

网络出版时间:2016-08-09 09:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.09.004

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160809.0940.008.html>

GPER 激动剂对发情周期小鼠卵巢 EGFR 表达的影响

王 璐,刘红改,于得水,李 晶,刘 慧,赵慧英

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨 G 蛋白耦联雌激素受体(G-protein-coupled estrogen receptor,GPER)激动剂对卵巢表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)表达的影响,为阐明 GPER 和 EGFR 在卵巢功能维持中的作用奠定基础。【方法】取间情期小鼠,将其分为 40,200,1 000 ng/只 G-1 腹腔注射组 and 对照组(腹腔注射等体积生理盐水),每组 20 只,各组小鼠进行相应的处理。注射 G-1 后,依次取发情前期、发情期、发情后期和间情期小鼠各 5 只,脱颈处死,迅速取出卵巢,采用免疫组织化学 SP 法和实时定量 RT-PCR 法,研究不同剂量 GPER 激动剂 G-1 对发情周期小鼠卵巢 EGFR 分布及其 mRNA 表达的影响。【结果】EGFR 在小鼠卵巢的各级卵泡、黄体 and 间质中均有表达,且在卵泡颗粒细胞 and 卵母细胞中表达最明显,在黄体 and 间质中的表达较微弱。同一发情时期卵巢中,EGFR 的相对表达量随注射 G-1 剂量的增加而升高,除发情后期外,其他 3 个时期以 1 000 ng/只 G-1 注射组均极显著高于对照组($P<0.01$);间情期 and 发情前期则以 200 ng/只 G-1 注射组显著高于对照组($P<0.05$)。各组发情周期小鼠卵巢中 EGFR mRNA 表达量的变化规律与 EGFR 相对表达量的表现基本一致。【结论】G-1 对发情周期卵巢中 EGFR 的表达有一定的上调作用,提示 GPER 可介导雌激素经 EGFR 信号级联参与卵巢周期性生殖活动和卵泡生长发育的调节。

【关键词】 G 蛋白耦联雌激素受体;表皮生长因子受体;发情周期卵巢

【中图分类号】 Q492.5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)09-0022-05

Effect of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) agonist on expression of EGFR in mice ovary during estrous cycle

WANG Lu,LIU Honggai,YU Deshui,LI Jing,LIU Hui,ZHAO Huiying

(College of Veterinary Medicine,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 This study explored the effect of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) agonist on the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ovary to lay foundation for clarifying the functional relationship between GPER and EGFR. 【Method】 The diestrus mice were divided into 40,200 and 1 000 ng dose of G-1 intraperitoneal injection groups and the control group (intraperitoneal injection of normal saline). Each group included twenty mice. Five mice were selected in proestrous,estrous,metestrous and diestrus and sacrificing periods after injection of G-1 and their ovaries were removed quickly. Immunohistochemical SP method and real-time quantitative RT-PCR were used to study the distribution of EGFR and expression of EGFR mRNA in mice ovary during the estrus cycle. 【Result】 EGFR distributed in mice ovarian follicles,the corpus luteum and stroma with the largest expression in granulosa cells and oocytes and weak expression in corpus luteum and stroma. The expression of EGFR increased with the in-

【收稿日期】 2015-02-07

【基金项目】 抗病转基因牛新品种培育重点专项基金项目(2009ZX08007)

【作者简介】 王 璐(1989—),女,河南社旗人,在读硕士,主要从事基础兽医学研究。

【通信作者】 赵慧英(1966—),女,陕西韩城人,教授,硕士生导师,主要从事动物神经内分泌研究。E-mail: xn6118@qq.com

creasing dose of G-1 during the same period. Except for metestrous, the EGFR expression in ovary of 1 000 ng G-1 group was significantly higher than the control in other three periods ($P < 0.01$). The expression in ovary of 200 ng G-1 group in diestrus and proestrus periods was significantly higher than the control ($P < 0.05$). The expression of EGFR mRNA was consistent with the relative expression of EGFR in each group. 【Conclusion】 G-1 upregulated the expression of EGFR in ovary during estrous cycle. Suggesting GPER can mediate estrogen involved in regulating cyclical ovarian reproductive activity and follicular development by EGFR signaling cascade.

