

荧光定量 RCR 检测比格犬雌激素 β 受体 mRNA 在间情期与发情期表达量的差异

钟睿^{1,2}, 甘艺^{2,3}, 任秀梅², 许琴², 赵彦斌², 刘冰², 孙兆增²,
朱宇旌¹, 栾新红¹, 胡仲明², 张勇¹, 曾林²

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

【摘要】目的 对比格犬发情期与间情期 *ER β* 基因在性腺组织器官的变化状况进行荧光定量, 明确 *ER β* 基因在发情期与间情期下丘脑-垂体-性腺轴上的表达量差异情况, 为深入研究比格犬发情机制提供基础。**方法** 作为调控生殖的关键基因, *ER β* 基因位于比格犬下丘脑-垂体-性腺轴上, 因此分别取处于发情期和间情期的比格犬, 提取下丘脑、垂体、卵巢和子宫的 RNA, 反转录后对 *ER β* 基因 mRNA 的表达量进行荧光定量 PCR 检测。**结果** 间情期比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑内 *ER β* 基因 mRNA 的表达量分别是发情期比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑内 *ER β* 基因 mRNA 表达量的 0.35 倍、0.17 倍、0.44 倍、0.43 倍。**结论** *ER β* 基因在处于发情期的比格犬下丘脑-垂体-性腺轴内表达量均上调。

【关键词】 *ER β* 基因; 发情期; 间情期; 比格犬

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0015-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.004

The expression difference between estrus and non-estrus of *ER β* mRNA of beagles by real-time quantitative PCR

ZHONG Rui^{1,2}, GAN Yi^{2,3}, REN Xiu-mei², XU Qin², ZHAO Yan-bin², LIU Bing², SUN Zhao-zeng²,
ZHU Yu-jing¹, LUAN Xin-hong¹, HU Zhong-ming², ZHANG Yong¹, ZENG Lin²

(1. College of Veterinary and Animal Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

3. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University,
Heilongjiang Daqing 163319, China)

【Abstract】Objective To quantitative the changing information of estrogen receptor β gene which was in tissue and organ of sex gland during oestrus and dioestrus of Beagles, and to show the different expression situation of hypothalamus-pituitary-gonad axis during oestrus and dioestrus, and providing the basic of theory to research deeply the mechanism of heat of Beagles. **Methods** As the key gene in regulation reproduction, *ER β* gene is located in hypothalamus-pituitary-gonad axis, so using Beagles which was in oestrus and dioestrus, and extract the RNA from hypothalamus, pituitary, ovary and uterus respectively, after reverse transcription we detected the expression of *ER β* gene by

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31372271); 国家自然科学基金资助项目(31172164)。

[作者简介] 钟睿(1987-)女, 硕士生, 专业: 动物营养与饲料科学专业。E-mail: zhongrui1203@126.com。

[通讯作者] 曾林(1965-)男, 博士生导师, 实验动物科学与管理。E-mail: Zenglin1965@126.com; 张勇(1972-)男, 硕士生导师, 分子营养学、饲料生产技术。E-mail: syndzhy@126.com。

real-time quantitative PCR. **Results** The expression of *ERβ* gene mRNA from ovary, uterus, pituitary, hypothalamus of Beagles which was in dioestrus was 0.35 times, 0.17 times, 0.44 times and 0.43 times than the expression of *ERβ* gene mRNA from ovary, uterus, pituitary, hypothalamus of Beagles which was in oestrus. **Conclusion** The expression of *ERβ* gene was up-regulation in hypothalamus-pituitary-ovary axis of Beagles which was in oestrus.

【Key words】 *ERβ* gene; Oestrus; Dioestrus; Beagles

比格犬广泛的应用于各种医学科研,是国内外公认的实验犬^[1]。本实验室对比格犬的生殖生理进行了一定的基础研究^[2]。但近期其种群中出现了不发情、休情期延长等情况,影响了这一种群的繁衍,也影响了实验动物的生产供应。动物发情主要受下丘脑、垂体以及激素调控,而雌激素又在调节过程中起着重要作用,因此研究雌激素在发情周期中的变化情况就显得举足轻重了。发情周期分为发情前期、发情期、发情后期和间情期,然而本实验组旨在探究 *ERβ* 基因在发情周期中的变化情况,并不是要细化各个发情周期,因此将发情周期简化为发情期和间情期,这样也便于对基因进行定量。

