

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.003

性早熟雌性 Sprague-Dawle 大鼠下丘脑 Lin28a 和 Lin28b 表达异常*

杨芳琳 于宝生[△] 单 晔 王安茹 高兰英 彭 妍

(南京医科大学第二附属医院小儿内分泌科 江苏南京 210003)

摘要 目的:研究正常雌性 Sprague-Dawle (SD) 大鼠不同发育阶段及雌激素诱导性早熟后下丘脑 Lin28a 和 Lin28b 的表达及意义。**方法:**1) 于雌性 SD 大鼠出生后 15 日 (postnatal day 15, PND15)、PND23、PND35 荧光实时定量 PCR 分析下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 的表达, 同时以 ELISA 法检测血清黄体生成素 (LH) 和雌二醇 (E₂) 水平变化; 2) 苯甲酸雌二醇 (estradiol benzoate, EB) 诱导的性早熟大鼠随机分为 EB-1 组和 EB-2 组, 分别于阴道开口 (vaginal opening, VO) 时及 PND56 两个时间点处死, 相应的发育阶段的大鼠用无菌芝麻油 (sesame oil, OIL) 作为对照分为 OIL-1 和 OIL-2 组; 荧光实时定量 PCR 分析下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 的表达, ELISA 法检测 LH 和 E₂ 水平变化, 并观察性早熟对大鼠阴道开口、体重、顶臀径、胫骨长等生长发育指标的影响。**结果:**1) PND15、PND23 和 PND35 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达、血清 LH 和 E₂ 水平无统计学差异 ($P > 0.05$); 2) EB-1 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-1 组 ($P < 0.05$), 血清 LH 和 E₂ 水平与 OIL-1 组相比无统计学差异 ($P > 0.05$); EB-2 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-2 组 ($P < 0.05$), 血清 LH 和 E₂ 水平低于 OIL-2 组 ($P < 0.05$); 3) 与 OIL-2 组比较, EB-2 组 VO 时间明显提前 ($P < 0.01$), 体重、顶臀径、胫骨长差异无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论:**外源性雌激素引起的性早熟可能导致下丘脑 Lin28a 和 Lin28b 表达异常。

关键词:性早熟; Lin28a; Lin28b; 下丘脑

中图分类号: Q95-3, R725.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)12-2210-04

Abnormal Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in Hypothalamus of Female Precocious Puberty Sprague-Dawle Rat*

YANG Fang-lin, YU Bao-sheng[△], SHAN Ye, WANG An-ru, GAO Lan-ying, PENG Ya

(Department of Pediatric Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu, 210003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate expression and significance of Lin28a and Lin28b mRNA in hypothalamus of female SD rats at various stages of development and precocious puberty induced by estrogen. **Methods:** 1) Analyze expression of Lin28a and Lin28b mRNA in hypothalamus of SD rats with Real-time PCR on postnatal day 15 (PND15), PND23 and PND35, meanwhile examine level of serum LH and E₂ with ELISA; 2) EB (estradiol benzoate)-induced precocious puberty rats are divided into EB-1 and EB-2 groups and are respectively sacrificed at the time of vaginal opening (VO) and PND56, at the same time respectively controlled with OIL-1 and OIL-2 groups which are induced by sesame oil (OIL). Analyze expression of Lin28a and Lin28b mRNA in hypothalamus with Real-time PCR, examine level of serum LH and E₂ with ELISA and observe influence of precocious puberty on VO, weight, crown-rump length, tibia length at the same time. **Results:** 1) Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in hypothalamus and level of serum LH and E₂ among PND15, PND23 and PND35 groups are not statistically significant ($P > 0.05$); 2) Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in EB-1 is higher than OIL-1 ($P < 0.05$), while level of serum LH and E₂ between two groups is not statistically significant ($P > 0.05$); Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in EB-2 is higher than OIL-2 ($P < 0.05$), meanwhile level of serum LH and E₂ between two groups is statistically significant ($P < 0.05$); 3) Time of VO in EB-2 group is earlier than OIL-2 group ($P < 0.01$), while weight, crown-rump length, tibia length between two groups is not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions:** Precocious puberty induced by Exogenous Estrogen could result in abnormal expression of Lin28a and Lin28b mRNA in hypothalamus.