Key words: G-protein-coupled estrogen receptor; epidermal growth factor receptor; estrous cycle ovary

雌激素通过与其受体(Estrogen receptor, ER)结合参与卵巢生理功能的调节。最初,人们认为雌激素的生物效应完全由核受体来介导^[1],但深入研究后发现,雌激素还存在膜受体。2005年 Revankar 等^[2]和 Thomas 等^[3]先后提出 G 蛋白耦联雌激素受体(G-protein-coupled estrogen receptor, GPER)为一种新型雌激素膜受体,介导雌激素的快速非基因组效应。Pang 等^[4]证实, GPER 参与调节卵泡发育和卵母细胞的成熟。本研究组也证实 GPER 在小鼠^[5]和奶山羊^[6]发情周期卵巢的生理调节中发挥着重要作用。表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)是酪氨酸激酶受体家族中的一种跨膜受体,与其配体结合可介导细胞生长、增殖和分化等生命活动。研究发现,在人^[7]和山羊^[8]等动物卵巢中均有 EGFR 表达,且其可通过卵丘细胞来调节卵母细胞成熟及卵泡发育^[9]。近年来,在研究 GPER 信号通路的过程中发现, GPER 介导的 ERK 和 PI-3K 信号通路是通过 EGFR 的转录激活而完成的^[10];雌激素通过 GPER 所介导的 EGFR 反式激活,可调节斑马鱼卵母细胞的减数分裂阻滞^[11],刺激鸡原始生殖细胞的增殖^[12]。目前,有关动物发情周期卵巢中 GPER 和 EGFR 的调节作用尚未见文献报道。因此本试验运用免疫组织化学技术和实时定量 RT-PCR 法,研究了 GPER 激动剂 G-1^[13]对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 表达的影响,旨在为阐明动物卵巢中 GPER 和 EGFR 的作用机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 雌性昆明白品系小鼠,体质量 20~25 g/只,购于第四军医大学实验动物中心。小鼠自由采食、饮水条件下适应性饲养,期间保持 13 h/11 h 的明暗周期变化(07:00—20:00 光照),2 周后用于试验。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗 EGFR 多克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司;免疫组化 SP 超敏试剂盒(兔)、柠檬酸组织抗原修复液、四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺(DAB),福州迈新生物技术开发公司;RNAiso PLUS 总 RNA 提取试剂, TaKaRa 公司;反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific; TransStart Tip Green qPCR SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司。

CM2235 轮转式切片机(德国 Leica 公司), Motic 数码显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司), ABI stepone plus 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 试验设计

对小鼠所处的发情时期进行鉴定,取间情期小鼠,参考文献^[14]将小鼠分为 40, 200, 1 000 ng/只 G-1 腹腔注射组和对照组(腹腔注射等体积生理盐水),每组 20 只,各组小鼠进行相应的处理。注射 G-1 后,依次取发情前期、发情期、发情后期和间情期小鼠各 5 只,脱颈处死,迅速取出卵巢,其中一侧用生理盐水冲洗后置于 40 g/L 多聚甲醛固定液中固定 24~48 h,用于免疫组织化学试验;另一侧置于液氮中保存,用于实时荧光定量分析。

1.3 石蜡切片的制备及免疫组化 SP 法染色

将固定好的卵巢流水冲洗 12 h,取出依次经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋等常规处理后,进行连续切片(片厚 5 μ m),再经展片、烤片、脱蜡复水和微波柠檬酸盐抗原修复 20 min 后,参考免疫组化 SP 试剂盒提供的程序进行染色:依次滴加 A 液(过氧化物酶阻断液)、B 液(动物非免疫血清)、C 液(生物素标记的二抗)、D 液(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶),室温各孵育 15, 15, 10 和 10 min,并在 B 液染色之后滴加兔抗 EGFR 多克隆抗体(1:200 稀释),同时设阴性对照组(以 0.01 mol/L PBS 替代一抗),4 $^{\circ}$ C 过夜;以上每步完成后均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次(B 液直接甩去即可),每次 5 min;