雌激素像其他激素一样能够诱导很多生理反应,这些作为调解功能的受体从 1960 年开始就一直受到关注。1986 年雌激素受体被克隆出来^[1],并在小鼠的很多器官系统中发现了其预期中的显型^[2],一时间得出的结论是仅有这一种雌激素存在。然而 1996 年,Jan-Ake Gustafsson^[3]在重要的学术报告会上宣称他的团队已经发现了雌激素的第二种形式,从而最先克隆出来的受体被命名为 *ERα*,第二种受体被命名为 *ERβ*,*ERβ* 基因是在应用大鼠前列腺 cDNA 和 PCR 退火引物探索雄激素受体额外作用的过程中发现的。一直以来,都有人不断的研究 *ERβ* mRNA 在组织中的表达量,但对比格犬的研究相对较少,因此本实验应用实时荧光定量 PCR 技术(QRT-PCR)探究 *ERβ* mRNA 在间情期和发情期比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑内的表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

比格犬 12 只,发情期比格犬和间情期比格犬各 6 只,军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK(军)2002-001】。

1.2 仪器和材料

pEGFP-N1-*ERβ* 重组质粒,由本实验组构建,TRIZOL 购自 Invitrogen 公司,DEPC 购自 Promega 公司,反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 购自 TaKaRa 公司,Real

Time PCR 扩增仪(BIO-RAD iQ[™] 5)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取及 RT-PCR

参照 Trizol 试剂盒方法^[4]提取比格犬下丘脑、垂体、卵巢和子宫中的 RNA,依据反转录试剂盒说明书进行反转录,反应体系为:5 × PrimeScript Buffer 4 uL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 uL, Oligo dT Primer 1 uL, Random 6 mers 1 uL, Total RNA 5 uL, RNase Free H₂O 加至 20 uL。反应条件为:37℃ 30 min; 85℃ 5 s; 4℃ 保存。

1.3.2 合成引物

根据 GenBank 中比格犬的 *ERβ* (XM_861041.2) 和 *β-actin* (AF021873) 基因序列,利用 primer premier 5.0 软件进行引物设计,*ERβ* 基因上下游引物序列分别为:5'-tctcccttagccatccattg-3' 和 5'-gcacccctctttgaacttgg-3', 扩增产物长度为 179 bp; 内参基因 *β-actin* 上下游引物序列分别为:5'-cctgtcttaccacaaatgtttcc-3' 和 5'-gcagcactttatttccctcacac-3', 扩增产物长度为 235 bp, 引物送至上海生物工程有限公司合成。

1.3.3 QRT-PCR

制作标准曲线:以 pEGFP-N1-*ERβ* 为模板,按照十倍浓度梯度稀释 6 个浓度标准,按照预先筛选好的反应条件及反应体系进行扩增。扩增体系:SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 12.5 uL, 上游引物 1 uL, 下游引物 1 uL, cDNA 模板 1 uL, 灭菌蒸馏水加至 25 uL。扩增条件:预变性 95℃ 30 s; 变性 95℃ 5 s, 退火 58℃/63℃ (*β-actin*/*ERβ*) 20 s, 循环 40 次; 熔解曲线为 95℃ 1 min; 55℃ 1 min; 55℃ 循环 133 次(每隔 0.3℃ 采集一次荧光信号), 到 94.6℃, 通过熔解曲线对荧光定量 PCR 产物进行特异性分析^[5]。所有的样品都在反应孔中做 3 次重复。所得数据经 iQ5 自带的软件进行分析整理。

2 结果

2.1 QRT-PCR 结果

标准曲线结果显示 *ERβ* 和内参基因 *β-actin* 关系系数 R² 均大于 0.98, 说明结果具有可信度; 扩增

效率分别为 98.4% 和 100%, 都在 80% ~ 120% 之间, 而且非常接近 1, 扩增效率理想。内参基因 β -actin (A) 和 $ER\beta$ 基因 (B) 的标准曲线如图 1 所示:

此外, $R^2(\beta\text{-actin}) - R^2(ER\beta) < 0.1$, 所以可以通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对目的基因进行相对定量。扩增曲线与熔解曲线表明目的基因及内参基因没有产生非特异性扩增及引物二聚体, 可作分析使用。内参基因 β -actin (A) 和 $ER\beta$ 基因 (B) 的扩增曲线如图 2 所示:

内参基因 β -actin (A) 和 $ER\beta$ 基因 (B) 的熔解曲线如图 3 所示:

2.2 比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑中 $ER\beta$ mRNA 的相对定量结果

运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行定量, 即 ΔCT 目的基因 = CT 目的基因 - CT 内参基因, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ 间情期 $ER\beta$ 基因 - ΔCT 发情期 $ER\beta$ 基因^[6], $ER\beta$ mRNA 表达差别以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。间情期的比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑内 $ER\beta$ 基因 mRNA 的表达量是发情期的比格犬卵巢、子宫、垂体、下丘脑内 $ER\beta$ 基因 mRNA 的表达量的 0.35 倍、0.17 倍、0.44 倍、0.43 倍, 如图 4 所示:

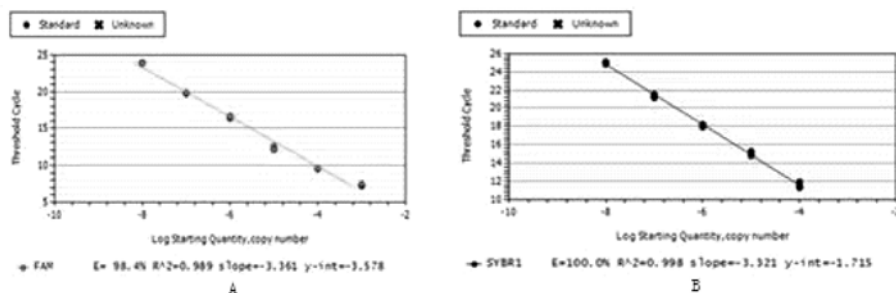


图 1 $ER\beta$ 和 β -actin 基因的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of $ER\beta$ and β -actin gene

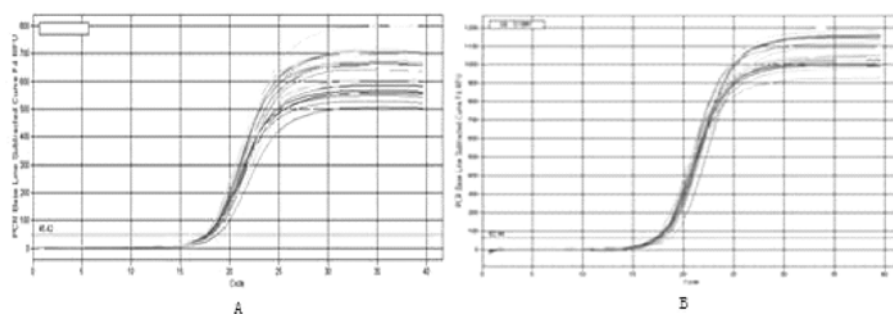


图 2 β -actin 和 $ER\beta$ 基因的扩增曲线

Fig. 2 The amplification curve of β -actin and $ER\beta$ gene

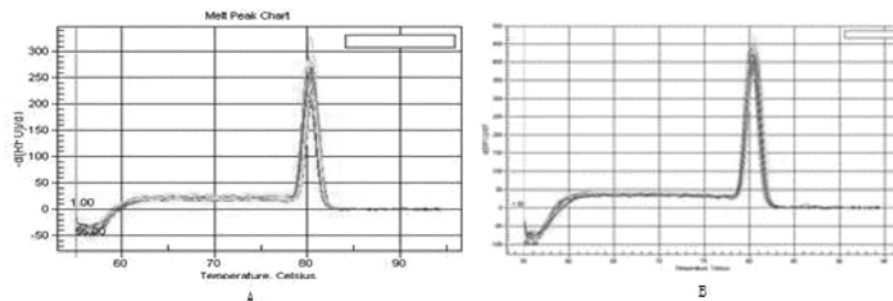
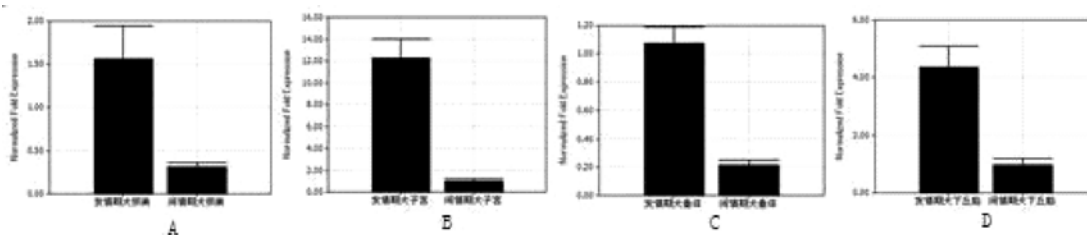


图 3 β -actin 和 $ER\beta$ 基因的熔解曲线

Fig. 3 The dissociation curve of β -actin and $ER\beta$ gene



注:A:卵巢内 ERβmRNA 的定量结果;B:子宫内 ERβmRNA 的定量结果;

C:垂体内 ERβmRNA 的定量结果;D:下丘脑内 ERβmRNA 的定量结果。

图4 发情期与间情期比格犬卵巢、子宫、垂体和下丘脑中 ERβmRNA 的定量分析结果

Note. A: The quantitative result of ovary ERβmRNA; B: The quantitative result of uterus ERβmRNA;

C: The quantitative result of pituitary ERβmRNA; D: The quantitative result of hypothalamus ERβ mRNA.

