that sex hormones can affect the function of HPA axis and explore if this effect has relationship with gender and the lasting of time. **Method** Eighty SPF SD rats (half male and female) aged 8 weeks, body weight 180 - 220 g, were randomly divided into the male model group, male control group, female model group and female control group, 20 rats in each group. After one week adaptation feeding, rats in the male and female model groups were castrated. At 3 and 13 weeks after castration, blood samples were collected from the heart apex, and serum content of corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and cortisol (CORT) were assayed by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and statistically analyzed. **Results** At 3 weeks after castration, the serum contents of CRH and CORT in the male model group were significantly lower than those in the male control group ($P < 0.01$), and serum ACTH level in the male model group was significantly lower than that in the male control group ($P < 0.05$). In the female model group, the serum contents of CRH and CORT were lower than those in the female control group ($P < 0.05$), and the level of serum ACTH showed a decreasing tendency. At 13 weeks after castration, serum CORT level in the male model group was significantly lower than that in the male control group ($P < 0.01$), while other

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目 (编号: 2013 JYBZZ-JS021)。

[作者简介] 姚慧娟 (1990 -), 女, 本科在读。

[通讯作者] 陈幼楠 (1980 -), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 针灸推拿临床的基础研究。

hormones showed no obvious changes. The serum CORT content in the female model group was lower than that in the female control group ($P < 0.05$), while other hormones changed not obviously. At 13 weeks after modeling, compared with that at 3 weeks after castration, serum CRH, ACTH and CORT contents had no significant differences compared with those in the male and female model groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Castration causes dysfunction of the HPA axis, and this influence exists in both male and female rats. The effect of androgen on male rats is greater than that of estrogen on female rats. Castration can cause a drop of peripheral blood CRH, ACTH and CORT levels. Presumably, androgen may be more conducive to secretion of CRH, ACTH and CORT than that on females. In the condition of low sex hormone levels, the secretion of these three hormones are not changed correlating with the week's growth of the rats.

[Key words] Castration; CRH; GnRH; Sex hormones; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis

下丘脑—垂体—肾上腺 (HPA) 轴作为神经内分泌免疫网络的枢纽,主要作用是维持人体内环境的稳定,对外界环境的刺激做出相应的生理心理反应。HPA 轴功能降低或亢进均容易导致抑郁^[1]、自杀、强迫行为、焦虑惊恐发作、暴力冲动行为、嗜酒行为、人格障碍、各种慢性疼痛、糖尿病等,对于后者,有证据表明糖尿病的发病与神经内分泌免疫网络,尤其是 HPA 轴的紊乱有关^[2,3]。

下丘脑不仅是下丘脑—垂体—性腺 (HPG) 轴,也是 HPA 轴的调控中枢。一直以来两轴之间的相互作用以及其对机体的影响是临床试验与科学实验研究的焦点。比如在探索运动与 HPG、HPA 轴之间的关系及双轴之间的互动调节规律时发现在对恢复能力起促进作用的区间,HPA 轴和 HPG 轴的机能状态有同步的现象^[4]。在相互作用关系的研究上,抑郁症的神经内分泌学研究进展表明,HPA 轴功能亢进产生的高水平 CRH 和皮质醇可通过抑制促性腺激素释放激素 (GnRH) 的分泌而使 HPG 轴活性下降,从而引起雌激素和睾酮水平降低^[5]。近年来,性激素对于下丘脑功能的影响及其机制也受到越来越多的研究者关注。大量研究表明,性激素直接调节 CRH 分泌而参与应激反应以及众多神经、精神疾病发病机制;雌激素可激活卵巢摘除大鼠的下丘脑室旁核 CRH 的表达。故性激素水平的改变,除了对生殖系统产生影响外,还会使 HPA 轴发生紊乱。