Key words: Precocious puberty; Lin28a; Lin28b; Hypothalamus

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R725.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)12-2210-04

前言

青春期是以出现第二性征成熟、线性生长加速和获得繁殖

能力为特征的由儿童逐渐发育为成人一个复杂的过程, 涉及一系列复杂的生理改变。性早熟可能造成一系列社会心理和公共健康问题, 增加肥胖、糖尿病和癌症的风险^[1]。性早熟 (preco-

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (KB2009448)

作者简介: 杨芳琳 (1988-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 小儿内分泌方向, 电话: 025-83575027, E-mail: chinayangfanglin@126.com

[△] 通讯作者: 于宝生, E-mail: yubs329@sina.com

(收稿日期: 2013-11-10 接受日期: 2013-12-05)

cious puberty)是指男孩在9岁以前,女孩在8岁以前出现第二性征的异常发育性疾病,是一种常见的小儿内分泌疾病,但目前病因不明,受遗传与环境共同影响。现发现与性早熟相关的基因包括KISS、KISS1、GPR54、GNRH1、GNRHR及Lin28b等^[2]。Lin28基因最早发现于秀丽隐形线虫中,编码一种带有冷休克结构域和反向锌指结构的高度保守的胞质蛋白LIN28,参与RNA结合及转录后调控^[3],其功能获得和功能缺失突变可导致延迟或提前发育^[3]。Lin28a和Lin28b具同源性^[4],可能自同一原始Lin28b基因演变而来^[5]。流行病学调查发现Lin28b基因与身高和青春发育相关^[1,6,9];Lin28a基因突变影响小鼠体型和青春发育^[10]。但目前Lin28a和Lin28b与青春发育的研究仅限于流行病学调查,Lin28a和Lin28b在青春发育不同时期的表达变化,性早熟时的表达量及其对青春发育调控的具体作用机制仍需进一步研究。大鼠的青春发育过程与人类近似,而且生命周期短(2-3年)、性成熟期短(2-3月)、性周期短(4-5日),为研究性发育相当合适的实验动物^[11]。本研究正常雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠不同性发育阶段及雌激素诱导的性早熟后下丘脑Lin28a和Lin28b的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),苯甲酸雌二醇(estradiol benzoate,EB)(美国Sigma公司),无菌芝麻油(sesame oil,OIL),二乙基焦碳酸酯(DEPC)(美国sigma公司),Trizol试剂(美国Invitrogen公司),Reverse Transcription System试剂盒(美国Promega公司),SYBR Green Master Mix试剂盒(美国ABI公司),大鼠黄体生成素(LH)和雌二醇(E₂)酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(苏州卡尔文生物公司),酶标仪(TECAN F200),ABI 7300荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 SD大鼠饲养至雌性体重>250g,雄性体重>400g,随机分组合笼;初生SD雌性大鼠与母鼠共同饲养,于出生后23日(postnatal day 23,PND23)断奶,所有SD大鼠饲养在12h光照及12h黑暗环境中(实验动物中心),自由摄食和饮水。根据文献报道选定出生后15日、23日和35日分别作为正常雌性大鼠不同性发育阶段(幼稚期、青春前期和青春后期)的观察点^[12]。目前大部分研究以阴道开口(vaginal opening,VO)作为大鼠进入青春期的标志^[13],而大鼠于8周龄(PND56)达性成熟,故选定VO时和PND56两个时间点分别为EB诱导的性早熟大鼠的青春期和成年期。我们的预实验中EB诱导的性早熟大鼠阴道平均开口于出生后20日,故选取出生后20日为EB诱导的性早熟大鼠的青春期,观察大鼠性早熟时体重变化。

