

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01009

## 褪黑素对大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴相关激素及组织超微结构的影响

宝 轶,卜 乐,邹俊杰,石勇铨,刘志民\*

第二军医大学长征医院内分泌科,上海 200003

**[摘要]** **目的:**观察褪黑素(melatonin, Mel)对大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴相关激素分泌及分泌轴器官超微结构的影响。**方法:**SD 雄性大鼠随机分为 4 组( $n=15$ ):正常对照组、低剂量 Mel 干预组( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、中剂量 Mel 干预组( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、高剂量 Mel 干预组( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。Mel 干预组每日腹腔注射不同剂量 Mel, 各组分别于干预后第 1、2、3 周末处死 5 只大鼠, 留取血清及下丘脑、垂体、甲状腺组织。放射免疫分析法检测血清  $T_3$ 、 $T_4$ 、 $FT_3$ 、 $FT_4$ 、促甲状腺激素(TSH)水平, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测下丘脑 proTRH mRNA 表达水平, 电镜观察下丘脑、垂体、甲状腺超微结构的变化。**结果:**药物干预后第 1、2、3 周, 中、高剂量 Mel 干预组血清  $T_4$ 、 $FT_3$ 、 $FT_4$ 、TSH 水平明显低于对照组及低剂量 Mel 干预组( $P < 0.01$ ); 中、高剂量 Mel 干预组血清  $T_4$  水平逐周降低( $P < 0.01$ ); Mel 干预 2 周后 TSH 水平下降, 第 3 周与前 2 周相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Mel 干预后第 1、2、3 周, 高剂量 Mel 组 proTRH mRNA 表达水平低于正常对照组( $P < 0.01$ ), 并随给药时间的延长, proTRH mRNA 表达水平呈先降低后升高的趋势; 下丘脑、垂体、甲状腺组织超微结构无明显变化。**结论:**中、高剂量褪黑素抑制下丘脑-垂体-甲状腺轴相关激素分泌, 但对各组织超微结构影响不大。

**[关键词]** 褪黑素; 下丘脑-垂体-甲状腺轴; 激素; 超微结构

**[中图分类号]** R 584 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1009-04

### Effect of melatonin on hormone secretion and tissue ultrastructure of hypothalamus-pituitary-thyroid axis in rats

BAO Yi, BU Le, ZOU Jun-jie, SHI Yong-quan, LIU Zhi-min\*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effect of melatonin (Mel) on hormone secretion and tissue ultrastructure of hypothalamus-pituitary-thyroid axis (HPTA) in rats. **Methods:** A total of 60 male Sprague-Dawley rats were evenly randomized into four groups: control, low-dose Mel ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), middle-dose Mel ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and high-dose Mel ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group. The rats in the latter 3 groups received intraperitoneal injection of different doses of Mel daily. At 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks after treatment, rats were sacrificed and blood serum samples, hypothalamus, pituitary and thyroid tissues were obtained. Serum  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$  and TSH levels were estimated by radioimmunoassay (RIA). Expression of proTRH mRNA in hypothalamus tissues were detected by real time RT-PCR. The ultrastructures of hypothalamus, pituitary and thyroid were observed under transmission electronic microscope. **Results:** The serum levels of  $T_4$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$  and TSH in the middle-dose and high-dose Mel groups were significantly decreased compared with those in the control and low-dose Mel group at 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks ( $P < 0.01$ ).  $T_4$  levels decreased in the middle-dose and high-dose Mel groups at a weekly basis, with significant difference found between different weeks ( $P < 0.01$ ). TSH level was decreased at the 2<sup>nd</sup> week, and that at the 3<sup>rd</sup> week was significantly lower than those at the first two weeks ( $P < 0.01$ ). The expression of proTRH mRNA was lower in high-dose Mel group compared to that in the control group at 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks. With the prolongation of Mel treatment, expression of proTRH mRNA had a decreasing tendency first and an increasing tendency later. No obvious pathological ultrastructure changes were found in the hypothalamus, pituitary and thyroid tissues. **Conclusion:** Melatonin may inhibit Hypothalamus-Pituitary-Thyroid axis in a time- and dose-dependent manner in rats.

