

褪黑素对SD大鼠雌性子代生长及性发育的影响

王良岸, 李春花, 李扬志, 陈冬梅, 谢梅青*

(中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨孕期使用外源性褪黑素对子代生长发育的影响。【方法】SD孕鼠共30只,随机分成3组,每组10只。褪黑素低剂量组 MT-LD 组:给予褪黑素 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,褪黑素高剂量组 MT-HD 组: $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,对照组:生理盐水 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 处理。待分娩后选择每窝雌性子代每周测定其体质量平均增长情况。断奶后每日测定阴道开口及动情周期变化。于性周期稳定后测量每窝雌性子鼠股骨、胫骨的平均长度;ELISA 方法检测血清褪黑素、生长激素(GH)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)的平均水平,比较不同处理因素下每窝雌性子代体质量、长骨生长及性发育的差异。【结果】共获得30窝子鼠,分别为 MT-LD 92 只, MT-HD 84 只,对照组 97 只。MT-HD 组质量在各时间点均高于其余各组,MT-LD 组平均体质量高于对照组($P < 0.01$)。MT-HD 组阴道开口时间及出现第一个动情间期时间较其余两组显著提前($P < 0.01$),而 MT-LD 与对照组间无明显差异。MT-HD 组血清中 FSH、LH、褪黑素、生长激素平均水平分别较其余两组高($P < 0.05$),而上述各指标在 MT-LD 组及对照组见无统计学差异。【结论】外源性褪黑素作用于孕晚期母鼠,影响子代体质量、长骨生长及性发育,并存在剂量依赖关系,临床上在孕期使用褪黑素时应重视其对子代体质量、性发育及激素等的影响。

关键词:褪黑素;体质量;长骨生长;性发育

中图分类号:R715.9

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2015)04-0551-05

Effect of Melatonin Treatment during Pregnancy on Growth of Female Offspring in Rat

WANG Liang-an, LI Chun-hua, LI Yang-zhi, CHEN Dong-mei, XIE Mei-qing*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding to: XIE Mei-qing, E-mail: mqxieqz@163.com

Abstract: 【Objective】 To analyze the effect of exogenous melatonin (MT) treatment during pregnancy on the growth of the female offspring in the rat. 【Methods】 A total of 30 Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups and treated with melatonin (MT-LD group: $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, MT-HD group: $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) from day 15 of pregnancy to the day of delivery. The control rats were treated with saline solution under the same conditions. Female offspring body weight were assessed every week. Age of vaginal opening and oestrouscyclicity were assessed to determine the timing of pubertal onset. Serum, femur, tibia samples were taken before the first estrus or diestrus after stabilizing of the sexual cycle among every group. FSH, LH, melatonin growth hormone (GH) levels were measured. 【Result】 In total, 273 female offsprings were get, there were 92 rats in MT - LD group, 84 rats in MT - HD group, and 97 rats in control group only. The body weight statistically increased in MT-HD group respect to the other two groups, and weight in MT-LD group were significantly heavier than that in the control group ($P < 0.001$). The offsprings of melatonin ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) treated rats (MT-HD group) showed earlier vaginal opening and the onset of first diestrus than the other two group ($P < 0.001$). However, no differences were detected between MT-LD group and control group. The concentrations of FSH, LH, melatonin, and GH were statistically increased in MT-HD group ($P < 0.05$). However, those variables were not significantly different between the MT-LD group and control group. 【Conclusion】 Mother's melatonin treatment can affect weight, longitudinal bone growth and sexual maturation in developing rats. We should take into account these influences when melatonin treatment used in the pregnancy women.

Key words: melatonin; weight; longitudinal bone growth; sexual maturation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(4): 551-555]

收稿日期: 2015-02-17

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A060202012)

作者简介: 王良岸, 硕士, 副教授, 研究方向: 妇产科学, E-mail: lianganwanggz@126.com; * 通信作者: 谢梅青, E-mail: mqxieqz@163.com