1) 雌性SD大鼠随机分为三组:PND15组、PND23组、PND35组,每组6只,分别于出生后15日、23日、35日处死。出生后15日起每日观察阴道开口,荧光实时定量PCR分析下丘脑Lin28a和Lin28b mRNA的表达,同时以ELISA法检测血清黄体生成素(LH)和雌二醇(E₂)水平变化。

2) 雌性SD大鼠于出生后16-20日每日皮下注射300 μg·mL⁻¹

苯甲酸雌二醇(以无菌芝麻油溶解)0.1 mL^[14],并随机分为EB-1组和EB-2组,每组六只,EB-1组于阴道开口之日处死,EB-2组于生后56日处死;同时另设OIL-1组和OIL-2组分别做为EB-1组和EB-2组相应发育阶段的对照,每组六只,于生后16-20日每日皮下注射无菌芝麻油0.1 mL,OIL-1组于阴道开口之日处死,OIL-2组于生后56日处死。生后15日起每日观察阴道开口,荧光实时定量PCR分析下丘脑Lin28a和Lin28b mRNA的表达,ELISA法检测LH和E₂水平变化,并观察性早熟对大鼠阴道开口、体重、顶臀径、胫骨长等生长发育指标的影响。

100 g/L水合氯醛溶液0.04 mL·g⁻¹腹腔注射麻醉,3-5分钟后待大鼠肌肉完全松弛,称量体重并测量大鼠顶臀径,固定四肢后,打开胸腔,心脏穿刺采血,迅速分离下丘脑、右侧胫骨。断头后延矢状缝分离颅骨,完整剥离大脑,下丘脑取材界限标志为视交叉前1 mm,两边为正中隆起边界,后至乳头体,水平厚度2 mm^[15]。血标本采集至无菌EP管,室温静置2小时,3000 rpm离心10分钟,取上清液保存于-20℃。下丘脑标本取出后迅速液氮冷冻,随后转移至-80℃冰箱保存。完整游离右侧胫骨,游标卡尺测量。

1.2.2 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清LH和E₂浓度 收集血清用ELISA法检测LH和E₂浓度,根据试剂盒说明,实验前蒸馏水按1:20稀释20×洗涤缓冲液,甩尽孔内液体,每孔加满洗涤液,静置1 min后甩尽孔内液体,在吸水纸上拍干,如此洗板5次。分别设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的LH标准品50 μL,标准品(S0-S5)浓度依次为:0、75、150、300、600、1200 pg·mL⁻¹,待测样本孔先加生物素10 μL,再加待测样本50 μL,随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体100 μL,用封板膜封住反应孔,37℃恒温箱温育60 min,弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次,每孔加入底物A、B各50 μL,37℃避光孵育15 min,每孔加入终止液50 μL,15 min内,在450 nm波长处测定各孔的OD值,绘制标准曲线:在Excel工作表中,以标准品浓度作横坐标,对应OD值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值。E₂检测方法操作步骤参照LH。

1.2.3 总RNA的提取及荧光实时定量PCR分析 根据试剂盒说明书采用TRIzol一步法抽提大鼠下丘脑总RNA,用紫外分光光度计测定RNA质量浓度和纯度,A260/A280为1.8-2.0。加1 g·L⁻¹ DEPC水调整RNA终质量浓度为1 g·L⁻¹,于-80℃冰箱保存备用。按反转录试剂盒按试剂操作步骤,每个样本取总RNA 2 μg,用20 μL反应体系,反转录合成cDNA。内参照基因引物根据Genebank的序列,由南京普莱特生物试剂中心合成。内参照基因GAPDH: forward, 5-CAAGTTCACG-GCACAGTCAA-3, reverse, 5-TGGTGAAGACGCCAGTAGAC-TC-3,目的基因Lin28a和Lin28b引物由QIAGEN公司购买产品批号QT00941010和QT01686503。采用SYBR Green试剂盒,每个PCR反应管中包含12.5 μL SYBR Green工作液,上下游引物各1.2 μL,cDNA模板1 μL,DEPC水10.1 μL,总体积25 μL。反应过程为50℃ 2 min,95℃ 10 min,随后95℃ 15 s,60℃ 1 min,循环45次,以GAPDH为内参照标准。整个过

