



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 基于 RFRP-3/GPR147 信号通路探究知母总皂苷对中枢性性早熟模型大鼠的治疗作用

作者： 张凯，张雪荣，陈子琴，王各欢，蒋兴燕莹

网络首发日期： 2025-11-13

引用格式： 张凯，张雪荣，陈子琴，王各欢，蒋兴燕莹. 基于 RFRP-3/GPR147 信号通路探究知母总皂苷对中枢性性早熟模型大鼠的治疗作用[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251112.1711.016>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于 RFRP-3/GPR147 信号通路探究知母总皂苷对中枢性性早熟模型大鼠的治疗作用

张 凯^{1,2}, 张雪荣^{3,4}, 陈子琴^{3,4}, 王各欢^{3,4}, 蒋兴燕莹^{3,4}

[¹河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)儿科, 郑州 450053; ²湖北中医药大学中医学院, 武汉 430065; ³湖北省中医院(湖北中医药大学附属医院)儿科, 武汉 430061; ⁴湖北时珍实验室, 武汉 430061]

摘要 目的 基于 RF-酰胺相关肽 3 (RFRP-3) /G 蛋白耦联受体 147 (GPR147) 信号通路探讨知母总皂苷对中枢性性早熟 (CPP) 大鼠发挥治疗作用的分子机制。**方法** 26 日龄雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、RFRP-3 上调组 (1.5 mg/kg)、知母总皂苷组 (200 mg/kg)、知母总皂苷+空载组、知母总皂苷+RFRP-3 敲低组, 每组 12 只; 采用皮下注射 N-甲基-DL-天冬氨酸 (NMA) (40 mg/kg) 制备 CPP 大鼠模型。造模给药后每日观察大鼠阴门开启时间以及第 1 个动情间期, 在模型组出现第 1 个动情间期时, 停止给药。记录各组大鼠阴门开启时间与首个动情间期时间; 同时, 称取双侧卵巢和子宫湿质量, 计算卵巢和子宫指数; HE 染色观察大鼠卵巢和子宫组织形态学变化, 并计数卵巢黄体数, 测定子宫壁厚度; ELISA 法检测血清促黄体激素 (LH)、促卵泡激素 (FSH)、雌二醇 (E₂) 水平; RT-qPCR 法检测下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54、RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠阴门开启日龄和首个动情间期时间提前 ($P<0.05$), 卵巢指数和子宫指数、卵巢黄体数目和子宫壁厚度、血清 LH、FSH、E₂ 水平、下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54 的 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, RFRP-3 上调组、知母总皂苷组大鼠阴门开启日龄和首个动情间期时间延迟 ($P<0.05$), 卵巢指数和子宫指数、卵巢黄体数目和子宫壁厚度、血清 LH、FSH、E₂ 水平、下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54 的 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$), RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$); 敲低 RFRP-3 可明显减弱知母总皂苷对 CPP 大鼠性早熟发展程度的延缓作用 ($P<0.05$)。**结论** 知母总皂苷可能通过激活 RFRP-3/GPR147 信号通路, 抑制 GnRH 的释放和下丘脑-垂体-性腺轴的提前激活, 缓解 CPP 模型大鼠性早熟发展程度。

关键词 知母总皂苷; 中枢性性早熟; 下丘脑-垂体-性腺轴; 促性腺激素释放激素; RF-酰胺相关肽 3; G

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (编号: 2023AFD117)

作者简介: 张 凯, 女, 主治医师;

张雪荣, 女, 主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: 1251635860@qq.com

蛋白耦联受体 147

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492

Exploring the therapeutic effect of total timosaponin on central precocious puberty model rats based on the RFRP-3/GPR147 signaling pathway

Zhang Kai^{1,2}, Zhang Xuerong^{3,4}, Chen Ziqin^{3,4}, Wang Gehuan^{3,4}, Jiang Xingyanying^{3,4}

[¹Dept of Pediatrics, Henan Province Hospital of TCM (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450053; ²College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; ³Dept of Pediatrics, Hubei Provincial Hospital of TCM (Affiliated Hospital of Hubei University of Traditional Chinese Medicine), Wuhan 430061; ⁴Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061]

Abstract *Objective* To explore the molecular mechanism of the therapeutic effect of total timosaponin on central precocious puberty (CPP) rats based on the RF-amide-related Peptide 3 (RFRP-3)/G protein-coupled receptor 147 (GPR147) signaling pathway. *Methods* Twenty-six day-old female SD rats were randomly assigned into a control group, a model group, an RFRP-3 up-regulated group (1.5 mg/kg), a total timosaponin group (200 mg/kg), a total timosaponin+empty load group, and a total timosaponin+RFRP-3 knockdown group, with 12 rats in each group. A CPP rat model was prepared by subcutaneous injection of N-methyl-DL-aspartic acid (NMA) (40 mg/kg). After modeling and administration, the opening time of the rat's vulva and the first estrus interval daily were observed. Administration was stopped when the first estrus interval appeared in the model group. The day of vaginal opening and the time of the first estrus interval of rats were recorded in each group of rats. The wet masses of both ovaries and uterus were measured, and the ovarian and uterine indices were calculated; HE staining was used to observe the morphological changes of rat ovarian and uterine tissues, the number of corpus luteum in the ovaries and the thickness of the uterine wall were determined; ELISA method was applied to detect levels of serum luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), and estradiol (E₂); RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH), KISS-1, GPR54, RFRP-3, and GPR147. *Results* Compared with the control group, the day of vaginal opening and the time of the first estrus interval of rats in the model group were advanced ($P<0.05$), the ovarian index and uterine index, number of ovarian corpus luteum and uterine wall thickness, serum LH, FSH, E₂ levels, and the GnRH, KISS-1, and GPR54 mRNA expression levels in the hypothalamus increased ($P<0.05$), while the RFRP-3 and GPR147 mRNA