**[KEY WORDS]** melatonin; hypothalamus-pituitary-thyroid axis; hormone; ultrastructure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1009-1012]

**[收稿日期]** 2009-03-12 **[接受日期]** 2009-04-28

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(“973”计划, 2005CB523304). Supported by National Program on Key Basic Research Project (973 Program, 2005CB523304).

**[作者简介]** 宝 轶, 博士生. E-mail: cynthia0530@hotmail.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63272124, E-mail: zmlu\_yzhao@hotmail.com

褪黑素(melatonin, Mel)是松果体分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,具有调节生物节律和清除自由基等作用,其对神经内分泌免疫系统的影响正受到广泛关注<sup>[1]</sup>。Champney等<sup>[2]</sup>研究发现 Mel 对下丘脑-垂体-靶腺轴(性腺、肾上腺、甲状腺)具有抑制作用,但确切调控机制仍不明确。下丘脑-垂体-靶腺轴系统涉及的组织、器官较多,相关激素间相互调节作用错综复杂,褪黑素对各分泌轴的调节作用也不甚相同,相关结论争议很大<sup>[3-5]</sup>。为此,本研究通过观察不同剂量、不同时间点 Mel 对下丘脑-垂体-甲状腺轴相关激素分泌及分泌轴组织超微结构的影响,初步探讨 Mel 对下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 Mel 购自美国 Sigma 公司; T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、促甲状腺激素(TSH)放射免疫检测试剂盒购自北京北方生物技术研究所;荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;透射电镜为 Philips Tecnai 12。

1.2 动物分组及处理 60 只健康雄性 6~8 周龄 SD 大鼠购自第二军医大学实验动物中心,体质量 180~220 g,随机分为 4 组( $n=15$ ):正常对照组、高剂量 Mel 干预组(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、中剂量 Mel 干预组(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、低剂量 Mel 干预组(0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。大鼠分笼饲养于室温(22±2)℃,给予标准饲料喂养,饮水不限量。Mel 经无水乙醇溶解后再配制成乙醇含量为 2% 的不同浓度的溶液。每日 17:00 腹腔注射 1 次,正常对照组给予乙醇含量 2% 的生理盐水。实验周期为 3 周,每周每组处死 5 只大鼠,留取血清及下丘脑、垂体、甲状腺组织。

1.3 血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、TSH 水平的测定 大鼠禁食 8~10 h 后,予 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,心脏采血,采用放射免疫分析法按照说明书检测血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、TSH 水平。

1.4 荧光定量 PCR 检测下丘脑 proTRH mRNA 表达 TRIzol 法提取下丘脑总 RNA,测定 RNA 样品纯度。取 1 μg RNA 进行逆转录,条件如下:25℃ 10 min;50℃ 30 min;然后 85℃ 5 min,冰上骤冷;加入 1 μl *E. coli* RNase H 37℃ 20 min。逆转录后 cDNA 保存于 -20℃。取合成的 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 法进行实时荧光定量 PCR 扩增,应用 Comparative Delta-delta 法计算各基因相对表达量<sup>[6]</sup>。proTRH 基因上游引物:5'-TCT G CA GAG

TCT CCA CTT CGC AGA CTC CAG-3',下游引物:5'-GGT GAC ATC AGA CTC CAT CCA GGG GAA GGA-3';β-actin 上游引物:5'-GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC-3',下游引物:5'-GCC TAC AGC TTG ACC ACC ACA-3'<sup>[7]</sup>。

1.5 超微结构观察 各取 1 mm<sup>3</sup> 大小的下丘脑、垂体、甲状腺组织投入 3% 戊二醛固定溶液中固定,用磷酸缓冲液冲洗,1% 四氧化锇后固定,逐级乙醇、丙酮脱水,用 Epon-812 包埋,制备超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色,应用透射电镜观察。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计数资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、TSH 水平测定结果 结果表明:Mel 干预后第 1、2、3 周,中、高剂量 Mel 干预组血清 T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、TSH 水平明显降低,与正常对照组及低剂量 Mel 干预组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );中、高剂量 Mel 干预组血清 T<sub>4</sub> 水平逐周降低,各周间相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );TSH 水平在 Mel 注射 2 周后明显下降,第 3 周与前 2 周相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub> 的水平各周间相比无统计学差异(图 1)。T<sub>3</sub> 水平各周间及各周间相比均无统计学差异。