程中收集荧光,反应结束后,使用 7300 system SDS software 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct 值,分别扩增 Lin28a、Lin28b 和 GAPDH,每个样本作 2 复孔,得到 Ct 平均值。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 Lin28a 和 Lin28b mRNA 相对表达水平, $\Delta\Delta C_t = [Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH})]_{\text{实验组}} - [Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH})]_{\text{对照组}}$ 。GnRH mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.3 统计学处理

数据均采用 SPSS 18.0 软件处理,正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Games-Howell 法,两组比较采

用独立样本 t 检验。对各组数据进行显著性检验, $p < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 自然发育大鼠 PND15、PND23 及 PND35 下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达及血清 LH、 E_2 水平

自然发育 PND15 组、PND23 组和 PND35 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达、血清 LH 和 E_2 水平无统计学差异($P > 0.05$,见表 1)。

表 1 PND15、PND23 及 PND35 下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达及血清 LH、 E_2 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in Hypothalamus and Level of Serum LH and E_2 on PND15, PND23 and PND35($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Lin28a mRNA	Lin28b mRNA	LH(IU·L ⁻¹)	E_2 (Pmol·L ⁻¹)
PND15	6	17.00 $\pm$ 1.84	13.02 $\pm$ 3.19	26.80 $\pm$ 5.26	42.63 $\pm$ 7.07
PND23	6	16.16 $\pm$ 1.26	12.09 $\pm$ 1.81	26.72 $\pm$ 7.31	42.00 $\pm$ 10.83
PND35	6	17.01 $\pm$ 1.88	11.94 $\pm$ 2.23	30.04 $\pm$ 5.89	47.17 $\pm$ 8.56

2.2 EB 诱导性早熟后大鼠下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达及血清 LH、 E_2 水平

EB-1 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-1 组($P < 0.05$),血清 LH 和 E_2 水平与 OIL-1 组相比无统计学差

异($P > 0.05$);EB-2 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-2 组($P < 0.05$),血清 LH 和 E_2 水平低于 OIL-2 组($P < 0.05$,见表 2)。

表 2 EB 诱导性早熟后下丘脑 Lin28a 和 Lin28b 的表达及血清 LH、 E_2 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of Lin28a and Lin28b mRNA in Hypothalamus and Level of Serum LH and E_2 on PND15, PND23 and PND35($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Lin28a mRNA	Lin28b mRNA	LH(IU·L ⁻¹)	E_2 (Pmol·L ⁻¹)
EB-1	6	19.62 $\pm$ 0.58*	15.21 $\pm$ 1.20*	24.13 $\pm$ 4.06	37.79 $\pm$ 5.85
OIL-1	6	17.88 $\pm$ 1.65	10.98 $\pm$ 3.26	25.44 $\pm$ 3.77	39.76 $\pm$ 5.27
EB-2	6	19.48 $\pm$ 1.52 Δ	14.37 $\pm$ 0.64 Δ	22.39 $\pm$ 3.07 Δ	35.41 $\pm$ 4.50 Δ
OIL-2	6	17.47 $\pm$ 0.29	12.93 $\pm$ 1.40	30.12 $\pm$ 4.77	46.99 $\pm$ 6.66

注:* $P < 0.05$ EB-1 组与 OIL-1 组相比; $\Delta P < 0.05$ EB-2 组与 OIL-2 组相比

Note:* $P < 0.05$ EB-1 group compared with OIL-1 group; $\Delta P < 0.05$ EB-2 group compared with OIL-2 group

2.3 EB 诱导性早熟后大鼠生长发育指标

自然发育大鼠 PND15、PND23 及 PND35 均未观察到 VO。

与 OIL-2 组比较,EB-2 组 VO 时间明显提前($P < 0.01$),体

重、顶臀长、胫骨长差异无统计学差异($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 EB 诱导性早熟后生长发育指标($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Growth and development index after EB induction($\bar{x} \pm s$)