expression levels decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the day of vaginal opening and the time of the first estrus interval of rats in the RFRP-3 up-regulated group and the total timosaponin group were delayed ($P<0.05$), the ovarian index and uterine index, number of ovarian corpus luteum and uterine wall thickness, serum LH, FSH, E_2 levels, and the GnRH, KISS-1, and GPR54 mRNA expression levels in the hypothalamus decreased ($P<0.05$), while the RFRP-3 and GPR147 mRNA expression levels increased ($P<0.05$). Knocking down RFRP-3 could prominently weaken the delaying effect of total timosaponin on the development of precocious puberty in CPP rats ($P<0.05$). **Conclusion** Total timosaponin may inhibit the release of GnRH and premature activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by activating the RFRP-3/GPR147 signaling pathway, thereby alleviating the degree of precocious puberty development in CPP model rats.

Key words total timosaponin; central precocious puberty; hypothalamic-pituitary-gonadal axis; gonadotropin-releasing hormone; RF-amide-related Peptide 3; G protein-coupled receptor 147

Fund program Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2023AFD117)

Corresponding author Zhang Xuerong, E-mail: 1251635860@qq.com

中枢性性早熟 (central precocious puberty, CPP) 是由于提前启动下丘脑-垂体-性腺轴功能, 导致女孩在 8 岁前、男孩在 9 岁前出现内、外生殖器官快速发育及第二性征呈现的内分泌疾病^[1]。全球范围内性早熟的发病率呈上升趋势^[2]。促性腺激素释放激素类似物 (gonadotropin releasing hormone analogue, GnRHa) 是治疗 CPP 的指南用药, 但其远期疗效尚不明确^[3]。据统计, 知母是治疗 CPP 的中药方剂中的使用频数最高的药物^[4]。知母总皂苷是知母的主要成分, 其可抑制下丘脑-垂体-性腺轴, 调节雌性性早熟大鼠性激素水平^[5]。但其治疗 CPP 的作用机制尚不完全明确。RF-酰胺相关肽 3 (RF-amide-related Peptide 3, RFRP-3) /G 蛋白耦联受体 147 (G protein-coupled receptor 147, GPR147) 信号通路主要涉及生殖系统的调控。RFRP-3 是一种下丘脑神经肽, 也是目前唯一已知的下丘脑-垂体-性腺轴抑制因子, 通过与其受体 GPR147 结合向生殖轴发出抑制信号^[6]。雌性大鼠下丘脑 RFRP-3 通路的破坏与青春期提前有关^[7], 上调下丘脑 RFRP-3、GPR147 表达水平延迟性早熟大鼠的性发育^[8], 表明 RFRP-3/GPR147 信号通路可能是治疗 CPP 的潜在靶点。该研究旨在基于 RFRP-3/GPR147 信号通路探讨知母总皂苷发挥治疗 CPP 作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 72 只雌性 SD 大鼠, SPF 级, 26 日龄, 体质量 60~70 g, 购自湖北省实验动物研究中心[动物合格证号: SCXK (鄂) 2020—0018]。大鼠于湖北中医药大学动物房内, 在 12 h 光照/12 h 黑暗、温度 24~26 °C、湿度 40%~70% 的环境中饲养, 自由摄食和饮水。本研究获得湖北中医药大学伦理委员会批准 (批准号:

HUCMS61764854)。

1.1.2 主要试剂与仪器 知母饮片购自北京同仁堂，经湖北中医药大学中药学院教授鉴定为百合科知母属植物知母；参考文献方法^[9]制备知母总皂苷，经紫外可见分光光度法鉴定知母总皂苷含量>80%；大鼠 RFRP-3 多肽由上海楚肽生物科技有限公司合成；RFRP-3 敲低慢病毒载体（序列 5'-GATGTTGAAAGTTGTAAA-3'）及其对照空载体（序列 5'-AGTTAGAATGAGATACAGT-3'）由吉满生物科技（上海）有限公司构建；N-甲基-DL-天冬氨酸（N-Methyl-DL-aspartic acid, NMA）（纯度≥98.0%，货号：HY-W017500）购自美国 MCE 公司；HE 染色试剂盒（货号：C0105S）购自上海碧云天生物技术有限公司；大鼠促黄体激素（luteinizing hormone, LH）、促卵泡激素（follicle stimulating hormone, FSH）、雌二醇（estradiol, E₂）ELISA 试剂盒（货号：ml002860、ml002872、ml038322）购自上海酶联生物科技有限公司；FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒（货号：KR123）购自天根生化科技（北京）有限公司。光学显微镜（型号：DM4 B）购自德国 Leica 公司；酶标仪（型号：Varioskan ALF）购自美国 Thermo Scientific 公司；RT-qPCR 仪（型号：QuantStudio 5）购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模与给药 将大鼠随机分为对照组、模型组、RFRP-3 上调组、知母总皂苷组、知母总皂苷+空载组、知母总皂苷+RFRP-3 敲低组，每组 12 只。自 26 日龄至阴道口开放之日，除对照组外，其余各组大鼠采用皮下注射 NMA（40 mg/kg）的方法制备 CPP 模型^[10]，分别于每日 14:00 和 16:00 各注射 1 次；对照组在相同时间皮下注射等体积 0.9%氯化钠溶液。

