Lecture 15: Cell Communication II: Endocrine and Reproduction

10801040 莊博恩、10801128 陳俊鴻

1. Brief Intro
2. HPT axis (hypothalamic-pituitary-thyroid axis)

HPT axis是負責調節新陳代謝的機制，涉及了hypothalamus, anterior pituitary, and thyroid之間的內分泌調控。Hypothalamus在感知到T3 (Triiodothyronine)和T4 (Thyroxine)不足時，會在hypothalamus的capillary bed分泌TRH (thyrotropin-releasing hormone)，TRH會透過腦門靜脈輸送到並刺激anterior pituitary分泌TSH (thyroid stimulating hormone)，TSH再刺激thyroid分泌thyroid hormone，thyroid hormone透過循環系統對hypothalamus和pituitary進行負回饋調控，避免TRH和TSH過多的分泌。

T3和T4會促進身體各處的細胞進行氧化作用及促進新陳代謝率，也會加速心搏速率與心搏輸出量；在胚胎發育過程中，更會促進骨骼、神經的發育與生長（包括synapses和myelin的行程）。

1. HPA axis (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

HPA axis是負責調節壓力反應與許多其他身體反應的機制，涉及了hypothalamus, anterior pituitary, and adrenal gland之間的內分泌調控。Adrenal gland分為medulla和cortex，medulla受交感神經的神經訊號調控，主要分泌adrenaline和norepinephrine應付短期壓力；cortex，由動脈往靜脈方向，則分成小球狀層(*zona glomerulosa*)、束狀層(*zona fasciculata*)和網狀層(*zona reticularis*)，其中小球狀層受RAAS system調控分泌aldosterone以促進distal tubule和collecting duct的水分與鈉離子吸收，束狀層則是在hypothalamus分泌CRH (corticotropin-releasing hormone)並刺激anterior pituitary分泌ACTH (adrenocorticotropic hormone)後受到刺激並分泌cortisol以促進糖值新生、抑制發炎反應並應付長期壓力，網狀層則是某種程度上也受到CRH和ACTH調控分泌少量precursor androgens，這些precursor androgens隨後在testicles和ovaries分別被轉化成testosterone和estrogen。

1. HPG axis (hypothalamic-pituitary-gonadal axis)

在HPG axis，我們分為雄性與雌性討論。

男性：

Hypothalamus分泌GnRH (gonadotropin-releasing hormone)到hypothalamus微血管並透過hypophyseal portal system刺激anterior pituitary分泌FSH (follicle-stimulating hormone) 和LH (luteinizing hormone)，FSH和LH再透過循環系統分別刺激睪丸中的Sertoli cells生成精子和Leydig cells分泌testosterone，testosterone會作用於中樞神經系統、刺激骨骼肌生長、維持男性第二性徵、刺激精子的形成、也會對pituitary分泌FSH進行負調控。而精子的形成則會對於hypothalamus分泌GnRH和anterior pituitary分泌FSH進行負調控。

女性：

Hypothalamus分泌GnRH並刺激anterior pituitary分泌FSH和LH，FSH會刺激granulosa型態改變為立方皮膜，此時unilaminar primary follicle因此形成並在之後轉變為multilaminar primary follicle。Multilaminar primary follicle的granulosa會不斷分泌玻尿酸，加上組織亦不斷滲入，follicle形成antrum並成為secondary follicle。在secondary follicle 中，granulosa會將初級卵母細胞拱向antrum並出現cumulus oophorus。當初級卵母細胞完成meiosis第一階段並形成次級卵母細胞，follicle正式成為Graafian follicle準備在LH surge時進行排卵。在這些過程中theca的LH receptor被活化後會將cholesterol轉變為testosterone，testosterone轉移給granulosa，而在granulosa的FSH receptor被活化後會使testosterone透過aromatase形成estrogen。形成的estrogen會不斷刺激granulosa促進follicle的成長，卻會抑制anterior pituitary對GnRH的敏感度和hypothalamus分泌GnRH。FSH和estrogen會誘使每個follicle的granulosa 產生FSH receptor以提升其敏感度，而在最優勢的follicle成為Graafian follicle後FSH和estrogen則會刺激他產生LH receptor已為排卵做準備。