DAB 显色,显微镜下观察控制反应时间,双蒸水终止反应;苏木素复染、脱水、透明、封片。

从各组切片中随机选取 5 张进行显微观察和拍照,使用 Image-Pro Plus 软件对图片进行分析,测量阳性细胞的平均光密度、总面积,计算相对表达量(μ^2): $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{平均光密度} \times \text{阳性面积} / \text{像素}$ 。再应用 SPSS V18.0 软件对其进行方差分析。

1.4 小鼠卵巢中 EGFR mRNA 表达的 RT-PCR 检测

将卵巢从液氮中取出,在无 RNase 污染条件下快速提取总 RNA。以此 RNA 为模板,按照反转录试剂盒说明进行反转录合成 cDNA。通过 GenBank 查得小鼠 EGFR 基因序列,应用 Primer 5.0 软件设计引物,EGFR 基因上下游引物序列为:(F) 5'-TCTTCAAGGATGTGAAGTGTG-3',(R) 5'-GTGTACGCTTTCGAACAATGT-3',目的片段大小为 146 bp。选择持家基因 GAPDH 作为内参,其上

下游引物序列为:(F) 5'-GTGTTCTACCCCCAA-TGTGT-3',(R) 5'-ATTGTCATACCAGGAAAT-GAGCTT-3'。PCR 反应体系为 20 μL ,其中 2 $\times$ TransStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μL 、50 $\times$ Passive Reference Dye 0.4 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL 、cDNA 2 μL 、ddH₂O 6.8 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,进行 40 个循环。采用 ΔCT 法来计算 EGFR mRNA 的相对表达量,并用 SPSS V18.0 软件对相对表达量进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 表达的影响

