

不同发育期大鼠乳腺组织中 雌激素受体 α 的表达^{*}

王月影^{1,2}, 范光丽¹, 杨国宇², 王艳玲², 张永德¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

[摘要] 为了探讨不同发育时期大鼠乳腺中雌激素受体 α (Estrogen receptor, ER α)的表达情况, 采用RT-PCR方法对不同发育时期大鼠乳腺组织中的ER α 进行了半定量研究。结果表明, 妊娠和泌乳期大鼠乳腺组织中的ER α 表达水平均低于处女期, 且差异显著($P < 0.05$); 整个妊娠过程中, 以妊娠12 d最高; 随着泌乳期的进行, ER α 的表达水平增高, 但差异不显著($P > 0.05$)。表明ER α 可能参与了乳腺细胞的发育和凋亡。

[关键词] 雌激素受体; 大鼠乳腺; RT-PCR法; 大鼠

[中图分类号] Q492.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0053-04

Expression of estrogen receptor α mRNA in rat mammary gland

WANG Yue-ying^{1,2}, FAN Guang-li¹, YANG Guo-yu², WANG Yan-ling², ZHANG Yong-de¹

(1 College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Husbandry and Veterinary Engineering College, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: To study the expression of estrogen receptor α mRNA in rat mammary gland, this article studied the expression of estrogen receptor α mRNA in virgin, pregnancy and lactation rat mammary gland. Forty-two Sprague-Dawley female rats were used, virgin, 6, 12, 18 days of pregnancy, 6, 12, 18 days of lactation separately. In each stage, the number is six. We studied the expression of estrogen receptor α mRNA in mammary gland with half quantity RT-PCR. The results showed that the mRNA levels of estrogen receptor α in mammary gland during pregnancy and lactation period were lower than those during the virgin period and showed significant difference ($P < 0.05$). During the whole pregnancy period, the mRNA level of estrogen receptor α at pregnancy of 12 days is highest. With lactation processed, the mRNA levels of estrogen receptor α increased, but there was no significant difference ($P > 0.05$). Our results suggested that estrogen receptor α was involved in mammary development and involution.

Key words: estrogen receptor; mammary gland; RT-PCR; rat

乳腺发育主要受类固醇和多肽类等激素的调控。成年女性乳腺高度增生发生于月经周期的黄体期, 即雌激素和孕酮水平较高时, 雌激素促进乳腺导管生长, 诱导孕酮受体表达, 孕酮反过来促进腺泡发育。雌激素对靶细胞作用的分子基础是靶细胞内存在一种能与其特异性结合的雌激素受体 (Estrogen

receptor, ER)^[1]。ER 是一类由配基激活的转录因子, 介导大部分已知的雌激素效应, 包括 ER α ^[2] 和 ER β ^[3]。ER 分布于许多组织, 包括中枢神经系统、心血管系统、免疫系统、泌尿生殖道、胃肠道、骨组织、肾脏、肺脏和子宫等。多数学者认为, 雌激素对乳腺的作用部分由 ER α 介导。虽然现已明确雌激素能促

* [收稿日期] 2006-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39470827); 河南省杰出青年基金项目(970203011)

[作者简介] 王月影(1972-), 女, 河南武陟人, 讲师, 在读博士, 主要从事乳腺发育研究。

[通讯作者] 王艳玲(1962-), 女, 河南内黄人, 教授, 博士生导师, 主要从事泌乳生理学研究。

进乳腺导管的发育,但其受体在乳腺发育中的作用还不清楚。为了阐明 ER 在乳腺发育中的作用机制,首先要掌握 ER 在乳腺正常发育过程中的表达规律。为此,本实验用 RT-PCR 方法对不同时期大鼠乳腺中 ER α 的表达进行检测,以期发现大鼠乳腺发育过程中 ER α 的表达规律,探讨其在乳腺发育中的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及分组 42 只雌性处女 SD 大鼠和 18 只雄性 SD 大鼠,均购自河南省实验动物中心,质量 250 g。在 12 h 光照和 12 h 黑暗条件下喂养,环境温度 20~25℃,自由采食和饮水;大鼠颗粒饲料购自河南省实验动物中心。42 只雌性大鼠分处女期组,妊娠 6, 12, 18 d 组和泌乳 6, 12, 18 d 组,每组 6 只。