经过查阅文献发现,以往的研究对象多为雌性大鼠,对于雄性大鼠 HPA 轴与 HPG 轴关系的研究较少,雌雄大鼠之间的对比研究则更加匮乏。故本实验用去势手术使大鼠 HPG 轴发生紊乱,通过检测血清中 CRH、ACTH、CORT 的含量证实性激素含量的变化可以影响 HPA 轴的调节,并初步探讨去势后雌雄大鼠 HPA 轴激素水平变化的差异,以及持续低性激素水平对大鼠 HPA 轴影响的长期效应。

1 材料与方法

1.1 试机与仪器

大鼠促肾上腺皮质激素 (CRH) 酶联免疫试剂盒、大鼠促肾上腺皮质激素 (ACTH) 酶联免疫试剂盒、大鼠皮质酮/肾上腺酮 (CORT) 酶联免疫试剂盒 (均为武汉华美公司产品,中国),标准规格酶标仪 (Multiskan MK3, Thermo Scientific 公司,美国),自动洗板机 (DEM-3, 北京拓普分析仪器有限公司,中国),电热恒温培养箱 (SKP-02. 600, 黄石市恒丰医疗器械有限公司),离心机 (3K18, Sigma 公司,德国)。

1.2 实验动物及分组

选用 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠 80 只 (雌雄各半), 体重 180 ~ 220 g, 由北京斯贝福实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2012-0001], 实验于北京中医药大学针灸机理实验室完成。采用完全随机设计法, 利用随机数字表将其分为雄性模型组、雄性对照组、雌性模型组、雌性对照组, 每组 20 只大鼠, 适应性饲养一周后行去势手术。

1.3 造模方法

雌性大鼠去势方法^[6]: 腹腔注射 10% 水合氯醛, 40 mg/kg 麻醉, 常规剃毛消毒, 大鼠俯卧位固定, 以大鼠两后肢根部上缘连线与后中线的交点到最后肋附及的椎骨连线的中点为中心, 沿背部后正中中线作一 1.0 ~ 1.5 cm 的纵形皮肤切口。分离皮下组织, 暴露右侧骶脊肌, 在该骶脊肌的中线上纵行钝性分离骶脊肌长约 1.0 cm, 在腹腔内找到卵巢后切除。用同样的方法切除另一侧卵巢。

雄性大鼠去势方法^[7]: 腹腔注射 10% 水合氯醛, 40 mg/kg 麻醉, 常规剃毛消毒后, 大鼠仰卧位固定, 将大鼠的睾丸挤入阴囊底部, 阴囊术区碘伏消毒, 切开阴囊皮肤、内膜和总鞘膜。将睾丸挤出阴囊外, 在睾丸上方的精索处结扎, 切断精索并摘除睾丸, 将精索断端退入鞘膜管内, 缝合组织及皮肤。同一程序切除另一侧睾丸。

雌、雄对照组大鼠不进行手术处理。

分别于造模后第 3 周、第 13 周, 将全部大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛, 40 mg/kg 麻醉, 进行心脏取

血,取血方法:用 7 号针头注射器由大鼠剑突下缘正中处斜穿刺入胸腔(针尖与皮肤成 $20^{\circ} \sim 35^{\circ}$ 角),当针尖刺入心脏时,血液由于心搏自然涌入注射器,然后缓慢抽拉注射器的针芯^[8],取血 1.5 mL,3000 r/min 离心 10 min,分离血浆进行血清中激素含量的测定。

由于手术后感染等原因,造模 3 周后雄性对照组剩余 16 只,雄性模型组剩余 19 只,雌性对照组剩余 16 只,雌性模型组剩余 16 只。

1.4 血清中 CRH、ACTH、CORT 含量测定的方法

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 CRH、ACTH、CORT 含量,严格按照试剂盒说明操作。

1.5 统计方法

实验原始数据 SPSS 17.0 软件包进行分析处理,所得结果均以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验(数据均符合正态分布)和非参数检验(数据不完全符合正态分布)的方法对组间均数的差异进行比较。显著性差异水平为 $P < 0.05$,极显著差异水平为 $P < 0.01$ 。