Group	n	VO time(d)	PND20	PND56		
			Weight(g)	Weight(g)	Crown-rump length(cm)	Tibia length(mm)
EB-1	6	19.5 $\pm$ 0.6*	48.02 $\pm$ 3.47	189.33 $\pm$ 20.57	18.85 $\pm$ 0.63	34.58 $\pm$ 1.38
OIL-2	6	38.5 $\pm$ 3.9	44.58 $\pm$ 2.71	180.32 $\pm$ 10.67	18.92 $\pm$ 0.50	35.59 $\pm$ 0.89

注:* $P < 0.05$ EB-2 组与 OIL-2 组相比

Note:* $P < 0.05$ EB-2 group compared with OIL-2 group

3 讨论

Lin28 最早发现于秀丽隐形线虫中,秀丽隐形线虫 Lin28b 基因是人类 Lin28 基因同源体^[3],Lin28a 和 Lin28b 具同源性^[4],Blast 及进化分析发现 Lin28a 和 Lin28b 可能自同一原始

Lin28b 基因演变而来^[5],Lin28a 及 Lin28b 编码高度保守的 RNA 结合蛋白 LIN28A 蛋白和 LIN28B 蛋白,阻断小 RNA let-7 的生物合成,从而促进原始细胞增殖,抑制分化^[4,6]。Lin28a (即 Lin28)调节小鼠原始干细胞发育,该基因的突变影响小鼠

体型、胰岛素敏感性和青春期发育^[10]。Lin28b 也与生长和青春发育相关^[2]。Meta 分析发现 Lin28b 的 rs7759938 和 rs314276 变异体与初潮年龄提前,最终身高降低相关^[1,6],rs314276 变异体的等位基因同时还与女孩乳房发育提早,生长加速相关^[6]。多个独立的全基因组关联研究发现人类 Lin28b 基因的多态变化与初潮年龄及身高相关^[1,6]。因此,我们推测 Lin28a 和 Lin28b 与性成熟相关,性成熟或性早熟 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达增多。

自然发育 PND15 组、PND23 组和 PND35 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达无统计学差异,提示雌性大鼠在幼稚期、青春前期及青春期等各发育阶段下丘脑 Lin28a 及 Lin28b mRNA 表达可能无明显变化,可进一步选取多个年龄段大鼠观察雌性大鼠发育过程中该基因表达的动态变化。

EB-1 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-1 组,即以 EB 诱导的性早熟大鼠进入青春期时下丘脑 Lin28a mRNA 及 Lin28b mRNA 表达高于进入青春期的非性早熟大鼠。此结果与 Ong 及 Sinner 等人的 META 分析、流行病学调查及 Hwang 等人研究 Lin28b 的变异体与初潮年龄提前、乳房早发育及生长加速等为表现的青春发育提前相关^[2]相符,同时也与 Lin28a 影响小鼠青春发育^[17]等结果相符。提示外源性雌激素所致的性早熟可能导致雌性大鼠青春期内下丘脑 Lin28a mRNA 及 Lin28b mRNA 表达增高。

EB-2 组下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于 OIL-2 组,即以 EB 诱导的性早熟大鼠至成年期时下丘脑 Lin28a 和 Lin28b mRNA 表达高于非性早熟大鼠。此结果表明外源性雌激素所致的性早熟可能导致雌性大鼠成年期下丘脑 Lin28a mRNA 及 Lin28b mRNA 表达增高。青春期调控相关研究发现下丘脑神经激肽 B 及其受体随着发育表达逐渐增高,至青春前期前后达高峰,于成年期又逐渐下降^[18]。而下丘脑 Lin28a mRNA 及 Lin28b mRNA 是否存在与神经激肽 B 及其受体的类似表达趋势仍不明确,可在进一步实验中观察性早熟雌性大鼠下丘脑 Lin28a 及 Lin28b mRNA 表达的动态变化。