褪黑素(Melatonin, MT)是由脊椎动物松果体细胞分泌的,具有昼低夜高节律的神经内分泌激素;近年来研究显示生殖系统,如卵巢、胎盘均可以生成褪黑素^[1]。其生物学作用广泛,参与调节生物节律,睡眠-觉醒周期,性成熟,衰老,神经内分泌,心血管系统等众多的生理变化^[2]。近年来其对生殖系统,特别是孕期的影响越来越受到重视。辅助生育技术助孕患者的卵泡液中,褪黑素水平与DNA氧化应激损伤程度呈负相关。在促排卵过程中外源性添加褪黑素能够改善不孕症患者的受精率及妊娠率^[3]。在卵母细胞体外培养系统中添加褪黑素,能够提高多囊卵巢综合征患者卵子成熟率,增加临床妊娠率^[4]。而对于子痫前期患者胎盘组织的研究显示,褪黑素的生成、褪黑素受体数量均较对照组显著降低^[5]。相应的研究为孕期外源性添加褪黑素提供了理论依据。然而孕期使用褪黑素,对子代的生长发育、性成熟的影响,相关报道较少见,尚缺乏其对子代安全性的研究报道。本研究拟通过动物实验研究,揭示其对子代体质量、长骨生长及性发育造成的影响,为临床运用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和实验用动物

褪黑素(MT)购于Sigma公司,MT及生长激素(GH)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)ELISA试剂盒购于BLUE GENEN公司,SD孕鼠购于中山大学动物实验中心,SPF级。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 同批次成年SD孕鼠,共30只,随机分成3组,每组10只,MT低剂量组(MT-LD, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、MT高剂量组(MT-HD, $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、对照组(生理盐水, $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。按组别分笼饲养于中山大学动物中心屏障环境实验室,室温 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\%\sim 70\%$,颗粒饲料和净化水喂养,自由择食,光照/黑暗分别为 $12\text{ h}/12\text{ h}$ 。

1.2.2 造模方法 将MT用无水乙醇溶解,生理盐水稀释,配置成浓度为1%的褪黑素溶液(无水乙醇 $< 5\%$)。分装后锡箔纸包裹避光置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存(溶液配制当日和次日用,配制溶液均在生物安全柜内避光无菌操作)。孕鼠在第15孕龄时开

始每日固定时间称体质量,给予腹腔注射直至分娩。雌性子鼠于出生后第23日龄断奶后按孕鼠组别分入各组。连续观察子代阴道口情况,对阴道已开口的子代于每日上午定时进行阴道涂片,待性周期稳定后(动情前期-动情期-动情后期-动情间期)的第一个动情期/动情间期(1/1比例)称质量,采样。

1.2.3 采样方法 各组SD大鼠用10%水合氯醛(300 mg/kg 体质量)麻醉后,经下腔静脉采血,静置30 min后,离心 $3\,000\text{ r/min}$,半径 $= 8\text{ cm}$,10 min,将血清分装于EP管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于后续ELISA方法检测血清MT、GH、FSH、LH水平。采血后各鼠失血致死,摘取双后肢完整的整段股骨和胫骨备测量。

1.3 观测指标

计算每窝雌性小鼠平均体质量,股骨、胫骨长度,阴道开口,动情周期变化,血清MT、GH、FSH、LH的平均变化水平,以每窝小鼠各指标平均水平为基本单位,进行统计学分析。

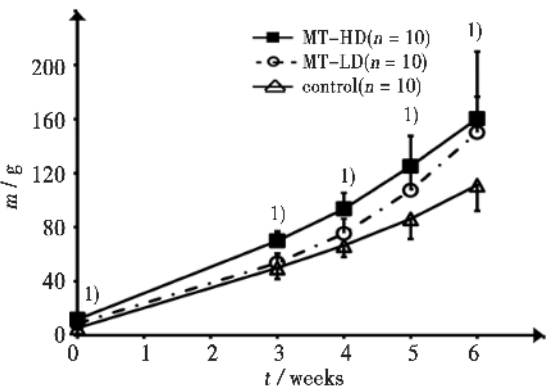
1.4 统计学处理

采用SPSS13.0统计分析软件,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组计量资料采用单因素方差分析,Bonferroni方法进一步两两比较,不同时间点体质量比较采用重复测量资料方差分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 生长指标比较