2 实验结果

2.1 不同阶段雌、雄对照组与模型组大鼠血清

表 1 不同阶段雌、雄对照组与模型组大鼠血清 CRH、ACTH、CORT 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of serum contents of CRH, ACTH, CORT in the rats of different groups at different stages

组别 Groups	<i>n</i>	CRH /ng/mL	ACTH /pg/mL	CORT /ng/mL
第 3 周雄性对照组 3-week male control	16	4.43 $\pm$ 1.27	6.75 $\pm$ 1.41	43.67 $\pm$ 27.57
第 3 周雄性模型组 3-week male model	19	3.54 $\pm$ 0.90 ^{##}	4.67 $\pm$ 1.80 [#]	3.49 $\pm$ 1.21 ^{##}
第 3 周雌性对照组 3-week female control	16	3.42 $\pm$ 0.71	4.07 $\pm$ 1.03	7.93 $\pm$ 4.51
第 3 周雌性模型组 3-week female model	16	2.92 $\pm$ 0.44 [*]	3.82 $\pm$ 0.92	3.68 $\pm$ 2.01 [*]
第 13 周雄性对照组 13-week male control	16	3.36 $\pm$ 0.64	4.28 $\pm$ 0.93 [#]	53.07 $\pm$ 42.74
第 13 周雄性模型组 13-week male model	19	3.58 $\pm$ 0.69	3.93 $\pm$ 0.44	1.20 $\pm$ 0.42 ^{▲▲}
第 13 周雌性对照组 13-week female control	16	4.00 $\pm$ 0.53 [*]	3.75 $\pm$ 0.45	4.33 $\pm$ 1.49
第 13 周雌性模型组 13-week female model	16	4.23 $\pm$ 0.62	3.59 $\pm$ 0.30	1.86 $\pm$ 0.61 [◆]

注:与第 3 周雄性对照组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与第 3 周雌性对照组比较^{*} $P < 0.05$ 。与第 13 周雄性对照组比较^{▲▲} $P < 0.01$,与第 13 周雌性对照组比较[◆] $P < 0.05$ 。

Note. [#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ compared with the 3-week male control group; ^{*} $P < 0.05$ compared with the 3-week female control group; ^{▲▲} $P < 0.01$ compared with the 13-week male control group; [◆] $P < 0.05$ compared with the 13-week female control group.

表 2 不同阶段雌、雄大鼠 CRH、ACTH、CORT 含量均数差($\bar{x} = \bar{x}_{雄} - \bar{x}_{雌}$)

Tab.2 Mean differences of serum CRH, ACTH, CORT contents of the rats of 4 groups at different stages

组别 Groups	CRH /ng/mL	ACTH /pg/mL	CORT /ng/mL
第 3 周雌雄对照组均数差 Mean differences of the 3-week female and male control groups	1.01	2.68	35.74
第 3 周雌雄模型组均数差 Mean differences of the 3-week female and male model groups	0.62	0.85	-0.81
第 13 周雌雄对照组均数差 Mean differences of the 13-week female and male control groups	-0.64	0.53	48.74
第 13 周雌雄模型组均数差 Mean differences of the 13-week female and male model groups	-0.65	0.34	-0.66

3 讨论

HPA 轴的活动是由身心应激触发的一种体内平衡机制,其活动主要受 CRH、血管加压素(AVP)、ACTH、糖皮质激素的调节。但研究表明,HPA 轴的

CRH、ACTH、CORT 含量比较

造模后第 3 周,雄性模型组大鼠血清 CRH、CORT 含量显著低于对照组($P < 0.01$),血清 ACTH 含量低于对照组($P < 0.05$);雌性模型组大鼠血清 CRH、CORT 含量均低于对照组($P < 0.05$),血清 ACTH 含量有下降趋势。造模后第 13 周,雄性模型组大鼠血清 CORT 含量显著低于对照组($P < 0.01$),其他激素含量变化不明显;雌性模型组大鼠血清 CORT 含量低于对照组($P < 0.05$),其他激素含量变化不明显。