2.2 分泌轴器官超微结构观察结果 各组大鼠下丘脑、垂体、甲状腺的超微结构无明显异常,提示不同剂量的 Mel 对正常大鼠下丘脑、垂体、甲状腺超微结构可能无明显影响(图 2)。

2.3 下丘脑 proTRH mRNA 的表达水平 在 Mel 注射后第 1、2、3 周,高剂量 Mel 组 proTRH mRNA 表达水平低于正常对照组( $P < 0.01$ ),并随给药时间的延长,proTRH mRNA 表达水平呈先降低后升高的趋势,但各周间相比并无统计学差异(图 3)。

## 3 讨论

Mel 对下丘脑-垂体-靶腺轴具有调节作用,其可通过调节促性腺激素释放激素(GnRH)的分泌抑制下丘脑-垂体-性腺轴<sup>[8]</sup>;其对下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能有一定调节作用,但相关研究争议较大。Csaba 等<sup>[3]</sup>发现,注射 Mel 30 min 后机体 T<sub>4</sub> 水平在短时间内不发生改变。Brzezińska-Slebodzińska 等<sup>[4]</sup>于不同时间点向实验兔注射 Mel,发现肝和肾相关酶活性增加,血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 和 rT<sub>3</sub> 水平上调。而 Wright 等<sup>[9]</sup>研究发现,体外培养的甲状腺细胞给予

外源性 Mel 可以减弱甲状腺细胞激素分泌的功能, 特别是在培养初期, 呈剂量依赖性关系, 高剂量的 Mel 可抑制甲状腺对 TSH 的反应性。外源性 Mel

还可以抑制细胞有丝分裂, 并显著抑制甲状腺功能<sup>[5,10]</sup>。目前为止, Mel 对甲状腺激素分泌的确切效果尚有争议<sup>[11-13]</sup>, 值得进一步深入研究。