30窝共获得雌性子代273只,3组孕期不同处理大鼠(褪黑素低剂量组MT-LD,褪黑素高剂量组MT-HD,对照组)分别获得雌性子代92、84、97只。出生日3组雌性小鼠平均体质量分别为MT-LD组($8.6 \pm 1.51\text{ g}$),MT-HD组为($11.76 \pm 3.36\text{ g}$),对照组为($5.33 \pm 0.96\text{ g}$)($P < 0.01$);在观察终点3组平均体质量分别为($150.0 \pm 26.63\text{ g}$)、($160.38 \pm 49.69\text{ g}$)和($116.86 \pm 20.12\text{ g}$)($P < 0.01$)。每周测定每窝子代平均体质量变化显示在各个时间点MT-HD组小鼠体质量高于对照组,而对照组小鼠体质量给在各时间点均低于前两组(图1, $P < 0.01$)。时间与分组的交互效应 $P < 0.05$,提示孕期不同的处理导致后代体质量变化的模式并不一致。表1显示了3组雌性子鼠股骨、胫骨组间存在



MT-LD group: MT low dose group; MT-HD group: MT high dose group; 1) $P < 0.01$

图 1 不同处理组子鼠体质量变化情况
Fig.1 Body weight variation overtime for different treatment

表 1 不同处理组大鼠的每窝子代平均股骨、胫骨长度变化情况

Table 1 Femur and tibia length of offspring of control, melatonin-treated mother rats ($\bar{x} \pm s$)				
	MT-LD group	MT-HD group	Control	<i>P</i>
<i>n</i>	10	10	10	
Femur length/cm	$2.57 \pm 0.15^{1)}$	$2.76 \pm 0.24^{1)2)}$	2.28 ± 0.13	<0.01
Tibia length/cm	$3.02 \pm 0.26^{1)}$	$3.19 \pm 0.21^{1)2)}$	2.75 ± 0.18	<0.01

MT-LD group: MT low dose group; MT-HD group: MT high dose group. Bonferroni test after ANOVA, 1) Compared with control group, $P < 0.01$; 2) Compared with MT-LD group, $P < 0.01$

统计学差异, MT-LD 组大鼠股骨、胫骨长度较对照组增加 ($P < 0.01$), 而 MT-HD 组上述指标均高于其余两组 ($P < 0.01$)。

2.2 雌性子鼠阴道开口及建立稳定性周期情况

MT-HD 组阴道开口日龄及出现第一个动情间期时间明显早于对照组及 MT-LD 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。经阴道涂片及美兰染色后观察第一个规律的性周期 (动情前期-动情期-动情后期-动情间期) 持续的时间, MT 处理组的规律性周期持续时间与对照组差异无统计学意义 (表 2)。

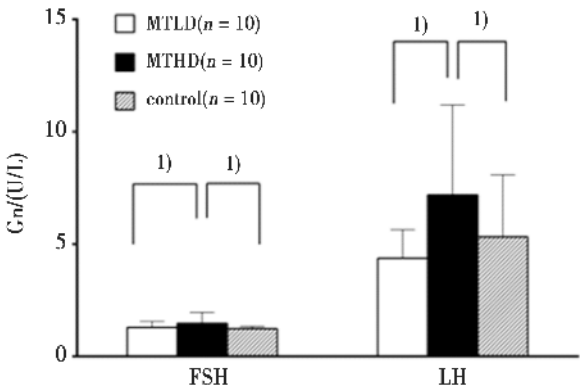
2.3 激素水平比较

MT-HD 组血清中每窝子鼠 FSH、LH 水平分别为 (1.47 ± 0.49) U/L, (7.19 ± 4.01) U/L, 较 MT-LD 组 (1.29 ± 0.27) U/L, (4.37 ± 1.28) U/L 及对照组 (1.24 ± 0.1) U/L, (5.32 ± 2.77) U/L 高 ($P <$

表 2 褪黑素对雌鼠子代性成熟的影响

Table 2 Effect of melatonin on sex maturation of female offspring rats ($\bar{x} \pm s$, d)				
Group	MT-LD group	MT-HD group	control	<i>P</i>
<i>n</i>	10	10	10	
Vagina opening	35.2 ± 6.1	$26.7 \pm 2.4^{1)2)}$	37.7 ± 7.8	<0.01
First diestrus emerge	46.3 ± 10.6	$34.9 \pm 3.2^{1)2)}$	48.7 ± 11.0	<0.01
First stable sex cycle	11.2 ± 5.1	10.1 ± 2.1	11.0 ± 4.6	>0.05

MT-LD group: MT low dose group; MT-HD group: MT high dose group. Bonferroni test after ANOVA, 1) Compared with control group, $P < 0.01$; 2) Compared with MT-HD group, $P < 0.01$