G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 表达影响的形态表现见图 1。

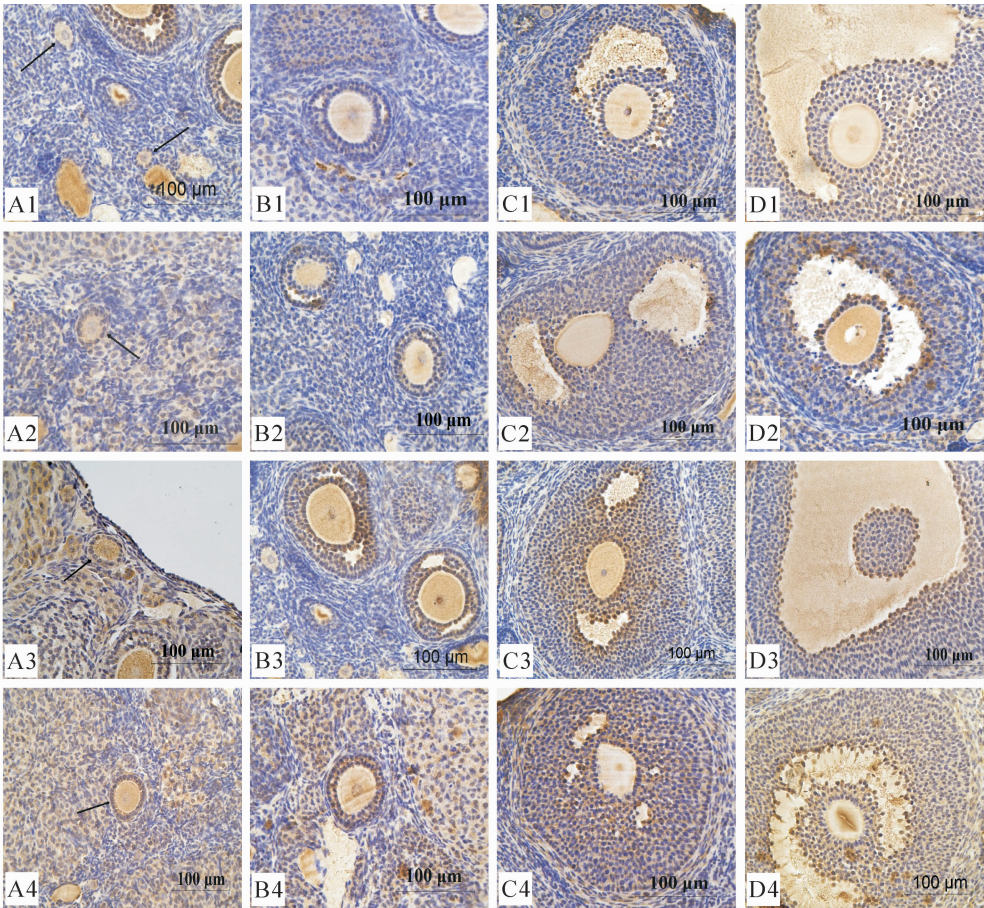


图 1 G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 表达的影响($\times 400$)

A1—A4. 发情后期初级卵泡;B1—B4. 间情期次级卵泡;C1—C4. 发情前期三级卵泡;D1—D4. 发情期成熟卵泡;

A1—D1. 对照组;A2—D2. 40 ng/只 G-1 组;A3—D3. 200 ng/只 G-1 组;A4—D4. 1 000 ng/只 G-1 组

Fig.1 Effect of G-1 on EGFR expression in mouse ovary during estrous cycle ($\times 400$)

A1—A4. Primary follicle in metestrus;B1—B4. Secondary follicle in diestrus;C1—C4. Tertiary follicle in proestrus;

D1—D4. Mature follicle in estrus;A1—D1. Control;A2—D2. 40 ng G-1 group;A3—D3. 200 ng G-1 group;A4—D4. 1 000 ng G-1 group

EGFR 在小鼠卵巢的卵泡、黄体 and 间质中均有表达,在卵泡中的表达最明显,在黄体 and 间质中的表达较微弱。卵泡中,以卵泡颗粒细胞阳性着色最深,且越靠近卵母细胞的颗粒细胞阳性着色越强;卵母细胞中,除原始卵泡中的 EGFR 表达微弱外,其他卵泡卵母细胞均呈中等强度表达,且 EGFR 阳性产物随卵泡体积的逐渐增大而增多(图 1-A1-D1),卵泡液中也有一定程度的 EGFR 表达。

EGFR 在各组小鼠卵巢中的表达量随 G-1 注射剂量的增加而增强,注射 40 ng/只 G-1 的小鼠卵泡中 EGFR 的表达较对照稍增强,呈稍深的棕黄色(图 1-A2-D2);注射 200 和 1 000 ng/只 G-1 的小

鼠卵泡中 EGFR 阳性表达明显增强,呈棕褐色(图 1-A3-D3、A4-D4)。

小鼠卵巢中 EGFR 的相对表达量统计分析结果如图 2 所示。由图 2 可知,小鼠卵巢中 EGFR 相对表达量表现为发情期>发情前期>间情期>发情后期,且随 G-1 注射剂量的增大而增加;40 ng/只 G-1 注射组小鼠各发情时期与对照组相比均无显著差异;200 ng/只 G-1 注射组中,发情期与对照组相比差异极显著($P<0.01$),间情期和发情前期与对照组相比差异显著($P<0.05$);1 000 ng/只 G-1 注射组小鼠在除发情后期外的其他 3 个发情时期 EGFR 的相对表达量均极显著高于对照组($P<0.01$)。