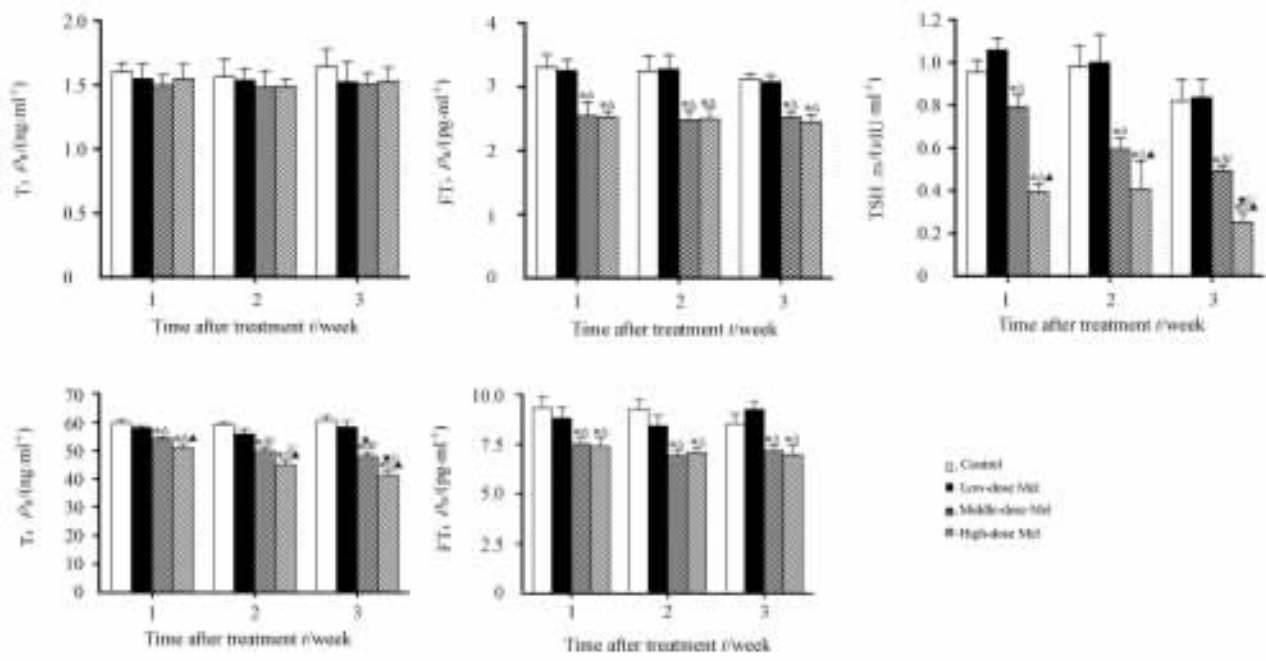


图 1 不同时间点各组大鼠血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub> 和 TSH 水平

Fig 1 Serum FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and TSH levels in four groups at different weeks

\*  $P < 0.01$  vs control;  $\Delta P < 0.01$  vs low-dose Mel;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs middle-dose Mel;  $\nabla P < 0.01$  vs 1 week;  $\blacktriangledown P < 0.01$  vs 2 weeks.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

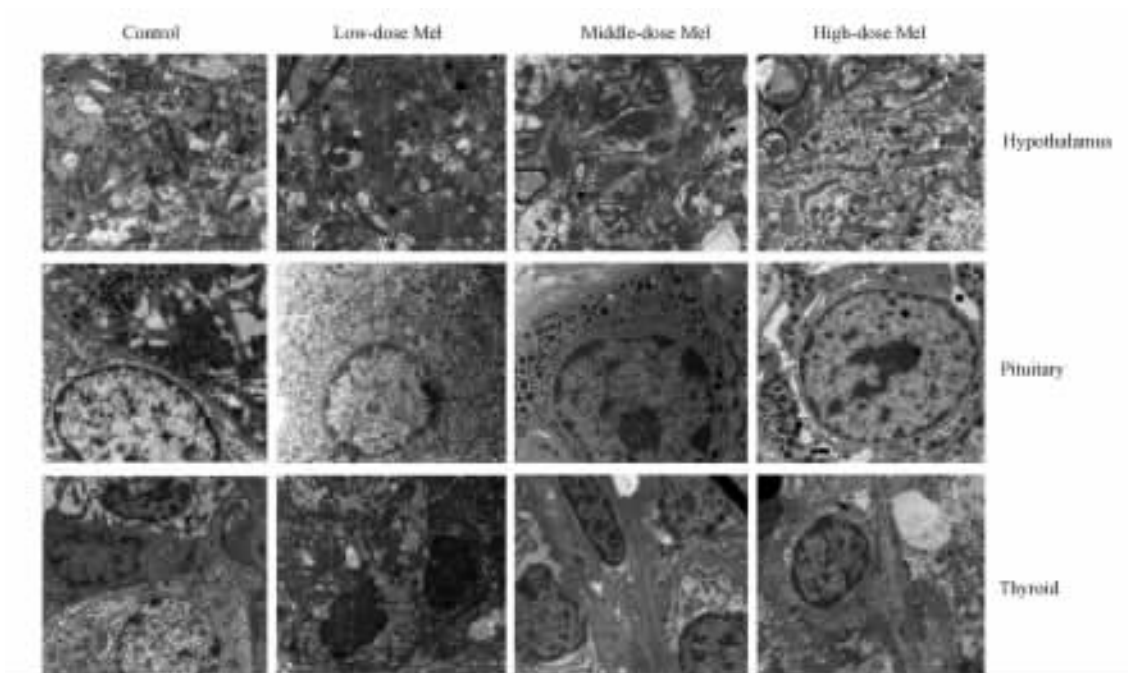


图 2 注射 Mel 3 周后各组大鼠下丘脑、垂体、甲状腺组织超微结构

Fig 2 Ultrastructures of hypothalamus, pituitary and thyroid in four groups

Original magnification:  $\times 9\ 700$  (Hypothalamus);  $\times 4\ 000$  (Pituitary);  $\times 5\ 800$  (Thyroid)