1.1.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中收录的大鼠 ER α 和 β actin cDNA 序列(登录号分别为 NM 007956 和 AF541940),利用 Primer 5.0 软件设计 2 对 PCR 引物。ER α 的上下游引物序列分别为:上游:5'-GCG GCA TAC GGA AAG ACC-3';下游:5'-ATG GAG CGC CAG ACG AGA-3'。预期扩增片段 430 bp。 β actin 的上下游引物序列分别为:上游:5'-CTC CCT ATG GCT CCT TCA TGC-3';下游:5'-CCC TTC TGG TGC TGC TGC TT-3'。预期扩增片段 520 bp。两对引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.1.3 主要试剂及仪器 DEPC, Sigma 公司产品; TR Izol, Invitrogen 公司产品; AMV 反转录酶, RNase-Inhibitor, Taq DNA 聚合酶, dNTPs, OligdT, DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工有限公司;梯度 PCR 仪,德国 Biometra 产品; 3K30 高速冷冻离心机, Sigma 产品;凝胶成像系统等。

1.2 大鼠乳腺组织的采取

6 只处女组大鼠直接处死,采取乳腺组织。其余 36 只处女大鼠于发情前期与 18 只雄性大鼠同笼饲养(雌雄比为 2:1),同笼后第 2 天开始对雌性大鼠进行阴道检查,发现雌性大鼠阴道栓明显的当天被看作妊娠 0 d,妊娠鼠单个饲养。各妊娠组大鼠分别于妊娠 6, 12 和 18 d 时处死,采取乳腺组织。分娩的当天看作泌乳 0 d,各泌乳组大鼠分别于泌乳 6, 12, 18 d 处死,采取乳腺组织。采取的所有乳腺组织均

放入液氮速冻后,置-80℃冰箱保存待测。

1.3 大鼠乳腺组织 RNA 的提取与质量鉴定

1.3.1 RNA 的提取 核酸提取过程中所用试剂均用 1 g/L DEPC 处理水配制,塑料制品均在 1 g/L DEPC 水中浸泡过夜,高压灭活 DEPC。在锡箔纸上用手术刀切 50~100 mg 组织,放入 1.5 mL 离心管中,加 1 000 μ L TR Izol,立即用解剖剪剪碎,至出现粘丝为止,室温放置 5 min。4 8 000 $\times g$ 离心 5~8 min,用移液枪穿过上层脂肪转移上清至另一离心管中,加入 200 μ L 氯仿,混匀室温放置 2~3 min。4 12 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,加等体积异丙醇,-20℃放置 20 min,12 000 $\times g$ 离心 10 min。弃去管内液体,加 800~1 000 μ L 体积分数 75% 乙醇,4 8 000 $\times g$ 离心 5 min。弃去管内液体,加 800~1 000 μ L 无水乙醇,4 10 000 $\times g$ 离心 5 min。倒置风干,沉淀用适量的 DEPC 水溶解待测。

1.3.2 RNA 质量鉴定 参考文献[4]的方法,采用改良的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,电压 4~5 V/cm,紫外灯下观察;取 RNA 样品 100 倍稀释,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,计算 RNA 的纯度及含量。

1.4 大鼠乳腺组织 β actin 基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 RT 反应 总 RNA 2 μ L, 5 $\times$ AMV Buffer 4 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, RNase Inhibitor (40 u/ μ L) 0.5 μ L, OligdT (50 pmol/ μ L) 1 μ L, AMV (5 u/ μ L) 1 μ L, DEPC-H₂O 7.5 μ L,混匀后,室温静置 10 min,42℃1 h,即得 cDNA 模板,置-20℃备用。