自 26 日龄至阴道口开放之日，每日上午 9:00，RFRP-3 上调组大鼠给予 1.5 mg/kg 的 RFRP-3 多肽溶液肌肉注射^[11]；知母总皂苷组给予 200 mg/kg 的知母总皂苷灌胃^[5]；知母总皂苷+空载组和知母总皂苷+RFRP-3 敲低组大鼠灌胃 200 mg/kg 知母总皂苷，并分别通过尾静脉注射慢病毒空载体、RFRP-3 敲低慢病毒载体（病毒滴度 1×10^7 TU/mL）；对照组和模型组大鼠给予 0.9%氯化钠溶液灌胃和注射。

1.2.2 取材 观察大鼠阴门开启情况，当模型组大鼠出现阴门开启时，各组 12 只大鼠均立即停止注射 NMA。模型组大鼠阴门开启后，阴道涂片确定出现第 1 个动情间期时，各组 12 只大鼠均停止给药或给予 0.9%氯化钠溶液；然后将各组大鼠处死。处死前，将大鼠麻醉，经腹主动脉取血，离心（4 °C，3 000 r/min，15 min）分离血清，-20 °C 下冻存备用；处死后，取双侧卵巢和子宫，称重后保存在 4%多聚甲醛中；断头取下丘脑，-80 °C 下冻存备用。具体时间轴见图 1。

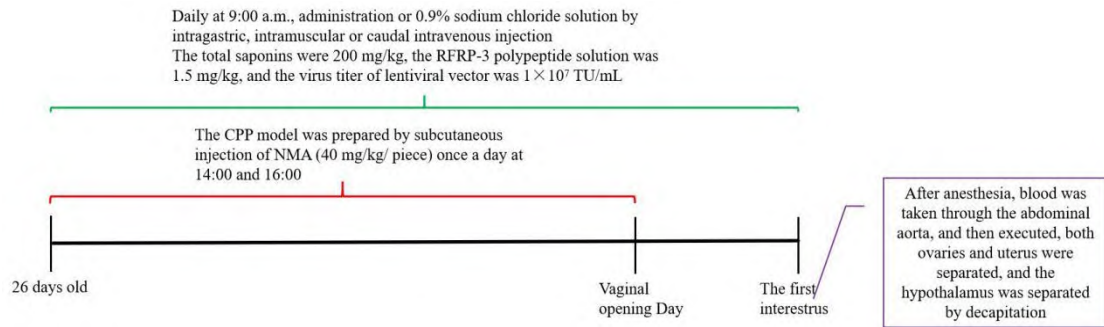


图 1 大鼠造模、给药、取材时间轴

Fig. 1 Time axis of modeling, administration and sampling in rats

1.2.3 阴门开放情况和性周期观察 每日上午 9:00 观察大鼠阴门开启情况，每日行阴道涂片检查，在光学显微镜下观察涂片确定大鼠所处的性周期，记录各组大鼠阴门开启时间与首个动情间期时间。

1.2.4 大鼠脏器指数 称取双侧卵巢和子宫湿质量，计算卵巢和子宫指数。脏器指数=脏器湿质量 (mg) / 体质量 (g)。

1.2.5 HE 染色观察大鼠卵巢、子宫组织形态学变化 将于 4% 多聚甲醛中固定的子宫、卵巢组织取出，进行常规处理并包埋在石蜡中，制备 5 μ m 厚切片，HE 染色后光镜下观察，计数卵巢黄体数，并使用 Image-Pro Plus6.0 软件测定子宫病理切片的子宫壁厚度。

1.2.6 ELISA 法检测血清 LH、FSH、E₂ 水平 取 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存的血清样本，解冻后，采用 ELISA 试剂盒检测血清中 LH、FSH、E₂ 水平。

1.2.7 RT-qPCR 法检测下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54、RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达 取下丘脑组织，使用 TRIzol 试剂进行总 RNA 提取，并将 RNA 逆转录成 cDNA。使用 FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒在 RT-qPCR 仪上以 cDNA 为模板进行扩增。RT-qPCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，循环 38 次；72 $^{\circ}$ C 5 min。引物序列见表 1。以 GAPDH 为内标，2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算相对表达。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product length (bp)
GAPDH	ACTTTGGCATCGTGGAAGGG	TGCAGGGATGATGTTCTGGG	128
GnRH	CCGCTGTTGTTCTGTTGA	TTCTGCCATTTGATCCTC	150
KISS-1	GGTATGCAGAGAGCAAGCCT	GATCAGGCGACTGCGGG	122
GPR54	CAGCCTTAGCATCTGGGTGG	GGTATAGGCCAGCAGGTTG	181

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product length (bp)
RFRP-3	ACTTCATGCTGGATGCTCGT	ACATCACTACGATGAGCGCC	144
GPR147	CCCGAGAGGAGCATCACTTC	GTAGATGTGCGGAAGAGCA	123