在排卵後，原先的follicle會形成*corpus luteum*，其中granulosa大量分泌progesterone (也會抑制GnRH和促性腺素分泌) 和少量estrogen以抑制子宮平滑肌收縮及促進子宮內膜增生為胚胞著床做準備。若胚胞沒著床，corpus luteum會逐漸退化萎縮，estrogen和progesterone的分泌會因此逐漸減少，於是子宮內膜無法繼續維持而剝落並出血，也就是menstruation，而新的週期也將重新開始。若胚胞著床，胚胎外層會形成一層chorion，並分泌HCG (human chorionic gonadotropin) 以維持子宮內膜的增生。

1. Q&A

問題一：

為何hypothalamus在anterior and posterior pituitary要空間上錯開地分別進行調控及分泌？刻意錯開對這兩個機制有什麼好處嗎？

解答一：

要回答這個問題，我首先給了幾種可能性。

1. 可能這兩種內分泌在演化上有著明顯的先後關係，他們只是剛好同時出現在hypothalamus和pituitary。
2. 可能hypothalamus的內分泌神經元在hypothalamus分泌的hormone和在posterior pituitary分泌的hormone會產生交互作用。
3. 可能hypothalamus的內分泌神經元在posterior pituitary分泌的hormone會與anterior pituitary的receptor產生交互作用。
4. 可能hypothalamus-anterior pituitary的調控機制有特殊的意義。

基於這幾個假設，我決定先確認這兩種內分泌的血管走向來判斷這些假設成立與否。由Figure 1. ，我們可以看見經過hypothalamus的capillary bed接著hypophyseal portal vein，隨後再到anterior pituitary的capillary bed，最後經由efferent veins to cavernous sinus，經過這個途徑的hormone主要有GnRH, TRH, CRH, SST, GHRH, PIH，通常功用是刺激pituitary分泌其他刺激素；而另一個途徑則是inferior hypophyseal artery到posterior pituitary的capillary bed再接到efferent veins to cavernous sinus，經由這個途徑的hormone則有由hypothalamus內分泌神經元分泌的OT, ADH。

A close up of a map

Description automatically generatedFigure 1. Vascular supply to the hypothalamus and the pituitary [1]

這樣的結果讓我們知道方才的(2)假說是不成立的，因為如果hormone in anterior and posterior pituitary會產生交互作用，那照理來說他們在離開pituitary都是直接前往cavernous sinus，即使在pituitary走不同的血管途徑也還是會相遇，如果有交互作用便會在cavernous sinus 發生。顯然這是不可能的，因此我們更著重於(1), (3), (4)此三假說。

接著，我再確認了hypophyseal portal system在演化上是否與pituitary同時出現，但結果是在大多bony fish體內有，但在hagfish與teleost雖然有adenohypophysis (anterior lobe of pituitary) 卻缺乏hypophyseal portal system，其中teleost是透過axon延伸至adenohypophysis分泌激素，而hagfish甚至是在hypothalamus分泌並透過diffusion到adenohypophysis。[2] 但這並不能作為pituitary比hypophyseal portal system早被演化的證據，因為我們可以從Figure 2. 的演化樹看到，teleost並非bony fish最早分支的族群，許多比他早分之的族群也都還是具有portal system，因此teleost和hagfish的缺乏portal system應該是在演化過程中逐漸消失的案例。

A screenshot of a cell phone

Description automatically generatedFigure 2. Evolutionary tree of vertebrate [3]

事實上，primitive median eminence在出現之初就已經出現了一些微血管，在軟骨魚的median eminence和portal system更是有很好地分化了。因此，hypophyseal portal system比我們原先假設得更原始。 [4]

接著，我們將討論oxytocin(OT)- and vasopressin(VP)-secreting neuron在演化上的過程。在*Amphioxus*中，neurosecretory cell bodies出現在ependymal cells中並將他們的axons穿過ventricle的內壁以將OT和VP分泌到CSF中，讓這些分泌物利用diffusion傳遞到標的細胞。在魚類中，細胞將dendrites伸到ventricle中，而axon則是以大約90度角的方向遠離ventricle。此外，在*Anamnia*中dendrites不只能分泌neuropeptides到ventricle，也能透過cilia偵測CSF。在mammals中，OT fibres非常接近third ventricle，甚至出現在ependymal cells之中與CSF直接相接觸，見Figure 3. 。 [5]