1.4.2 PCR 反应 反应体系为 10 $\times$ Buffer (无 Mg²⁺) 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 6 μ L, dNTPs 6 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.4 μ L, ER α 或 β actin cDNA 模板 2 μ L,加水至 50 μ L。反应程序均为 95℃变性 3 min; 95℃10 s, 53℃20 s, 72℃30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

1.5 RT-PCR 扩增产物的检测

取 ER α 和 β actin 的 PCR 产物各 5 μ L,分别与 4 μ L 6 $\times$ Loading Buffer, 2 μ L 20 $\times$ Syngreen 混合,12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统照相并于 302 nm 处检测 PCR 产物光密度值(OD_{ER α} 和 OD _{β actin}),用 ER α 与 β actin 的 OD 值之比定量 ER α 的转录水平。

1.6 PCR 扩增产物的回收及测序

用 Gel extraction kit 回收目的条带,送北京华

大生物公司测序。

1.7 数据统计与分析

不同发育时期大鼠乳腺组织中 $OD_{ER\alpha}/OD_{\beta actin}$ 均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, 并采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据整理和统计, 多组间比较用方差分析 F 检验, 组间两两比较用 SNK 检验。

2 结果与分析

2.1 大鼠乳腺组织总 RNA 的质量

结果表明, 提取的大鼠乳腺组织总 RNA 电泳

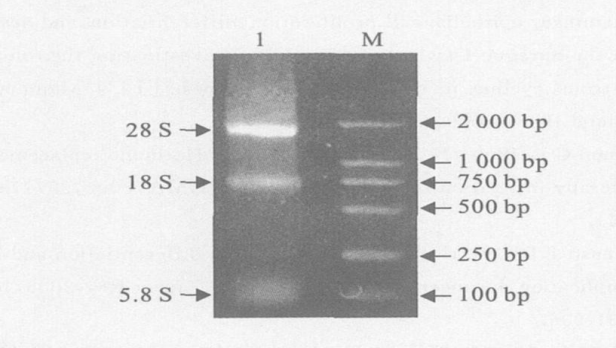


图 1 大鼠乳腺组织中总 RNA 的电泳结果
1. RNA 样品; M. DL 2000 DNA 标准
Fig 1 Rats' examination of total RNA in mammary tissue
1. RNA sample; M. DL 2000 DNA Marker

后在 28 S (约 1 880 bp)、18S (约 750 bp) 和 5.8 S (约 110 bp) 处有清晰的条带 (图 1), 表明 RNA 完整性较好。所有样品用紫外分光光度计定量, OD_{260}/OD_{280} 值为 1.7~2.0, 表明纯度较好, 无蛋白质和 DNA 污染。

2.2 大鼠乳腺组织中 $ER\alpha$ 基因的 RT-PCR 结果

从大鼠乳腺中提取的总 RNA 经 RT-PCR 后, 在约 430 bp 位置有预期大小的特异性扩增条带 (图 2)。经测序证实回收目的条带为特异性的雌激素受体 ($ER\alpha$) 扩增产物。

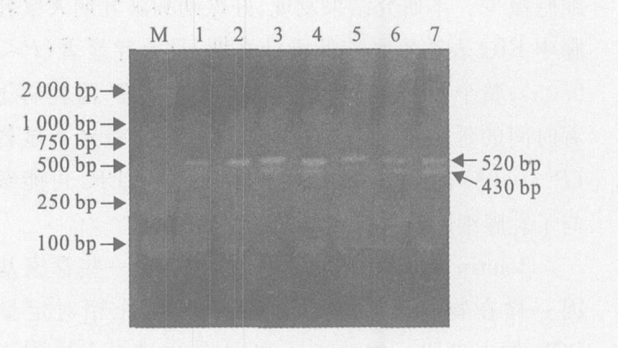


图 2 大鼠乳腺组织中 $ER\alpha$ mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图
M. DL 2000 DNA 标准; 1 处女期; 2~4 妊娠 6, 12, 18 d; 5~7 泌乳 6, 12, 18 d
Fig 2 Rats' electrophoresis analysis of PR RT-PCR product
M. DL 2000 DNA Marker; 1. Virgin; 2-4 6, 12, 18 d of pregnancy; 5-7 6, 12, 18 d of lactation