人类幼稚期至青春前期,中枢神经系统内在的抑制机制和性激素的负反馈作用使下丘脑-垂体-性腺轴保持抑制状态,至青春期,中枢神经系统对下丘脑抑制作用抑制作用逐渐减弱,刺激因素逐渐增强,下丘脑释放 GnRH 增多,垂体促性腺激素进而分泌增多,随即性激素分泌量亦增多。SD 大鼠进入青春前期前,LH 和 E₂ 呈渐上升趋势,进入青春后期后 LH 和 E₂ 水平呈情动周期的规律性变化^[18]。本实验自然发育大鼠至出生后 35 日未观察到阴道开口,以 EB 诱导的性早熟大鼠阴道开口平均于出生后 20 日,其对照组阴道开口平均于出生后 39 日,提示以雌激素干预后,大鼠性成熟明显提前。本实验 PND15 组、PND23 组和 PND35 组血清 LH 和 E₂ 水平无统计学差异,与大鼠进入青春前期前血清 LH 和 E₂ 逐渐上升的^[18]趋势不符,可能由于样本量较小所致。EB-1 组血清 LH 和 E₂ 水平与 OIL-1 组 VO 时相比无统计学差异,但 EB-1 组 VO 日龄明显小于 OIL-1 组,提示性早熟大鼠血清 LH 和 E₂ 水平可能提前达青春前期水平。EB-2 组血清 LH 和 E₂ 水平于低于 OIL-2 组,可能因为性成熟大鼠处于情动周期的不同时段。

人类 Lin28b 基因突变的女孩青春期生长加速提前开始,

骨骼成熟加快,但最终成年身高减低^[1],初潮提前的女孩在幼年期身高和体重高于较其他女孩,至成年后其体重仍高于其他女孩,但身高较矮^[1]。本实验与 OIL-2 组比较,EB-2 组体重、顶臀长、胫骨长差异无统计学差异,与人类流行病学研究趋势不一致^[1]。可能由于雌激素受体基因^[19]、kisspeptin 基因^[20]等多种基因共同参与性发育调控,Lin28 基因仅为其中之一,由单一基因所致身长、体重差异可能并不显著,同时人类流行病学调查身长、体重差异包含上千例样本,而本实验由于条件所限,样本量较小。

综上,性早熟雌性 SD 大鼠青春期及成年期下丘脑 Lin28a 及 Lin28b mRNA 表达高于正常发育大鼠,提示外源性雌激素所致的雌性 SD 大鼠性早熟可能导致下丘脑 Lin28a mRNA 及 Lin28b mRNA 表达异常。研究 Lin28 基因表达与性早熟可能存在的关系,对进一步探索发病率有增高趋势的性早熟的病因和发病机制,临床上更好地防治性早熟,有着重要的意义。本实验未能观察到下丘脑 Lin28a 及 Lin28b mRNA 表达在大鼠青春发育过程及性早熟过程中的动态变化,可在进一步研究选取更多时间点观察 Lin28a 及 Lin28b mRNA 表达在大鼠青春发育及性早熟过程中的动态变化。

参考文献(References)

- [1] Ong K K, Elks C E, Li S, et al. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty [J]. Nat Genet, 2009, 41(6): 729-733
- [2] Hwang J S. The genes associated with gonadotropin-releasing hormone-dependent precocious puberty[J]. Korean J Pediatr, 2012, 55(1): 6-10
- [3] Moss E G, Lee R C, Ambros V, et al. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA[J]. Cell, 1997, 88(5): 637-646
- [4] Viswanathan S R, Daley G Q, et al. Lin28: A microRNA regulator with a macro role[J]. Cell, 2010, 140(4): 445-449
- [5] Guo Y, Chen Y, Ito H, et al. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma[J]. Gene, 2006, 384: 51-61
- [6] Perry J R, Stolk L, Franceschini N, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche [J]. Nat Genet, 2009, 41(6): 648-650
- [7] Sulem P, Gudbjartsson D F, Rafnar T, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche[J]. Nat Genet, 2009, 41(6): 734-738
- [8] He C, Kraft P, Chen C, et al. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause[J]. Nat Genet, 2009, 41(6): 724-728
- [9] Widen E, Ripatti S, Cousminer D L, et al. Distinct variants at LIN28B influence growth in height from birth to adulthood [J]. Am J Hum Genet, 2010, 86(5): 773-782
- [10] Navarro V M, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido M A, et al. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status[J]. J Neurosci, 2012, 32(7): 2388-2397
- [11] 肖抗, 恽时锋, 刘年双, 等. 实验动物科学与应用 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2008: 78-79