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据, 统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 知母总皂苷对大鼠性周期的影响 通过比较发现各组阴门开启时间与首个动情间期时间差异显著 ($F=7.527, 23.689$, 均 $P < 0.001$) ; 与对照组比较, 模型组大鼠阴门开启日龄和首个动情间期时间提前 (均 $P < 0.01$) ; 与模型组比较, RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组大鼠阴门开启日龄和首个动情间期时间延迟 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 与知母总皂苷+空载组比较, 知母总皂苷+RFRP-3 敲低组大鼠阴门开启日龄和首个动情间期时间提前 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 。见图 2。

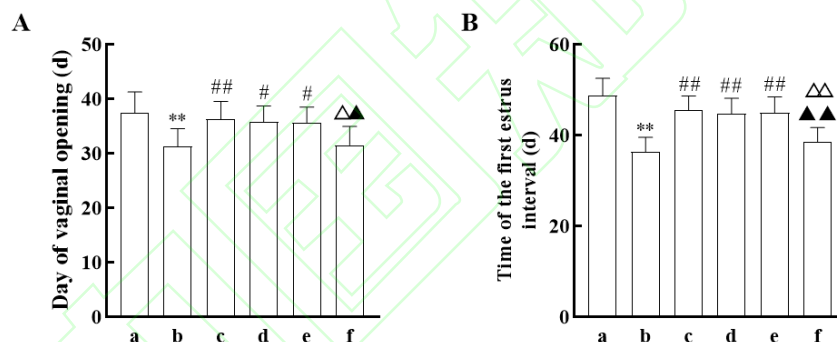


图 2 各组大鼠阴门开启时间与首个动情间期时间比较 ($n=12$)

Fig. 2 Comparison of the time of opening of the vulva and the time of the first estrous interval of rats in each group ($n=12$)

A: Comparison of the opening time of the vulva of rats in each group; B: Comparison of the time of the first estrous interval of rats in each group; a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Model group; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ vs Total timosaponin group; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ vs Total timosaponin+empty load group.

2.2 知母总皂苷对大鼠卵巢指数和子宫指数的影响 通过比较发现各组卵巢指数和子宫指数差异显著 ($F=52.157, 107.402$, 均 $P < 0.001$) ; 与对照组比较, 模型组大鼠卵巢指数和子宫指数升高 (均 $P < 0.01$) ;

与模型组比较，RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组上述指标降低（均 $P<0.01$ ）；知母总皂苷+RFRP-3 敲低组上述指标高于知母总皂苷+空载组（均 $P<0.01$ ）。见图 3。

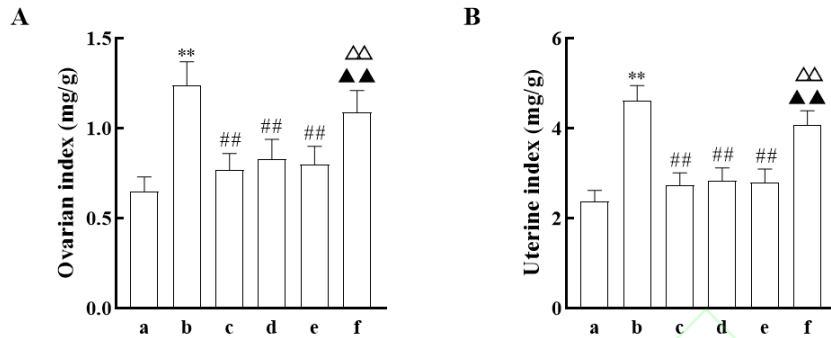


图 3 各组大鼠卵巢指数和子宫指数比较 ($n=12$)

Fig. 3 Comparison of ovarian index and uterine index of rats in each group ($n=12$)

A: Comparison of ovarian index in each group; B: Comparison of uterine index in each group; a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ** $P<0.01$ vs Control group; ## $P<0.01$ vs Model group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Total timosaponin group; $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ vs Total timosaponin+empty load group.

2.3 知母总皂苷对大鼠卵巢组织形态学变化的影响 HE 染色结果显示：对照组大鼠卵巢结构正常、细胞排列有序各级卵泡排列其中；与对照组比较，模型组大鼠卵巢增大，各级卵泡分布其中，卵巢黄体数目增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组大鼠卵巢减小，各级卵泡分布其中，卵巢黄体数目降低 ($P<0.01$)；与知母总皂苷+空载组比较，知母总皂苷+RFRP-3 敲低组大鼠卵巢黄体数目增加 ($P<0.01$)。见图 4。

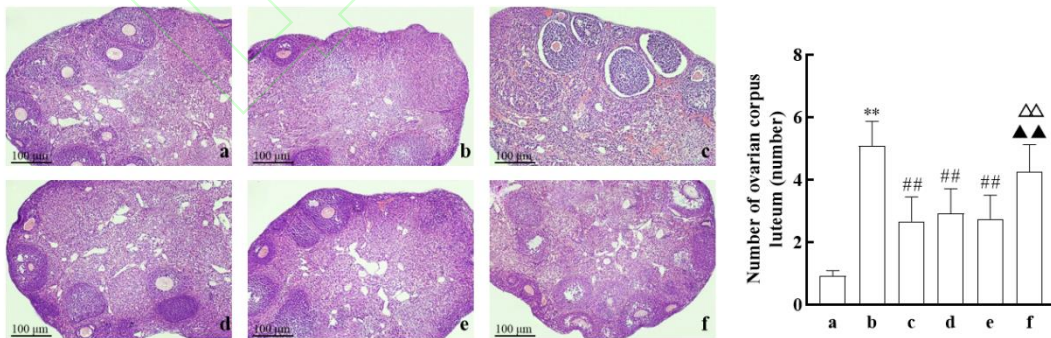


图 4 各组大鼠卵巢形态学变化 (HE 染色 $\times 100$)

Fig. 4 Morphologic changes in the ovaries of rats in each group (HE staining $\times 200$)

a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ** $P<0.01$ vs Control group;

^{##} $P<0.01$ vs Model group; ^{△△} $P<0.01$ vs Total timosaponin group; ^{▲▲} $P<0.01$ vs Total timosaponin+empty load group.