Fig. 4 The quantitative analysis result of ovary, uterus, pituitary and hypothalamus ERβmRNA in estrus and diestrus

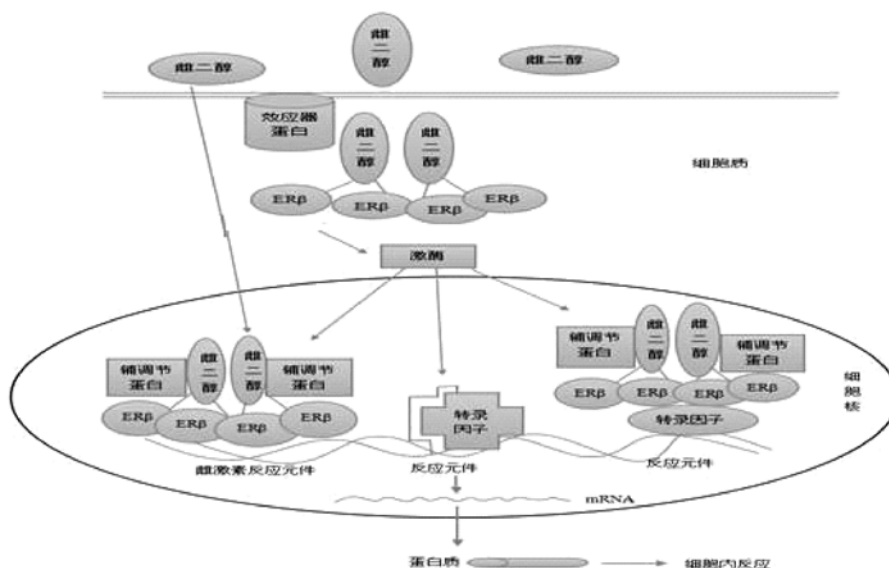


图5 雌激素调控发情的机制

Fig. 5 The mechanism of regulation estrus of estrogen

3 讨论

犬类是一次发情的物种,随着一段单一发情阶段会有几个月性活动不活跃。这些繁殖周期根据下丘脑-垂体-卵巢轴受着内分泌调控。可是,调控雌犬循环往复的发情的确切机制还不清楚。现如今,另一种 ER 子类型,ERβ,从大鼠前列腺被克隆出来;ERβ 蛋白对雌激素有着高亲和性。但是,没有针对犬类组织中 cDNA 序列和 ERβ 的表达的相关资料。ERβmRNA 主要分布在大鼠粒层细胞内,说明 ERβ 可能对粒层细胞增殖起着重要作用。现如今的研究表明 ERβmRNA 水平较之间情期早期在间情期末期有着显著的提高;此外,ERβmRNA 水平与血浆中 E2 水平呈正相关,这可能暗示犬卵巢内的 ERβ 是与卵泡

生长和卵巢反应力相联系的^[7]。雌激素调控发情的机制如图 5 所示:

如图所示,ERβ 既在细胞质内起作用,又在细胞核内起作用,发情期起始雌二醇进入细胞质内与 ERβ 结合形成 E2-ERβ 复合体,E2-ERβ 复合体又与效应器蛋白相结合,引起信号级联,随后激活细胞质内激酶,之后会引起细胞核内 E2-ERβ 复合体与辅表达蛋白结合在雌激素反应元件上起作用,还会直接作用于转录因子,再在反应元件上起作用,也会使结合着辅表达蛋白的 E2-ERβ 复合体与转录因子结合,然后在反应元件上起作用,以这种方式复制的 mRNA 翻译成的蛋白质会引起细胞内一系列反应,反应的结果使得在发情期 ERβ 的含量较间情期增多,也就是本实验的荧光定量所显示的结果。

参考文献:

- [1] 孙兆增, 曾林, 洪宝庆, 等. 乙炔雌酚对间情期比格犬发情的诱导[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11) : 36 - 43.
- [2] 孔德强, 李爱学, 曾林, 等. 一种比格犬雌二醇 β 受体剪切异构体的克隆和序列分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(7) : 44 - 47.
- [3] Greene GL, Gilna P, Waterfield M, *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA[J]. Science, 1986, 231: 1150 - 1154.
- [4] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, *et al.* Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90: 11162 - 11166.
- [5] Kuiper DDJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, *et al.* Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 5925 - 5930.
- [6] 赵彦斌, 孙兆增, 曾林, 等. 黑线仓鼠及其白化突变系 TYR、TYRP1 的基因表达水平比较分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7) : 1 - 4.
- [7] Shingo H, Ryuzo T, Daijiro K, *et al.* Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal[J]. Neuroscience Letters, 2003, 347: 131 - 135.

[修回日期] 2014-10-20