2.3 大鼠乳腺组织中 $ER\alpha$ 基因的表达水平

$ER\alpha$ 基因在大鼠乳腺中转录水平的相对定量结果见表 1。由表 1 可知, 与处女期相比, 妊娠和泌乳期 $ER\alpha$ 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 妊娠过程

中, 以妊娠 12 d 最高, 并与妊娠 18 d 差异显著 ($P < 0.05$), 与妊娠 6 d 差异不显著 ($P > 0.05$); 泌乳期随着泌乳时间的增加, $ER\alpha$ 的表达水平增加, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 大鼠乳腺发育不同时期 $ER\alpha/\beta actin$ 电泳条带密度扫描结果 ($n=6$)

Table 1 Electrophoresis analysis of $ER\alpha/\beta actin$ during each period of mammary

组别 Group	$OD_{ER\alpha}/OD_{\beta actin}$	组别 Group	$OD_{ER\alpha}/OD_{\beta actin}$
处女期组 Virgin period group	1.16 ± 0.04 c	泌乳 6 d 组 Days 6 of lactation group	0.89 ± 0.05 a
妊娠 6 d 组 Days 6 of pregnancy group	1.00 ± 0.03 ab	泌乳 12 d 组 Days 12 of lactation group	0.91 ± 0.11 a
妊娠 12 d 组 Days 12 of pregnancy group	1.05 ± 0.04 b	泌乳 18 d 组 Days 18 of lactation group	0.93 ± 0.12 a
妊娠 18 d 组 Days 18 of pregnancy group	0.91 ± 0.05 a		

注: 同列数据后标相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。
Note: The data in the same column with identical letters means the insignificant differences ($P > 0.05$).

3 讨论

乳腺发育受类固醇、多肽激素及生长因子等调控, 这些调控因子通过内分泌、旁分泌或自分泌的方式来发挥作用, 如雌二醇和孕酮主要通过内分泌的方式分别促进乳腺导管和小叶腺泡的发育^[5-6]。雌激素是乳腺细胞进行有丝分裂的有效分裂原, 对于乳

腺的正常发育是必需的^[7]。从初情期开始, 乳腺细胞快速生长发育, 这主要由雌激素刺激导管增生和孕酮促进腺泡发育引起的。多数学者认为, 雌激素在乳腺中的作用部分由 $ER\alpha$ 介导。尽管雌激素在乳腺上皮增生中有明显的作用, 但对雌激素受体在乳腺细胞发育和泌乳中是否有调节作用的研究较少。

由于 $ER\alpha$ 的变化对监测乳腺肿瘤、鉴别其良恶

性病变,判断预后有重要的临床应用及推广价值,所以目前 ER_{α} 在乳腺方面的研究多侧重于对乳腺癌的监测,而对正常乳腺发育过程中 ER_{α} 的含量变化研究较少^[8]。Saji 等^[9]用免疫组化法对大鼠乳腺中 ER_{α} 和 ER_{β} 的表达水平进行了研究,结果发现初情期前乳腺中表达 ER_{α} 的细胞约占 40%,共同表达 2 种受体的细胞约占 25%;妊娠期,多数细胞表达 ER_{β} ,少数细胞表达 ER_{α} ,共同表达 2 种受体的细胞极少;泌乳期,主要是共同表达 2 种受体的细胞;断奶后,表达 ER_{α} 的细胞较少,共同表达 2 种受体的细胞极少。本研究结果发现,妊娠期和泌乳期大鼠乳腺中 ER_{α} 表达水平均低于处女期,且差异显著 ($P < 0.05$);整个妊娠过程中,以妊娠 12 d 最高;泌乳期随着时间的延长, ER_{α} 的表达水平增加,但差异不显著 ($P > 0.05$),与 Saji 报道基本一致。提示 ER_{α} 可能参与了乳腺细胞的发育和凋亡。