2.4 知母总皂苷对大鼠子宫组织形态学变化的影响 HE 染色结果显示：对照组大鼠子宫组织结构清晰、黏膜上皮完整、光滑，浆膜层内间质细胞分布均匀；与对照组比较，模型组大鼠子宫组织结构紊乱，上皮细胞脱落，子宫壁增厚，浆膜层内有出血现象，浆膜内间质细胞排列紊乱疏松，子宫壁厚度增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组大鼠子宫组织结构较清晰，黏膜上皮完整、光滑，子宫壁变薄，子宫壁厚度降低 ($P<0.01$)；与知母总皂苷+空载组比较，知母总皂苷+RFRP-3 敲低组大鼠子宫壁厚度增加 ($P<0.01$)。见图 5。

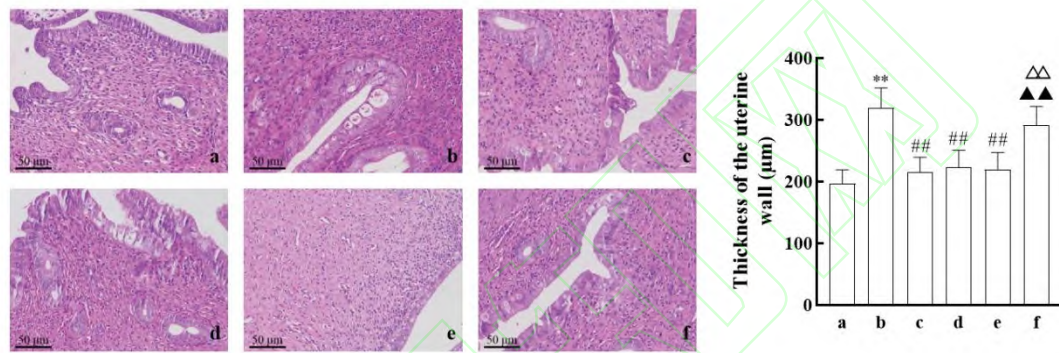


图 5 各组大鼠子宫形态学变化 (HE 染色 $\times 200$)

Fig. 5 Morphologic changes in the uterus of rats in each group (HE staining $\times 200$)

a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ^{**} $P<0.01$ vs Control group; ^{##} $P<0.01$ vs Model group; ^{△△} $P<0.01$ vs Total timosaponin group; ^{▲▲} $P<0.01$ vs Total timosaponin+empty load group.

2.5 知母总皂苷对大鼠血清 LH、FSH、E₂ 水平的影响 通过比较发现各组 LH、FSH、E₂ 水平差异显著 ($F=72.582, 109.489, 58.649$, 均 $P<0.001$)；模型组 LH、FSH、E₂ 水平较对照组升高 (均 $P<0.01$)；RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组上述指标低于模型组 (均 $P<0.01$)；知母总皂苷+RFRP-3 敲低组上述指标高于知母总皂苷+空载组 (均 $P<0.01$)。见图 6。

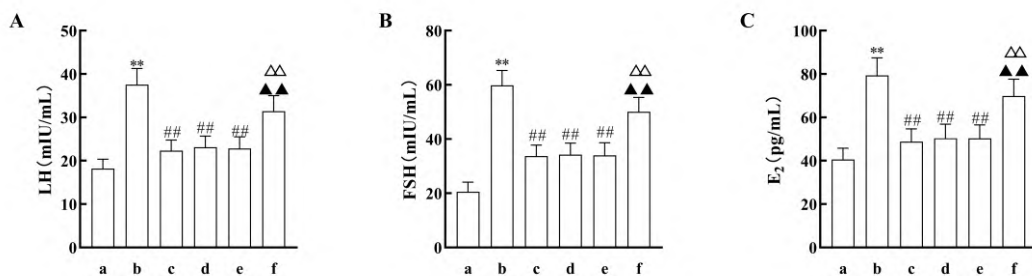


图 6 各组大鼠血清 LH、FSH、E₂ 水平比较 (n=12)

Fig. 6 Comparison of serum LH, FSH, and E₂ levels of rats in each group (n=12)

A: Comparison of serum LH levels in each group; B: Comparison of serum FSH levels in each group; C: Comparison of serum E₂ levels in each group; a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ***P*<0.01 vs Control group; ##*P*<0.01 vs Model group; $\Delta\Delta$ *P*<0.01 vs Total timosaponin group; $\blacktriangle\blacktriangle$ *P*<0.01 vs Total timosaponin+empty load group.