MT-LD group: MT low dose group; MT-HD group: MT high dose group; 1) $P < 0.05$

图 2 不同处理组 Gn 浓度变化
Fig.2 The concentrations of Gn in different treatment group

0.05; 图 2)。MT-LD 组与对照组间无明显统计学差异。

表 3 不同处理组子代激素水平变化

Table 3 The hormone levels of the female offspring rats ($\bar{x} \pm s$)				
	MT-LD group	MT-HD group	control group	<i>P</i>
<i>n</i>	10	10	10	
MT/(pg/mL)	143 ± 28	$174 \pm 50^{1)2)}$	123 ± 44	<0.01
GH/(ng/mL)	6.3 ± 3.2	$11.9 \pm 9.0^{1)2)}$	8.8 ± 6.6	<0.01

Bonferroni test after ANOVA, 1) Compared with the control group, $P < 0.01$; 2) Compared with the MT-LD group, $P < 0.01$

MT-HD 组子代雌鼠血液 MT 水平高于对照组, 及 MT-LD 组, 差异有统计学意义。MT-HD 组 GH 水平高于对照组及 MT-LD 组, 差异有统计学

意义(表 3)。MT-LD 与对照组间 MT、GH 水平无明显统计学差异。

3 讨 论

近年来对褪黑素作用机制不断深入的研究,提示其在生物节律的调控中起到了重要的作用^[6]。同时位于下丘脑的视交叉上核(SCN)作为生物节律的主要控制点,能够通过复杂的神经联系进而调控褪黑素的分泌^[7]。孕期母亲褪黑素节律性分泌、发挥生理作用对子代生物节律的形成起到了重要作用^[6]。来自动物及人类研究结果显示,母体节律性的褪黑素变化能够引起胎儿血液循环中褪黑素的波动。同时孕 15 日龄,胎儿垂体已具有褪黑素受体;孕 18 日龄时,胎儿视交叉上核具有褪黑素受体^[8],存在褪黑素发挥重要生理作用的分子基础。通过改变日夜光照时限影响孕鼠褪黑素分泌节律后,胎儿相关的生物节律紊乱;孕鼠添加褪黑素后能够纠正子代生物节律的紊乱^[9]。切除母体松果体后研究发现其子代代谢功能障碍,表现为胰岛素功能的低下,肝脏胰岛素抵抗的发生以及糖耐量异常等方面^[10]。我们的研究提示孕期使用褪黑素对子代生长、性发育相关指标具有影响,表现为褪黑素增加子代体质量,高剂量褪黑素能够促进 GH、FSH、LH 等释放,促进性发育的提前。我们和既往他人的研究提示母体体温、进食、节律性褪黑素分泌的改变,能够在胎儿宫内发育及视交叉上核成熟过程中发挥作用,从而调控胎儿肾上腺皮质醇分泌节律和垂体的节律性,进而影响子代外周器官的节律性,对子代生长、发育、代谢产生影响^[6]。因此孕期外源性褪黑素的补充对母体以及子代生物节律均存在一定影响。

我们的研究还提示褪黑素所发挥的作用存在一定的量效关系。随着褪黑素剂量的增加,后代生长发育较对照组逐渐增加,表现为同龄体质量、股骨、胫骨长度的增加。而高剂量的褪黑素处理孕鼠后,子代发育较对照组增加,同龄体质量、股骨、胫骨长度、生长激素增加;同时子代的性发育时间提前,表现为阴道开口日龄及出现第一个动情间期时间较对照组、MT-LD 组提前,性激素 FSH、LH 增高。而低剂量的褪黑素处理孕鼠后较对照组仅表现为生长的增加,性发育的时限无明显差异。既往相关的剂量因素对于子代生长发育的影响鲜