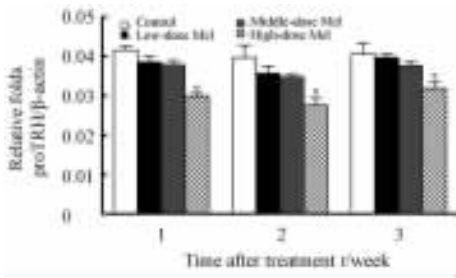


图3 大鼠下丘脑 proTRH mRNA 表达水平的变化

Fig 3 Expression levels of proTRH mRNA in hypothalamus of four groups at different weeks

\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 5, \bar{x} \pm s$

本研究发现 Mel 对正常大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴相关激素分泌主要表现为抑制性作用,而对下丘脑、垂体、甲状腺的超微结构无显著影响。中、高剂量 Mel 可以显著性降低正常大鼠血清  $T_4$ 、 $FT_3$ 、 $FT_4$ 、TSH 和下丘脑 proTRH mRNA 表达水平,同时随给药时间的延长, $T_4$  的水平逐周降低,TSH 水平在 Mel 注射 2 周后明显下降,proTRH mRNA 表达水平呈先降低后升高的趋势。这些结果提示 Mel 的这种抑制作用呈剂量和时间依赖性。血清甲状腺激素水平下降,TSH 水平同时下降,可能与 Mel 对下丘脑水平的直接抑制作用有关,但其具体机制仍需进一步探讨。

[参考文献]

[1] Morgan P J, Hazlerigg D G. Photoperiodic signalling through the melatonin receptor turns full circle[J]. J Neuroendocrinol, 2008, 20: 820-826.  
 [2] Nakao N, Ono H, Yoshimura T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions[J]. Reproduction, 2008, 136: 1-8.  
 [3] Csaba G, Nagy Z U. Effect of TSH and melatonin on thyroid activity in the rat[J]. Acta Physiol Acad Sci Hung, 1976, 48(2-3): 101-103.

[4] Brzezińska-Slebodzińska E, Slebodziński A B, Styczyńska E. Stimulatory effect of melatonin on the 5'-monodeiodinase activity in the liver, kidney, and brown adipose tissue during the early neonatal period of the rabbit[J]. J Pineal Res, 1998, 24: 137-141.  
 [5] Gesing A, Jagiela J, Lewinski A. Effects of melatonin on the process of apoptosis in rat thyroid follicular cells [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27(1-2): 81-84.  
 [6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C<sub>TD</sub>) method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.  
 [7] Montagne J J, Ladram A, Nicolas P, Bulant M. Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland, and testis[J]. Endocrinology, 1999, 140: 1054-1059.  
 [8] Yasuo S, Nakao N, Ohkura S, Iigo M, Hagiwara S, Goto A, et al. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis[J]. Endocrinology, 2006, 147: 432-440.  
 [9] Wright M L, Pikula A, Babski A M, Labieniec K E, Wolan R B. Effect of melatonin on the response of the thyroid to thyrotropin stimulation *in vitro* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 108: 298-305.  
 [10] Sewerynek E, Wiktorska J, Lewinski A. Effects of melatonin on the oxidative stress induced by thyrotoxicosis in rats [J]. Neuro Endocrinol Lett, 1999, 20(3-4): 157-161.  
 [11] Unfried C, Ansari N, Yasuo S, Korf H W, von Gall C. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 18238-18242.  
 [12] Dzerzhynsky M E, Gorelikova O I, Pustovalov A S. The interaction of the thyroid gland, pineal gland and immune system in chicken[J]. Reprod Biol, 2006, 6 Suppl 2: 79-85.  
 [13] Hanon E A, Lincoln G A, Fustin J M, Dardente H, Masson-Pévet M, Morgan P J, et al. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal[J]. Curr Biol, 2008, 18: 1147-1152.

[本文编辑] 贾泽军