2.6 知母总皂苷对大鼠下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54、RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达的影响 通过比较发现各组 GnRH、KISS-1、GPR54、RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达水平差异显著 ($F=295.176, 269.783, 205.945, 84.561, 189.151$, 均 $P<0.001$); 模型组 GnRH、KISS-1、GPR54 的 mRNA 表达高于对照组, RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达低于对照组 (均 $P<0.01$); 与模型组比较, RFRP-3 上调组、知母总皂苷组和知母总皂苷+空载组大鼠下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54 的 mRNA 表达水平降低, RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达水平升高 (均 $P<0.01$); 与知母总皂苷+空载组比较, 知母总皂苷+RFRP-3 敲低组大鼠下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54 的 mRNA 表达水平升高, RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达水平降低 (均 $P<0.01$)。见图 7。

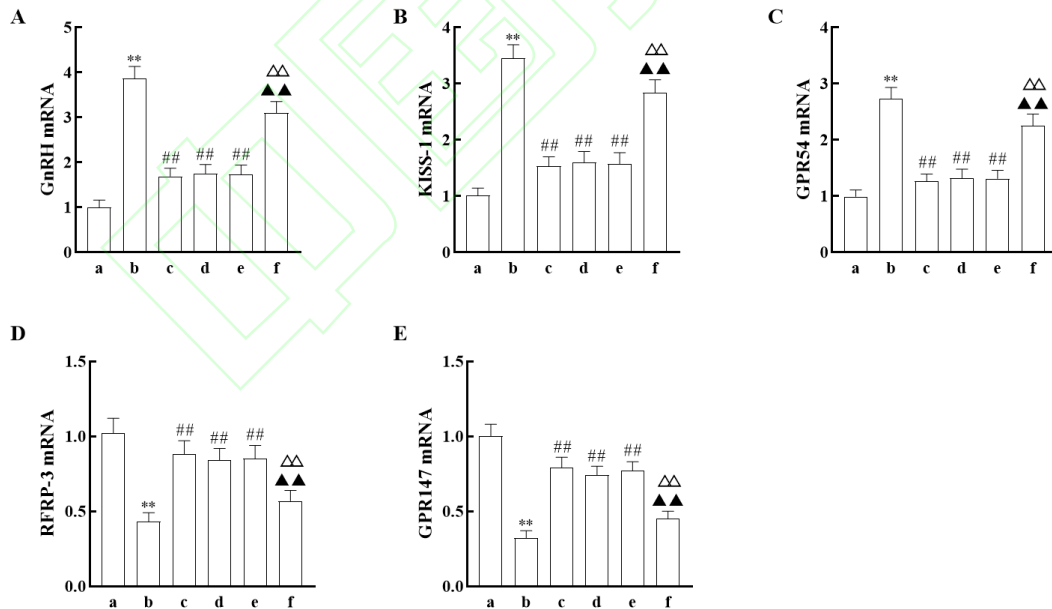


图 7 各组大鼠下丘脑 GnRH、KISS-1、GPR54、RFRP-3、GPR147 的 mRNA 表达比较 (n=12)

Fig. 7 Comparison of mRNA expression of GnRH, KISS-1, GPR54, RFRP-3, and GPR147 in the hypothalamus of rats in each group (n=12)

A: Comparison of GnRH mRNA expression in hypothalamus of rats in each group; B: Comparison of KISS-1

mRNA expression in hypothalamus of rats in each group; C: Comparison of GPR54 mRNA expression in hypothalamus of rats in each group; D: Comparison of RFRP-3 mRNA expression in hypothalamus of rats in each group; E: Comparison of GPR147 mRNA expression in hypothalamus of rats in each group; a: Control group; b: Model group; c: RFRP-3 up-regulated group; d: Total timosaponin group; e: Total timosaponin+empty load group; f: Total timosaponin+RFRP-3 knockdown group; ** $P<0.01$ vs Control group; ## $P<0.01$ vs Model group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Total timosaponin group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Total timosaponin+empty load group.

3 讨论

中医认为, CPP 的病因多与肾阴虚相火旺有关, 即身体内分泌调节系统提前发动和功能亢进^[12], 这一观点与现代医学中下丘脑-垂体-性腺轴提前激活的机制存在共通之处。因此, 中医治疗 CPP 多采用滋肾泻相火的草药方剂, 如生地、黄柏、知母、丹皮等, 通过调节内分泌系统, 抑制性器官过早发育, 从而达到治疗目的。与西药相比, 中药副作用相对较小, 安全性更高, 更适用于生长发育期儿童。知母, 性味苦、寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热泻火、滋阴润燥之效, 其药理作用与中医对 CPP 病因的认识相契合, 清热泻火可调和体内过旺火气, 滋阴润燥则能滋养肾阴, 从而缓解性早熟相关症状。有资料显示, 知母是治疗 CPP 方剂(如知柏地黄丸^[13]、九味楮实方^[14]等)中的高频药^[4]。知母总皂苷是来源于知母根茎中的一种重要化学成分, 富含多种甾体皂苷, 已被证实可抑制下丘脑-垂体-性腺轴的提前激活, 降低 CPP 大鼠性激素(LH、FSH、 E_2)水平^[5]。在本研究中, 知母总皂苷可降低 CPP 模型大鼠卵巢指数、子宫指数、卵巢黄体数目和子宫壁厚度以及血清 LH、FSH、 E_2 水平, 延迟阴门开启日龄和首个动情间期时间, 这与既往的研究结果^[5]一致, 再次证实知母总皂苷可缓解 CPP 模型大鼠性早熟发展程度。