A close up of a map

Description automatically generated

Figure 3. Location of neurosecretory cell along evolution

A screenshot of a cell phone

Description automatically generated顯然假說(3)不合理，因為從neurosecretory cell和portal system的出現就是在不同位置，一個是在ependymal cell存在的ventricle附近，另一個則是分化於median eminence，兩者位置的差距可以由Figure 4. 看出。

Figure 4. Distribution of ependymal cells [1]

綜上所述，假說(1), (4)才是最符合事實的假說。

問題二：

在人類身體激素中，許多激素的濃度都會以一個固定的時間為週期循環，例如FSH和LH以一個月為週期循環，睪固酮以一天為週期循環…然而在查詢了資料後，我發現有一大部分的激素濃度都會以一天(24小時)為單位循環(例如：cortisol, dehydropiandrosterone (DHEA), leptin,等)，也就是不同天的同一時段，同一種激素的濃度是差不多的，每種激素都應該有對應調控其濃度的機制(例如：FSH和LH是藉由濾泡產生的黃體素和動情素負回饋與正回饋調控，因此以一個月循環)，那是什麼機制調控這些以24hr為週期循環的激素，能讓不同的激素卻以完全相同的時間為週期循環？

解答二：

首先，我推測控管這些激素的機制可能為

1. 調控的機制彼此獨立，獨自偵測環境或身體內的變化各自控制不同激素
2. 調控的機制隸屬於同一個機制，由某一個激素偵測環境或身體的變化，這個激素再調控這些以24小時為週期的激素

我認為這些激素應該隸屬於同一個調控機制，因為若調控機制彼此獨立，身體就要想辦法在這些不同激素的週期有誤差時逐一修正(將週期修正為24小時)，相當麻煩，且既然週期完全相同，若由一個激素負責偵測，再將訊息傳遞下去來調控各激素，這些不同激素的反應應該也會比較一致，故我推測可能機制為：

**這些激素統一由一種上游激素α調控，當激素α活化時，使這些激素跟著被調控，而α本身的活化即為24小時一個循環，也就使得這些激素也是以24小時為週期循環**

後來我查到了在SCN(視交叉上核)上具有circadian clock，在一個實驗中，將小鼠SCN切除，發現sleep-wake cycle的circadian rhythmicity(晝夜節律)被破壞，而將fetal SCN重新植入後，即使小鼠恢復了rhythmicity，說明SCN具有調控circadian rhythmicity的功能，後來進一步證明了許多以一天為週期的激素是受SCN作用的(SCN傳達timing signals給激素)，印證了上述推測，原文如下：

Ablation of the SCN abolishes circadian rhythmicity of the sleep-wake cycle whereas transplantation of fetal SCN can restore overt behavioral rhythmicity in constant environmental conditions (Ralph and others 1990), thus demonstrating the primary function of the SCN in creating internal rhythmicity. Like a conductor, the SCN clock beats time and conveys timing signals throughout the body. Circadian rhythms in the whole organism are therefore coordinated in synchrony by the SCN

接下來的問題為：為什麼SCN能精準控制其他激素的週期為24小時？又SCN是怎麼將訊號傳到身體其他組織？

我認為能控制週期為24小時的原因可能為：

1. SCN隨環境變化(溫度、光線等)而被活化或抑制(例如：環境中有光線時，SCN具有活性，無光線時，SCN活性消失)，因為光線和溫度的環境變化基本上是以一天為週期，故SCN的活性變化也是以一天為週期
2. 從SCN被活化開始，需要剛好24小時才會完成反應(不多也不少)，完成反應後又馬上接著接受刺激，繼續開始新的週期

我查到了一系列的調控機制

Circadian oscillations rely on feedback loops in which two PAS domain helix-loop-helix proteins, CLOCK and BMAL1, can dimerize and then activate the transcription of three Period (Per1-3) and two Cryptochrome (Cry1-2) genes via E-Box sequences in their promoter (Fig. 2). PER-CRY dimers can translocate to the nucleus and interfere negatively with CLOCK/BMAL1-dependent transcription. CRYs impair phosphorylation of CLOCK/BMAL1, reducing transcriptional activity of this dimer. Transcription of nuclear orphan receptor genes, such as Rev-erbα, Rev-erbβ, Rorα, and Rorβ is activated by CLOCK/BMAL1 dimers and produces REV-ERBs and RORs with negative and positive regulatory effects on Bmal1 transcription, respectively. DEC1 and DEC2 are other circadian components capable in the SCN of reducing E-box– mediated transcription.