见。本研究提示褪黑素对于母体节律性的影响与剂量存在一定关联。

生长激素为垂体分泌的促进生长的重要内分泌激素,其分泌具有固定节律性,同样受到视交叉上核的调控,其主要调控因子为生长激素释放激素及生长抑素^[11],另外睡眠、皮质醇等其他因素也参与了调节。我们的研究中不同褪黑素处理后其子代生长激素存在差异,其可能是由于生物节律性的改变而影响生长激素的分泌。另外既往部分研究认为褪黑素能够增加生长激素的分泌^[12-13]。本研究中,子代血清中不同水平的褪黑素在一定程度上也能解释生长激素的差异。当然应该注意到褪黑素对于生长激素的作用仍然存在一定争议,这可能与不同处理条件、不同种属等相关。提示生长激素的差异可能是节律性、褪黑素直接作用以及性成熟等多个因素共同调控的结果。而生长激素的差异一定程度上解释了不同组别小鼠体质量增长的差异,以及在体质量增长模式上的差异。

褪黑素除了作为参与生理节律调控的作用外,其对下丘脑-垂体-性腺轴亦具有直接的调控作用^[2]。研究发现下丘脑、垂体存在褪黑素受体。而来自新生小鼠的实验提示褪黑素能够抑制 LH 释放、cAMP、cGMP 的激活^[2]。然而褪黑素对于成年动物垂体的作用尚不清楚。Diaz 等^[14]对孕鼠给予外源性褪黑素处理后观察其雌性子代 LH 水平变化,提示在不同时期 LH 的表达水平并非表现为单一的抑制。我们的研究显示在孕期给予不同剂量的褪黑素后,子代褪黑素水平存在差异,孕期高剂量组其子代褪黑素浓度最高,其次为孕期低剂量组,而对照组褪黑素浓度最低。孕期低剂量组子代 FSH 与对照组相似,而 LH 则呈现降低的趋势,这与 Diaz 等^[14]观察具有一致性。而在子代褪黑素含量最高组,即孕期高剂量组,FSH、LH 均较对照组增加,提示褪黑素对性激素的影响存在一定的剂量性。来自不同浓度褪黑素与卵泡发育的研究表明,1 mmol/L 降低卵泡成熟度,2 mmol/L 具毒性作用,而 10 mmol/L 高剂量则对卵泡发育无影响^[15],从一个侧面佐证我们的研究结论,即褪黑素作用效果存在剂量依赖性。

综上所述,孕晚期母鼠给予外源性褪黑素处理,可影响子代的生长发育,且存在剂量依赖关系。低剂量褪黑素处理后,子代体质量,长骨长度

较对照组增加,性发育无明显差异;而高剂量的褪黑素处理后子代体质量,长骨长度较对照组增加,性成熟时间提前。孕期使用褪黑素剂量与子代褪黑素、生长激素、FSH、LH水平具有一定相关性。临床上孕期使用褪黑素时应重视其对子代体质量、性发育及激素等的影响。

参考文献

- [1] Reiter RJ, Tan DX, Tamura H, et al. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(2):83–89.
- [2] Shi L, Li N, Bo L, et al. Melatonin and hypothalamic–pituitary–gonadal axis [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(15):2017–2031.
- [3] Tamura H, Takasaki A, Miwa I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from freeradical damage and improves fertilization rate [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(3):280–287.
- [4] Kim MK, Park EA, Kim HJ, et al. Does supplementation of in vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? [J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26(1):22–29.
- [5] Lanoix D, Guerin P, Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy [J]. *J Pineal Res*, 2012, 53(4):417–425.
- [6] Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(2):293–307.
- [7] Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases[J]. *J Pineal Res*, 2011, 51(1):17–43.
- [8] Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, et al. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3):5380–5401.
- [9] Torres–Farfan C, Rocco V, Monso C, et al. Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(10):4618–4626.
- [10] Ferreira DS, Amaral FG, Mesquita CC, et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e38795.
- [11] Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2007, 36(1):37–55.
- [12] Kasuya E, Kushibiki S, Sutoh M, et al. Effect of melatonin injected into the third ventricle on growth hormone secretion in Holstein steers[J]. *J Vet Med Sci*, 2006, 68(10):1075–1080.
- [13] Valcavi R, Zini M, Maestroni GJ, et al. Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone–releasing hormone [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1993, 39(2):193–199.
- [14] Diaz LB, Colmenero UM, Diaz RM, et al. Effect of pinealectomy and melatonin treatment during pregnancy on the sexual development of the female and male rat offspring[J]. *Eur J Endocrinol*, 1995, 132(6):765–770.
- [15] Adriaens I, Jacquet P, Cortvriendt R, et al. Melatonin has dose–dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis[J]. *Toxicology*, 2006, 228(2–3):333–343.

(编辑 徐杰)