RFRP-3 也被称为促性腺激素抑制激素, 可通过与其受体 GPR147 结合, 调节 GnRH 合成和分泌, 对生殖系统功能产生负向调控^[15]。KISS-1 基因编码的 kisspeptins 是一种神经肽, 通过与其受体 GPR54 结合, 促进 GnRH 的释放来激活下丘脑-垂体-性腺轴^[10]。在青春期发育过程中, RFRP-3/GPR147 和 KISS-1/GPR54 系统通过复杂的相互作用关系, 共同调控 GnRH 释放和下丘脑-垂体-性腺轴激活, 从而确保生殖系统正常发育和功能。研究^[10]报道, 下调下丘脑 KISS-1、GPR54 基因表达, 可抑制性激素 GnRH 的合成与释放, 对 CPP 模型大鼠发挥治疗作用。Dai et al^[8]发现, 在性早熟模型大鼠下丘脑中 RFRP-3 和 GPR147 表达显著下调, RFRP-3/GPR147 对 GnRH 和 kisspeptin 神经元的抑制作用减弱, 促进性早熟雌性大鼠发展。另有研究显示, 通过侧脑室注射 RFRP-3 可以抑制下丘脑 GnRH 和 kisspeptin 神经元的功能来延缓光诱导性早熟的发展^[16]。同样, 本研究发现, CPP 模型大鼠下丘脑 RFRP-3 和 GPR147 的表达降低, KISS1、GPR54、GnRH 的表达升高, 而外源性 RFRP-3 可下调 KISS-1、GPR54、GnRH 的表达, 延缓 CPP 大鼠的性早熟发展, 这与既往研究^[8,16]结果一致, 提示 RFRP-3/GPR147 对 GnRH 和 KISS-1 神经元抑制作用的降低有助于缓解 CPP 大鼠性早熟。本研究还发现, 知母总皂苷可上调 CPP 大鼠下丘脑 RFRP-3 和 GPR147 表达, 抑制 KISS-1、

GPR54、GnRH 表达, 与外源性 RFRP-3 的作用一致; 且有研究^[17]显示, 知母皂苷元可能通过抑制 KISS-1/GPR54 信号通路调节下丘脑-垂体-性腺轴对性早熟大鼠发挥治疗作用; 由此推测, 知母总皂苷对 CPP 大鼠性早熟发展程度的延缓作用可能与 RFRP-3/GPR147 信号通路有关。为验证此推测, 本研究采用 RFRP-3 敲低慢病毒注射来下调 CPP 大鼠下丘脑 RFRP-3 表达, 结果显示敲低 RFRP-3 可明显减弱知母总皂苷对 CPP 大鼠性早熟发展程度的延缓作用; 提示知母总皂苷可能通过激活 RFRP-3/GPR147 信号通路, 抑制 GnRH 的释放和下丘脑-垂体-性腺轴的提前激活, 缓解 CPP 模型大鼠性早熟发展程度。

综上所述, 知母总皂苷对 CPP 大鼠性早熟发展程度的延缓作用可能是通过激活 RFRP-3/GPR147 信号通路, 抑制 GnRH 的释放和下丘脑-垂体-性腺轴的提前激活实现的。本研究进一步明确了知母总皂苷治疗 CPP 的作用机制, 为知母应用于 CPP 的治疗提供了理论依据。但本研究只初步分析了知母总皂苷对 NMA 诱导的 CPP 大鼠 RFRP-3/GPR147 信号通路的影响, 目前尚不清楚这些影响是否会在其他动物模型或人类中观察到。在未来的研究中, 课题组将应用其他不同的 CPP 模型, 深入探索知母总皂苷对 RFRP-3/GPR147 信号通路的调控机制。

参考文献

- [1] Zevin E L, Eugster E A. Central precocious puberty: a review of diagnosis, treatment, and outcomes[J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 2023, 7(12): 886-96. doi:10.1016/S2352-4642(23)00237-7.
- [2] Prosperi S, Chiarelli F. Early and precocious puberty during the COVID-19 pandemic[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1107911. doi:10.3389/fendo.2022.1107911.
- [3] De Sanctis V, Soliman A T, Di Maio S, et al. Long-term effects and significant Adverse Drug Reactions (ADRs) associated with the use of Gonadotropin-Releasing Hormone analogs (GnRHa) for central precocious puberty: a brief review of literature[J]. *Acta Biomed*, 2019, 90(3): 345-59. doi:10.23750/abm.v90i3.8736.
- [4] 刘小琪, 王君, 王琨蒂, 等. 基于中医传承计算平台探讨中枢性性早熟中医诊治规律[J]. *中医药导报*, 2024, 30(4): 134-9, 144. doi:10.13862/j.cn43-1446/r.2024.04.025.
- Liu X Q, Wang J, Wang K D, et al. Analysis on the traditional chinese medicine diagnosis and treatment rules of central precocious puberty based on the traditional Chinese medicine inheritance computing platform system[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol*, 2024, 30(4): 134-9, 144. doi:10.13862/j.cn43-1446/r.2024.04.025.
- [5] 高静, 王彦红, 许邦礼. 知母总皂苷对雌性性早熟 SD 大鼠性激素水平的影响及对 HPGA 轴的作用研究[J]. *天津中医药*, 2022, 39(1): 110-5. doi:10.11656/j.issn.1672-1519.2022.01.25.
- Gao J, Wang Y H, Xu B L. Effects of anemarrhena total saponins on sex hormone levels in female SD rats with precocious puberty and its effects on HPGA axis[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2022, 39(1): 110-5. doi:10.11656/j.issn.1672-1519.2022.01.25.