β actin 是一种细胞质肌动蛋白,与一些管家基因一样在物种内持续恒量表达,常用作相对定量 PCR 的内参照。相对定量 PCR 是通过终点检测法进行的,即 PCR 达到平台期后,用目的基因与内参照的灰度比值作为目的基因的相对量。为了更精确的检测乳腺发育过程中 ER_{α} 的变化,下一步的研究工作将应用实时荧光定量 PCR 方法检测 ER_{α} 在乳腺组织的表达。

[参考文献]

- [1] Stumpf W E, Sar M, Aumuller G. The heart a target organ for estradiol[J]. Science, 1977, 196(4287): 319-321.
- [2] Kuiper J, Enmark E, Peltö H M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 5925-5930.
- [3] Enmark E, Peltö H M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor β gene structure, chromosomal localization, and expression pattern[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: 4258-4265.
- [4] 曹廷兵,叶治家,巩燕,等.一种快速鉴定 RNA 质量的方法[J].第三军医大学学报,2002,24(8):992-993.
- [5] Schedin P, Mitrenga T, Kaecik M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000, 5: 211-225.
- [6] Chen C L, Weiss N S, Newcomb P, et al. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer[J]. JAMA, 2002, 287: 734-741.
- [7] Russo J, Daniel M, Hu Y F, et al. Breast differentiation and its implication in cancer prevention[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 931-936.
- [8] 李宣海,巫向前,倪语星.肿瘤标志物的检测与临床[M].第1版.北京:人民卫生出版社,1997:135-137.
- [9] Saji S H, Jensen E V, Stefan N, et al. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland[J]. PNAS, 2000, 97(1): 337-342.

(上接第 52 页)

- [2] 梁爱华,叶祖光.千里光属植物的毒性研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(2):93-97.
- [3] 陈进军,赵生才,林红英,等.九里明抗菌镇痛有效部位中 PA s 的研究[J].中国农学通报,2006,12(6):117-121.
- [4] 郑杭生,冯年平,陈佳,等.乳香没药的提取工艺及其提取物的镇痛作用[J].中成药,2004,26(11):956-958.
- [5] 赵晓亚,向明,张勇慧,等.冷水七活性部位镇痛抗炎作用的研究[J].医药导报,2005,24(1):10-12.
- [6] 曹佳,林真,余争平.微核试验原理方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M].北京:医学科学出版社,2000:56-64.
- [7] Li Y, Dunipace A J, Stookey G K. Lack of genotoxic effects of fluoride in the mouse bone marrow micronucleus test[J]. Journal of Dental Research, 1987, 66(11): 1687-1690.
- [8] 柳蔚,杨兴海,钱金萍.资木瓜乙醇提取物对小鼠的镇痛作用[J].实用医学进修杂志,2004,32(4):252-254.
- [9] 祁乃喜,卢金福,冯有龙,等.荆芥酯类提取物对小鼠的镇痛作用[J].南京中医药大学学报,2004,20(4):229-230.
- [10] Shelcunova E V, Bepalov A Y. Effects of meprobamate on estrogen-dependent acute tolerance to the morphine analgesia in female rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 535(3): 78-85.
- [11] Nishiyama T. Analgesic effects of intracerebrally administered celecoxib, a cyclooxygenase-inhibitor, in the tail pick test and the formalin test in rats[J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2006, 50(2): 28-33.