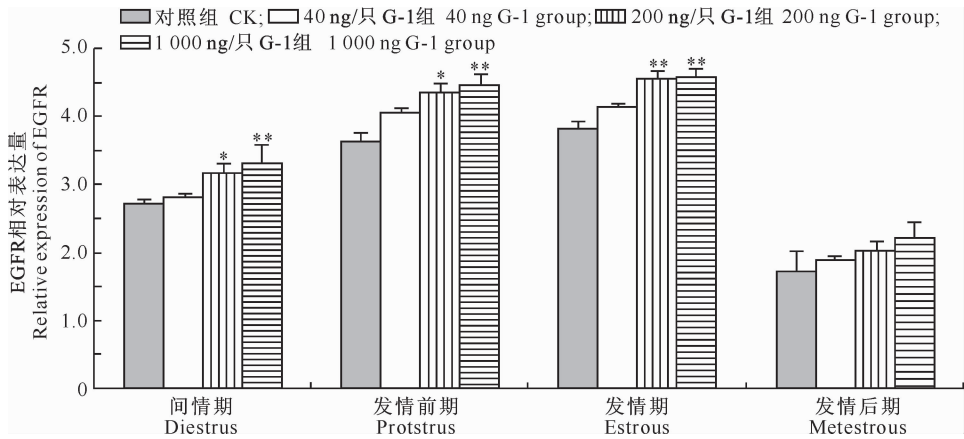


图 2 G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 相对表达量的影响

与对照组相比,柱上标 * 表示差异显著($P<0.05$),标 ** 表示差异极显著($P<0.01$)

Fig. 2 Effect of G-1 on EGFR relative expression in mouse ovary during estrous cycle

* means significant difference($P<0.05$),and ** means extremely significant difference($P<0.01$)

2.2 G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR mRNA 表达的影响

期、发情后期小鼠卵巢中 EGFR mRNA 表达的影响见图 3。

GPER 激动剂 G-1 对间情期、发情前期、发情

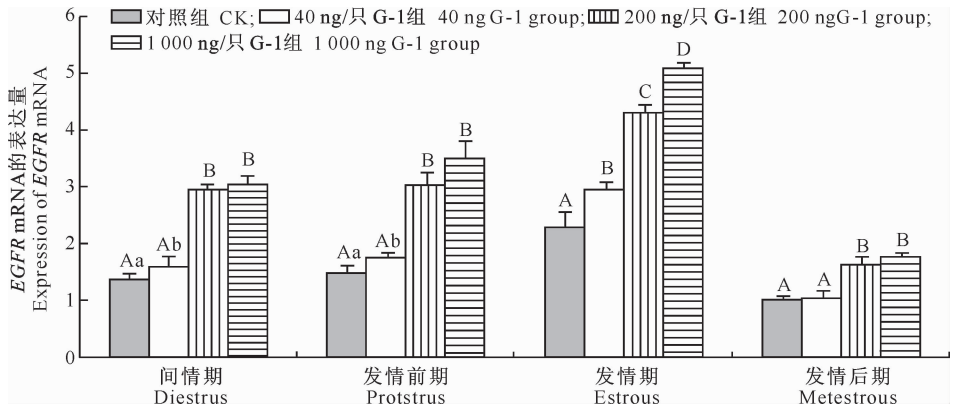


图 3 G-1 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR mRNA 表达的影响

同一发情时期不同处理相比,柱上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Fig. 3 Effect of G-1 on EGFR mRNA expression in mouse ovary during estrous cycle

Different lowercase letters mean significant difference in each period among treatments ($P<0.05$), and different uppercase letters mean extremely significant difference($P<0.01$)

荧光定量结果(图 3)显示, *EGFR* mRNA 在发情期表达量最高, 发情前期和间情期次之, 发情后期最低; 同一发情时期卵巢中 *EGFR* mRNA 的表达量随 G-1 注射剂量的增加而升高; 不同剂量 G-1 注射组间在发情期的差异均达极显著水平 ($P < 0.01$), 在其他 3 个发情时期, 1 000 和 200 ng/只 G-1 注射组卵巢中 *EGFR* mRNA 的表达量均极显著高于 40 ng/只 G-1 注射组 ($P < 0.01$), 间情期和发情前期的 40 ng/只 G-1 注射组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