造模后第 13 周与第 3 周相比,雄性对照组大鼠血清 ACTH 含量下降($P < 0.05$);雌性对照组大鼠血清 CRH 含量下降($P < 0.05$)。雌、雄模型组大鼠造模后第 13 周与第 3 周组内相比 CRH、ACTH、CORT 含量均无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 不同阶段雌、雄大鼠 CRH、ACTH、CORT 含量均数差

造模后第 3 周,对照组大鼠雌性和雄性体内 HPA 轴各主要激素含量差异大,(均数差 ≥ 1.0);对于模型组大鼠雌性和雄性 CRH、ACTH、CORT 的含量差异小(均数差 ≤ 1.0)。见表 2。

调节不仅限于上述激素,还与 α 干扰素 5-HT、性激素的水平密切相关^[9]。

造模后第 3 周对照组和模型组雌鼠数据分析表明,雌激素对 HPA 轴主要激素 CRH、ACTH、CORT 的分泌有促进作用。对于雌激素和 CRH、ACTH、

CORT 的关系,前人做了大量研究。有实验研究表明,若将雌性大鼠的卵巢切除,则其血液中日间 CORT 的峰值会比未切除卵巢的同类要低^[10,11]。也有报告显示,CRH 基因启动子区的雌激素反应元件结合雌激素,可以刺激 CRH 基因的表达^[12]。本实验结果与上述研究一致,即雌激素含量与 CRH 的表达呈正相关。依据 HPA 轴生理调节机制可知下丘脑分泌 CRH,激活垂体产生 ACTH,ACTH 作用于肾上腺皮质促进 CORT 的生成和分泌,所以我们推测雌激素促进 ACTH、CORT 的分泌是通过 HPA 轴发挥作用的。

已有研究在分子层面上证明 HPA 系统不仅是雌激素也是雄激素的潜在靶标,即雄激素可直接影响人 CRH 的合成^[13]。本实验的结果显示在去势后第 3 周雄性模型组大鼠血清 CRH、CORT 含量显著低于对照组($P < 0.01$),血清 ACTH 含量低于对照组($P < 0.05$),亦说明雄激素对 HPA 轴主要激素 CRH、ACTH、CORT 的分泌可能有促进作用。其发生机理可能为雄激素促进 CRH 的合成,CRH 通过 HPA 轴促进 ACTH、CORT 的合成,即与雌激素促进三种激素的原理相同。

造模后第 3 周,两个模型组各激素含量的均数差($\bar{x}_{雄} - \bar{x}_{雌}$)小于两个对照组之间的均数差,即去势后在低性激素水平下,雌、雄大鼠的各激素水平趋于一致。结果不仅表明性激素对大鼠体内 HPA 轴激素水平有很大的影响,还表明这种影响存在性别差异。去势后雄鼠各激素含量的降低幅度比雌鼠大,以 CORT 尤为明显。大鼠 CORT 含量的均数差由 35.74 变为-0.81,说明 CORT 在大鼠体内含量由正常时雄鼠高于雌鼠变成了去势后雌鼠高于雄鼠的状态。实验结果表明,与雌激素相比,雄激素可能更加有利于雄鼠 CORT 的产生。有研究证实雄激素对肾上腺皮质激素的合成有直接作用^[14],我们认为雄激素除了促进 CRH 的合成从而间接影响 CORT 的产生外,肾上腺皮质网状带分泌的少量雄激素亦可直接影响肾上腺皮质束状带 CORT 的产生。CRH 和 ACTH 的数据变化也同样显示出雄激素对雄鼠 HPA 轴的影响要大于雌激素对雌鼠的影响。