簡單的說，CLOCK 和 BMAL1蛋白可以結合並引發Per1-3和Cry1-2基因的轉錄(透過E-Box sequences(promoter))，轉錄轉譯出來的Per和Cry可以結合(PER-CRY dimers)並啟動負回饋，抑制由CLOCK和BMAL1引發的基因轉錄。

A picture containing clock

Description automatically generated另外CLOCK 和 BMAL1蛋白也會引發Rev-erbα, Rev-erbβ, Rorα, and Rorβ基因的表現，表現產物REV-ERBs and RORs對Bmal1具有正負調控作用。

另外DEC1和DEC2會抑制E-box mediated(CK和BM引發的那條)的transcription

上述這些基因(CLOCK、BMAL1等)即為clock genes，而它們彼此間正負回饋調控作用形成的cycle (autoregulatory cycle)即造成了circadian oscillations，而這個cycle一輪的時長即恰為24小時，這就是為什麼SCN能精準計算24小時的原因(因為分子cycle反應一輪即恰需要24小時)，原文如下：

This main clock is composed of a molecular machinery in which the expression of several clock genes, and their protein products, are forming feedback (positive, Clock and Bmal1; negative, Per, Cry, and Dec) and feedforward (Rev-erbα, β and Ror α, β) loops for the genesis of circadian oscillations. This autoregulatory cycle takes around 24 h.

那訊息是怎麼從SCN傳出去，影響其他激素？

在上述cycle途中會產生Dbp和Avp蛋白，這些蛋白即會以24小時為週期產生並擴散出去(因為這個cycle本身週期即為24小時)，使其他激素偵測到訊號而做出相應週期為24小時的濃度變化反應。原文如下：

Circadian signals from the suprachiasmatic clock are known to be distributed via neuronal outputs and diffusible/ humoral message

Information of these circadian oscillations is thought to be distributed via cyclic expression of output clock genes (Avp, Dbp).

故上述假設應該(2)才是對的

然而，這樣看起來似乎代表SCN不受外界的影響，然而我認為應該不是這樣，因為就受SCN影響的褪黑激素功能來說，褪黑激素應固定在晚上就寢時作用較為適當，故我推測SCN應該至少可以將cycle的起始點調整至與環境同步(就是SCN能偵測外部環境，調整cycle起始點，使cycle對褪黑激素的調控能剛好在夜間時使褪黑激素達到高峰)

後來找到確實如此，在視網膜神經節細胞具有色素可以偵測光線，一偵測到光線就把訊號傳達到SCN上，經過一連串的反應，最後把Per genes的promoter打開，用這個方法調整cycle使其和環境能同步。原文如下：

Solar light signals are the most powerful synchronizer of the SCN clock (Fig. 5). Photic information from the environment is detected by a subset of retinal ganglion cells expressing a specific photopigment, melanopsin (Fig. 1). These photosensitive ganglion cells project to the SCN directly via the retinohypothalamic tract and indirectly via a thalamic relay structure, the intergeniculate leaflet (Meijer and Schwartz 2003).

Retinal illumination leads to glutamate release from retinohypothalamic terminals, activation of N-methyl-Daspartate receptor and Ca2+ influx in ventral cells of the SCN. Then phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) and its binding to cAMP response element (CRE) present on the promoters of target genes, including Per genes (Reppert and Weaver 2002; Fig. 3).