[6] Singh P, Anjum S, Srivastava R K, et al. Central and peripheral neuropeptide RFRP-3: a bridge linking reproduction, nutrition, and stress response[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2022, 65: 100979. doi:10.1016/j.yfrne.2022.100979.

[7] Losa-Ward S M, Todd K L, McCaffrey K A, et al. Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(2): 28. doi:10.1095/biolreprod.112.100826.

[8] Dai X, He Y, Li S, et al. Modulating the RFamide-related peptide-3/G protein-coupled receptor 147 signaling pathway with nourishing Yin-removing fire herbal mixture to alleviate precocious puberty in female rats: an experimental study[J]. *Int J Reprod Biomed*, 2024, 22(1): 31-42. doi:10.18502/ijrm.v22i1.15240.

[9] 谢琳琳, 廖俊, 尚影, 等. 知母总皂苷通过花生四烯酸代谢改善丙酸睾酮诱导的大鼠前列腺增生[J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(9): 900-9. doi:10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2020.0244.

Xie L L, Liao J, Shang Y, et al. Saponins extract of *Anemarrhenae Rhizoma* ameliorates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats via through arachidonic acid metabolism pathways[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2021, 38(9): 900-9. doi:10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2020.0244.

[10] 黄田田, 刘建忠, 张雪荣. 九味楮实方对中枢性早熟模型大鼠的治疗作用及机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(12): 2833-6. doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.12.05.

Huang T T, Liu J Z, Zhang X R. Effect and mechanism of Jiuweizhongshi decoction on central precocious puberty model rats[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(12): 2833-6. doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.12.05.

[11] 潘建秋, 刘付穗, 吴曼莉, 等. 外源性 RFRP-3 和 MLT 对雄鼠初情期生长及繁殖性能的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(7): 2622-30. doi:10.16431/j.cnki.1671-7236.2022.07.020.

Pan J Q, Liu F S, Wu M L, et al. Effects of exogenous MLT and RFRP-3 on growth and reproductive performance of male mice at the puberty[J]. *China Anim Husband Vet Med*, 2022, 49(7): 2622-30. doi:10.16431/j.cnki.1671-7236.2022.07.020.

[12] 陈波, 甘霞, 刘青. 丹栀逍遥散加味联合生活方式干预治疗女童中枢性早熟阴虚火旺证 37 例临床观察[J]. *中医儿科杂志*, 2024, 20(4): 67-70. doi:10.16840/j.issn1673-4297.2024.04.17.

Chen B, Gan X, Liu Q. Clinical observation on the treatment of 37 cases of central precocious puberty of girls with Yin deficiency and fire excess syndrome by modified Danzhi Xiaoyao powder combined with lifestyle intervention[J]. *J Pediatr Tradit Chin Med*, 2024, 20(4): 67-70. doi:10.16840/j.issn1673-4297.2024.04.17.

[13] 杨春华, 赵天兰, 任盛, 等. 知柏地黄丸对性早熟女童身高、骨龄及下丘脑-垂体-性腺轴的调节效应

分析[J]. 中国性科学, 2023, 32(6): 113-6. doi:10.3969/j.issn.1672-1993.2023.06.027.

Yang C H, Zhao T L, Ren S, et al. Analysis of the regulatory effects of Zhibai Dihuang Pill on height, bone age and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in girls with precocious puberty[J]. Chin J Hum Sex, 2023, 32(6): 113-6. doi:10.3969/j.issn.1672-1993.2023.06.027.

[14] 冯曼琳, 林连美, 刘建忠. 九味楮实颗粒对雌性中枢性性早熟大鼠甲状腺激素水平及甲状腺组织形态的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2024, 26(3): 5-9. doi:10.3969/j.issn.1008-987x.2024.03.01.

Feng M L, Lin L M, Liu J Z. Effect of Jiuwei Chushi Granules on thyroid hormone level and thyroid tissue morphology in female central precocious puberty rats[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2024, 26(3): 5-9. doi:10.3969/j.issn.1008-987x.2024.03.01.

[15] Guo X, Dai T, Wei S, et al. Rfamamide-related peptide-3(*RFRP-3*) receptor gene is expressed in mouse ovarian granulosa cells: potential role of *RFRP-3* in steroidogenesis and apoptosis[J]. Steroids, 2024, 202: 109349. doi:10.1016/j.steroids.2023.109349.

[16] Sun Y, Xue Y, Sun W, et al. Effect of nourishing and purging fire Chinese herbal mixture on delaying light-induced premature puberty in rats[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 44(1): 95-102. doi:10.19852/j.cnki.jtcm.20230814.001.

[17] 车玲, 侯彬兰, 陈磊, 等. 知母皂苷元对性早熟大鼠下丘脑 Kiss-1 和 GPR54 mRNA 表达的影响[J]. 中国性科学, 2022, 31(2): 126-9. doi:10.3969/j.issn.1672-1993.2022.02.032.

Che L, Hou B L, Chen L, et al. Effects of anemarrhenae saponin on the expression of Kiss-1 and GPR54 mRNA in hypothalamus of rats with precocious puberty[J]. Chin J Hum Sex, 2022, 31(2): 126-9. doi:10.3969/j.issn.1672-1993.2022.02.032.