雌、雄模型组大鼠造模后第 13 周与第 3 周组内相比 CRH、ACTH、CORT 的含量均无统计学差异,说明当雌、雄大鼠处于稳定的低性激素状态,其 HPA 轴分泌功能不随着大鼠周龄的增长而发生改变。

本实验结果显示,造模后第 3 周雄性对照组大鼠体内 CRH、ACTH、CORT 水平高于雌性对照组,且以 CORT 最为明显。有实验表明雌鼠血浆 ACTH 和

CORT 水平在基础状态和应激后均高于雄鼠^[10]。周江宁^[11]在研究抑郁症发病的下丘脑中枢驱动调节机制时发现在应激刺激下,雌鼠分泌的 ACTH 和糖皮质激素高于雄鼠。本实验结果与这些研究结果不同,其原因可能在于上述研究主要展示了在应激刺激后雌雄性大鼠的体内激素含量的比较,而对于没有或少有应激刺激状态(即平静状态)下的大鼠体内各激素的比较结果仍没有定论。所以,对于本实验结果与前人结果的差别还需要加大样本量并对大鼠的状态做一定的控制,进行实验比较。

参 考 文 献

- [1] 王晓丽,贾正平,张汝学. HPA 轴功能紊乱干预药物的研究进展[J]. 西北药学杂志,2013, 28(5): 546-549.
- [2] 王利军,张汝学,贾正平,等. 高脂饲料加 STZ 联合诱导的大鼠糖尿病模型 HPA 轴功能变化与糖脂代谢的关系[J]. 中国药理学通报,2010, 26(3): 325-328.
- [3] 崔俊芳,张如意. 2 型糖尿病患者的血浆皮质醇水平的变化及与代谢指标的相关分析[J]. 宁夏医学杂志,2010, 32(6): 535-537.
- [4] 殷劲. HPA 轴、HPG 轴在超量恢复过程中相互关系的研究[J]. 成都体育学院学报,2011, 37(1): 83-87.
- [5] 刘莹,王苏,董艳娟. 抑郁症的神经内分泌学研究进展[J]. 实用预防医学,2007, 14(5): 1639-1641.
- [6] 宋晓兵,王春霞,陈志良,等. 抑乳调经颗粒对卵巢摘除大鼠雌激素活性的影响[J]. 中药材,2011, 34(6): 953-955.
- [7] 邵玉,黄海,周丽,等. 补肾壮骨冲剂对去势骨质疏松大鼠骨组织形态学的影响[J]. 广西中医药大学学报,2011, 28(1): 53-55.
- [8] 叶少梅,欧卫平. 大鼠心脏取血法[J]. 上海实验动物科学,1999, 19(3): 177.
- [9] 杨逢勇,虞浩,刘磊,等. α 干扰素对 HPA 轴的调节作用及其受体机制[C]. 中国生理学会、中国神经科学会 2005 年神经内分泌免疫学术研讨会论文摘要汇编. 2005.
- [10] 阮玲娟. 正常动情周期和性腺摘除大鼠外周性激素水平对下丘脑的影响[D]. 浙江大学,2011.
- [11] 周江宁,闫雪波. 抑郁症发病的下丘脑中枢驱动调节机制[J]. 中国科学技术大学学报,2008, 38(8): 967-977.
- [12] Windle RJ, Gamble LE, Kershaw YM, et al. Gonadal steroid modulation of stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activity and anxiety behavior: role of central oxytocin[J]. Endocrinology, 2006, 147: 2423-2431.
- [13] 包爱民,周江宁. HPA 轴与 HPG 轴的相互作用与抑郁症[C]. 中国神经科学学会第六届学术会议暨学会成立十周年庆祝大会论文摘要汇编. 2005.
- [14] 施超,李艳香,翟华玲,等. 去势雄性大鼠肾上腺皮质束状带和网状带的变化及低雄激素对 COX-2 信号通路的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011, 31(11): 1568-1573.

[收稿日期] 2014-08-14