EGFR 作为表皮生长因子家族受体, 调控细胞生长、增殖和分化。研究证实, *EGFR* 在人卵巢组织的各级卵泡卵母细胞和颗粒细胞中均有表达^[7]; 在山羊卵巢颗粒细胞中 *EGFR* 呈强阳性表达, 且越靠近卵母细胞表达越强^[8]。Ge 等^[12]提出, 卵母细胞和卵泡细胞之间以旁分泌的形式进行信息交流, 卵母细胞产生的 EGF 家族因子与相应靶细胞上的 *EGFR* 结合, 调节卵泡生长及卵母细胞成熟的过程, 这与本研究中“*EGFR* 不仅在各级卵泡中均有表达, 且随着卵泡的生长其表达量逐渐增多, 同时 *EGFR* 在距卵母细胞较近的颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中表达增强”的结果一致, 进一步证实了 *EGFR* 可促进卵泡的生长发育以及调节卵母细胞成熟的结论。

GPER 作为雌激素的膜受体, 通过与雌激素结合, 转录激活 *EGFR*, 进而激活 MAPK 和 PI-3K 信号通路, 介导雌激素的非基因组效应^[15]。Filardo 等^[16]研究证实, 在哺乳动物细胞中雌激素激活 GPER 的同时, 可通过 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基信号通路反式激活 *EGFR*。随后, Peyton 等^[11]发现, 雌激素处理可引起依赖于 *EGFR* 反式激活的 MAPK 磷酸化, 说明 MAPK 是 *EGFR* 的下游信号; 同时, 运用 *EGFR* 的抑制剂可阻断由雌激素或 G-1 引起的 MAPK 磷酸化效应, 表明 *EGFR* 位于 MAPK 信号级联反应的上游。雌激素激活 GPER 的信号通路涉及 Src、MMP、*EGFR* 和 MAPK 等信号因子。上述研究结果与本试验中给予小鼠 GPER 特异性激动剂 G-1 处理后, 发情周期卵巢中 *EGFR* 的表达量明显升高的结果相符, 表明小鼠卵巢内 GPER 的活化可反式激活 *EGFR* 及其下游信号级联反应, 从而参与卵泡发育和卵母细胞成熟的调节。

G-1 与雌激素一样可上调多种雌激素应答基因的表达^[17], *EGFR* 作为 GPER 信号通路中的下游信

号分子, 其表达量与 GPER 的调节作用密切相关。G-1 与卵泡细胞中的 GPER 结合可促进 *EGFR* 配体的生成, 进一步促进 *EGFR* 的活化, 上调其表达^[15]。耿阳雪等^[5]也已证实, GPER 在小鼠发情期卵巢中的表达量最高, 这与本试验中 G-1 对发情期卵巢中 *EGFR* 表达的上调作用最明显的结果一致。Ge 等^[12]运用 G-1 首次证实, GPER 经 *EGFR*-PI3K 信号级联反应可介导雌激素促进原始生殖细胞的增殖。本试验中给予间情期小鼠 G-1 处理后, 卵巢中的 GPER 被特异性激活, 上调卵巢中 *EGFR* 的表达, 且与 G-1 的注射剂量相关^[14], 推测在哺乳动物卵巢内, 雌激素通过与其膜受体 GPER 结合, 经 *EGFR* 信号通路介导非基因组效应, 参与卵巢功能调节。

[参考文献]

- [1] Emmen J M, Couse J F, Elmore S A, et al. *In vitro* growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) {alpha} and ER{beta} null mice indicate a role for ER{beta} in follicular maturation [J]. *Endocrinology*, 2005, 146 (6): 2817-2826.
- [2] Revankar C M, Cimino D F, Sklar L A, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling [J]. *Science*, 2005, 307: 1625-1630.
- [3] Thomas P, Pang Y, Filardo E J, et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2): 624-632.
- [4] Pang Y F, Thomas P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2010, 342(2): 194-206.
- [5] 耿阳雪, 蒋振兴, 熊东升, 等. GPR30 在小鼠发情周期卵巢中的分布和表达 [J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(6): 863-866.
Geng Y X, Jiang Z X, Xiong D S, et al. The distribution and expression of GPR30 in mice ovary during the estrous cycle [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2012, 39 (6): 863-866.
- [6] 王文丽, 代盈盈, 赵慧英, 等. 发情周期关中奶山羊卵巢中 GPR30 和 NGF 的表达 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(5): 522-526.
Wang W L, Dai Y Y, Zhao H Y, et al. Expression of GPR30 and NGF in Guanzhong dairy goats ovary during the estrous cycle [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(5): 522-526.
- [7] Qu J, Nisolle M, Donnez J. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation [J]. *Fertility and Sterility*, 2000, 74(1): 113-121.