- amyloid-induced tau phosphorylation by altering the functional balance of glycogen synthase kinase 3 β and protein phosphatase 2A[J]. *Neurobiology of disease*, 2013
- [16] Shin YH, Jung OM, Nah JJ, et al. Ginsenosides that produce differential antinociception in mice [J]. *Gen Pharmacol*, 1999,32(6): 653-659
- [17] 曹荣, 屠令锋, 段丽, 等. 人参皂甙-Rd 对 SNI 大鼠痛敏异常及脊髓背角内 P 物质和 NK-1 受体表达的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2011, 27(1): 8-13
- Cao Rong, Tu Ling-feng, Duan Li, et al. Effect of Ginsenoside-Rd on allodynia and the expression of substance P and NK-1 receptor in the spinal dorsal horn of rats induced with spared nerve injury[J]. *Chinese journal of neuroanatomy*, 2011, 27(1): 8-13
- [18] Lee J H, Jeong S M, Kim J H, et al. Characteristics of ginsenoside Rg3-mediated brain Na⁺ current inhibition [J]. *Molecular pharmacology*, 2005, 68(4): 1114-1126
- [19] Bai C X, Takahashi K, Masumiya H, et al. Nitric oxide dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea pig cardiomyocytes [J]. *British journal of pharmacology*, 2004, 142(3): 567-575
- [20] Verdru P, De Greef C, Mertens L, et al. Na⁺(+)-Ca²⁺ exchange in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 1997, 77(1): 484-490
- [21] Tsuzuki K, Xing H, Ling J, et al. Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(3): 762-771
- [22] Catacuzzeno L, Fioretti B, Pietrobon D, et al. The differential expression of low-threshold K⁺ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones[J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 21): 5101-5118

(上接第 2213 页)

- Xiao Hang, Yun Shi-feng, Liu Nian-shuang, et al. Science and application of Laboratory animals [M]. Nanjing: Phoenix science press, 2008: 78-79
- [12] Navarro V M, Castellano J M, Fernandez-Fernandez R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(10): 4565-4574
- [13] Rasier G, Parent A S, Gerard A, et al. Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(4): 734-742
- [14] 丁海珍, 于宝生, 单晔, 等. 雌激素对青春前期雌性大鼠下丘脑促性腺激素释放激素表达和分泌的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2010, 25(8): 552-554
- Ding Hai-zhen, Yu Bao-sheng, Shan Ye, et al. Effects of estrogen on expression and secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamus of prepubertal female rat[J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2010, 25(8): 552-554
- [15] Hiney J K, Srivastava V K, Pine M D, et al. Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(1): 376-384
- [16] Viswanathan S R, Daley G Q, Gregory R I, et al. Selective blockade of microRNA processing by Lin28[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 97-100
- [17] Zhu H, Shah S, Shyh-Chang N, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(7): 626-630
- [18] 戴方伟, 陈文文, 毛栋森, 等. SD 雌性大鼠性发育早期性器官等脏器和性激素的动态变化[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(7): 33-37
- Dai Fang-wei, Chen Wen-wen, Mao Dong-sen, et al. Dynamic development of organs and serum sex hormone levels in normal pre-pubertal female Sprague-Dawley rats [J]. *Chin Comp Med*, 2009, 19(7): 33-37
- [19] Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, et al. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(2): 554-557
- [20] Messenger S, Chatzidaki E E, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(5): 1761-1766