另外，我也搜尋到了一個發現，上述clock genes不僅僅能在SCN中表現，也會在其他組織中表現，例如：retina and olfactory bulbs，它們就像SCN一樣，有上述的selfsustained oscillations，也可以將 rhythmic messages散布到其他區域，會和SCN一樣被稱為primary clocks

而至於其他能表現 clock genes的腦區則會被認為是secondary clocks，因為它們只能在被SCN誘導的時候才會有反應，進而產生rhythmicity，且這個rhythmicity不是robust，在體外只能維持幾個cycles而已。原文如下：

Several, but not all, brain areas outside the SCN express clock genes. This observation, however, does not imply that these cerebral regions harbor endogenous clocks. At least two structures outside the SCN, the retina and olfactory bulbs (Tosini and Menaker 1996; Herzog 2007), fulfill the criteria for endogenous “primary” clocks, including elaboration of selfsustained oscillations and distribution of rhythmic messages to other structures. Other brain areas can be damped circadian oscillators that express rhythmically the core clock genes identified as necessary for circadian rhythms generation, some of them even showing rhythmicity for a few days when isolated in vitro (Abe and others 2002). Because their rhythmicity in vivo is either triggered by inputs (in particular, from the SCN) or not robust (i.e., it cannot be maintained for more than few cycles in vitro), these structures will be called “secondary clocks” below.

那為什麼要有secondary clocks的存在？primary clocks不是已經把激素控制得很好了嗎？

我推測secondary clocks應是用來協助primary clocks將時間訊息傳得更廣更遠，因為SCN、retina、olfactory bulbs只佔了大腦一小部分，很可能訊息沒辦法擴散的很全面，故需要其他腦區有一個較小的clocks來協助放大primary clocks的訊息，但經過查詢後，發現並非如此：

Although the SCN is important for keeping circadian time, it seems that the extra-SCN clocks are individual watches that could be reset periodically, eventually without gating (i.e., without specific temporal windows of sensitivity to synchronizers). We propose that outside-SCN brain clocks are useful for timing behavioral and physiological tasks to underlie specific activities during the 24 h, such as sleep, vigilance, learning, motivation, vision, or olfaction. Depending on the strength of their coupling to the SCN clock, some of the extra-SCN cerebral clocks may also simply fine-tune timing of rhythms controlled by the SCN.

secondary clocks在功能上大致和primary clocks差不多(提供時間訊息)，但仍和SCN有出入，在circadian components和synchronizing properties皆有差異(見下段)，目前認為extra-SCN clocks相較於SCN是individual的，針對於特定行為和生理活動(例如睡眠、警覺、學習)有特殊的功能，以及可以修改SCN產生的rhythms(我認為這很合理，SCN產生的rhythms本來就不太可能永遠固定適用於所有生理活動及狀況，secondary clocks剛好讓這些rhythms變得flexible，能夠因應一些特定的情況)

因為secondary clocks和primary clocks表現的clock genes不完全相同，故產生的feedback loops當然也會有差異，例如：在一些forebrain regions中Clock沒有表現，而是藉由另一個基因Npas2(功能和Clock很像)，作為clock component；在有些forebrain regions中，Clock和Npas2又會一起表現。又例如除了basal forebrain，Vasopressin只會在SCN, paraventricular and supraoptic nuclei中表現，在其他secondary clocks的腦區皆不會表現。不同區域的secondary clocks的clock genes不盡相同，調控也因此有差異，大致上如下圖所示。

A picture containing clock, table

Description automatically generated

而這些secondary clocks會互相coupled，也會和SCN master clock coupled，共同形成circadian network來調控生物體平時或位於特定狀況時，激素及行為的時間變化。原文如下：

Not all of these clocks use the same clock components to tick. Brain clocks are coupled with each other (blue arrows) and with the SCN master clock, forming a circadian network to maintain an oscillatory synchrony in the whole organism.

總結：生物具有circadian clock，能偵測環境並表現clock genes來形成circadian rhythmicity，進而調控身體數種激素的週期，而circadian clock又分為primary clocks及secondary clocks，primary clocks為明確的24小時一個cycle，為形成circadian rhythmicity的主要調控因素，secondary clocks則能稍微修改circadian rhythmicity，可以讓rhythmicity變得flexible，以因應特定行為和生理活動，兩者結合使得生物體能受到規律同時又不乏彈性的調控。

Reference

[1] Netter's Atlas of Neuroscience. 2016. David L. Felten, M. Kerry O' Banion and Mary Summo Maida. ISBN: 9780323265119. Chapter 7.

[2] Vertebrate Endocrinology. 1980. David O. Norris. ISBN: 9780123948151. Chapter 5.

[3] doi: 10.1111/dgd.12348

[4] doi: 10.1080/11250008009438710

[5] doi: 10.3389/fnbeh.2014.00031