- 淹逆境的生殖响应 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(2): 325-328.
- Fu T F, Zeng B, Ye X Q, et al. The reproductive responses of *Arundinella hirta* individual to flooding [J]. Journal of South-west China Normal University (Natural Science), 2005, 30(2): 325-328.
- [29] 朱志红, 王 刚, 赵松岭. 不同放牧强度下矮嵩草克隆分株种群的动力与调节 [J]. 生态学报, 1994, 14(1): 40-45.
- Zhu Z H, Wang G, Zhao S L. Dynamics and regulation of clonal ramet population in *Komresia humilis* under different stocking intensities [J]. Acta Ecologica Sinica, 1994, 14(1): 40-45.
- [30] 杨利民, 韩 梅, 李建东. 中国东北样带草地群落放牧干扰植物多样性的变化 [J]. 植物生态学报, 2001, 25(1): 110-114.
- Yang L M, Han M, Li J D. Plant diversity change in grassland communities along a grazing disturbance in the northeast China transect [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2001, 25(1): 110-114.
- [31] 王洪义, 王正文, 李凌浩, 等. 不同生境中克隆植物的繁殖倾向 [J]. 生态学杂志, 2005, 24(6): 670-676.
- Wang H Y, Wang Z W, Li L H, et al. Reproductive tendency of clonal plants in various habitats [J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(6): 670-676.

(上接第 21 页)

- [18] 宋翠翠, 曹国宪, 张 莉, 等. 大肠杆菌表达 GST-A β 42 融合蛋白的纯化条件及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2453-2456.
- Song C C, Cao G X, Zhang L, et al. Optimal purification condition and identification of GST-A β 42 expression in *Escherichia coli* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12): 2453-2456.
- [19] 车 婧, 韩金祥, 王世立. 促进包涵体蛋白复性的几种有效添加剂 [J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(2): 122-125.
- Che J, Han J X, Wang S L. Several additives that effectively improve protein refolding [J]. J Med Mol Biol, 2004, 1(2): 122-125.

(上接第 26 页)

- [8] Gall L, Chene N, Dahirel M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex [J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67: 439-445.
- [9] Gall L, Boulesteix C, Ruffini S, et al. EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during *in vitro* maturation [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 71(4): 489-494.
- [10] Quinn J A, Graeber C T, Frackelton A R, et al. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30 [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2009, 23: 1052-1064.
- [11] Peyton C, Thomas P. Involvement of epidermal growth factor receptor signaling in estrogen inhibition of oocyte maturation mediated through the G protein-coupled estrogen receptor (Gper) in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Biology of Reproduction, 2011, 85: 42-50.
- [12] Ge C, Yu M, Zhang C. G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen induced proliferation of primordial germ cells via EGFR/Akt/-catenin signaling pathway [J]. Endocrinology, 2012, 153: 3504-3516.
- [13] Bologa C G. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30 [J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2: 207-212.
- [14] Dennis M K, Burai R, Ramesh C, et al. *In vivo* effects of a GPR30 antagonist [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(6): 421-427.
- [15] Pandey D P, Lappano R, Albanito L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through cTGF [J]. Embo Journal, 2009, 28: 523-532.
- [16] Filardo E J, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release [J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2005, 16: 362-367.
- [17] Albanito L, Lappano R, Madeo A, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116: 1648-1655.