

网络出版时间:2016-12-26 11:04

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.02.002

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161226.1104.004.html

G15 对发情周期小鼠卵巢表皮生长因子受体表达的影响

于得水,王璐,李晶,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】**研究 G 蛋白偶联雌激素受体(G-protein-coupled estrogen receptor,GPER)对发情周期小鼠卵巢表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)表达的影响。**【方法】**间情期小鼠腹腔注射 GPER 抑制剂 G15,按注射剂量 0.3、1.5 和 7.5 nmol/只设 3 个注射组,另设腹腔注射等体积生理盐水的对照组;药物注射后,依次取发情前期、发情期、发情后期和间情期小鼠的卵巢,用免疫组织化学 SP 法和 RT-PCR 法分别检测各组小鼠发情周期不同阶段卵巢 EGFR 及其 mRNA 的表达。**【结果】**EGFR 免疫组化阳性产物主要分布于卵巢的各级卵泡中,阳性染色随卵泡发育而逐渐增强,其中颗粒细胞越靠近卵母细胞染色越强,发情周期卵巢 EGFR 相对表达量表现为发情期>发情前期>间情期>发情后期。小鼠注射 G15 后,各情期卵巢中 EGFR 的表达呈 G15 剂量依赖性减弱,除发情后期外,均极显著下降($P<0.01$);1.5 和 7.5 nmol/只 G15 注射组各情期 EGFR 的相对表达量无显著差异($P>0.05$),但均极显著低于 0.3 nmol/只 G15 注射组($P<0.01$)。EGFR mRNA 的变化规律与 EGFR 相对表达量的变化趋势完全一致。**【结论】**G15 可在一定程度上通过 GPER 下调发情周期小鼠卵巢中 EGFR 的表达,从而影响发情周期卵巢的功能。

[关键词] 发情周期;卵巢;G 蛋白偶联雌激素受体;G15;表皮生长因子受体;小鼠

[中图分类号] S852.2;Q492.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)02-0011-05

Effects of G15 on expression of epidermal growth factor receptor in mice ovary during estrous cycle

YU Deshui, WANG Lu, LI Jing, ZHAO Huiying

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

Abstract: **【Objective】**The purpose of this research was to investigate the effect of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER, G15) on the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mice ovary during the estrous cycle. **【Method】**G15 was intraperitoneal injected to mice in 3 groups according to doses of 0.3, 1.5 and 7.5 nmol, and mice in the control group were injected same volume of normal saline. After injection, the ovaries were removed during proestrus, estrus, dioestrus and metestrus stages. Immunohistochemistry and real-time quantitative RT-PCR were used to research the expression of EGFR and EGFR mRNA at different stages of estrous cycle. **【Result】**EGFR immunohistochemical positive products mainly distributed in ovarian follicles at different stages, positive staining strengthened gradually with follicular development, and those closer to the oocyte had deeper staining. The relative expression in ovarian estrous cycle was in the order of estrus>proestrus>dioestrus>metestrus. After G15 injection, the expressions of EGFR in each period showed G15 dose-dependent decrease very significantly ($P<0.01$) except for

[收稿日期] 2015-10-06

[基金项目] 国家林业局科研项目“野生动物疫源疫病监测及预警系统维护”(K313021501)

[作者简介] 于得水(1989—),男,河北唐山人,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: zhaohuiying @nwsuaf.edu.cn

metestrus. The EGFR relative expressions of 1.5 and 7.5 nmol G15 injection groups in each period were significantly lower than that of 0.3 nmol G15 injection group ($P<0.01$), while no significant difference was found between these two groups ($P>0.05$). The trend of EGFR mRNA expression was consistent with the relative expression of and EGFR. 【Conclusion】 G15 inhibited the expression of EGFR by GPER in mice ovarian, and affected the function of ovarian during estrous cycle.

Key words: estrous cycle; ovary; G-protein-coupled estrogen receptor; G15; epidermal growth factor receptor; mice

作为哺乳动物卵巢分泌的一种重要的类固醇激素,雌激素与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合通过基因组效应调节雌性动物卵巢的生长发育和正常生殖生理功能。研究发现,雌激素还能通过细胞膜表面的 G 蛋白偶联雌激素受体(G-protein-coupled estrogen receptor, GPER)介导的快速非基因组效应发挥作用^[1-3]。已证实 GPER 在仓鼠^[4]、斑马鱼^[5]、小鼠^[6]等动物的卵巢中均有表达,并参与调节卵泡与卵母细胞的生长发育。

GPER 的特异性拮抗剂 G15 的发现^[7]为探究 GPER 的作用机制开辟了一条新途径,并已证实其能使 GPER 介导的 PI3K 激活过程受阻,而 GPER 介导的 ERK 和 PI-3K 信号通路需要 EGFR 的反式激活^[8-9],但 G15 可否通过抑制 GPER 通路中下游 EGFR 的表达而影响哺乳动物发情周期卵巢的功能尚不清楚。为此,本试验给小鼠注射不同剂量 G15,运用免疫组织化学技术和实时定量 RT-PCR 法,研究 GPER 对发情周期小鼠卵巢中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达的影响,旨在为探讨 GPER 在卵巢功能维持和调节中的作用提供基础资料。

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。在室温(22 ℃)条件下自由采食、饮水,保持 13 h 光照(07:00~20:00 光照),适应性饲养 2 周后用于试验。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂有: G15, 购自 Tocris bioscience 公司;柠檬酸组织抗原修复液和兔抗 EGFR 多克隆抗体, 购自北京博奥森生物技术有限公司;免疫组化 SP 超敏试剂盒(兔)和四盐酸 3,3-二氨基联苯胺(DAB), 购自福州迈新生物技术开发公司;RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂, 购自 TaRaKa 公司;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 购自 Thermo Scientific 公司;TransStart

Tip Green qPCR SuperMix, 购自北京全式金生物技术有限公司。主要仪器有: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

间情期小鼠腹腔注射 G15, 按 G15 注射剂量 0.3, 1.5 和 7.5 nmol/只设置 3 个注射组, 另设对照组(注射等体积生理盐水), 每组 20 只。注射药物后, 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, 其中一侧卵巢于 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;另一侧卵巢置于液氮中保存, 用于实时荧光定量分析。

1.3 石蜡切片制备及免疫组化 SP 法染色

将固定好的卵巢经流水冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋等常规处理后, 进行连续石蜡切片(片厚 5 μm), 再经展片、烤片、脱蜡复水及微波柠檬酸盐抗原修复 20 min 后, 按照免疫组化 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)和 D 液(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶), 并在滴加 B 液之后滴加一抗(兔抗 EGFR 多克隆抗体 1:200 倍稀释), 同时设阴性对照组(以 0.01 mol/L PBS 替代一抗), 4 ℃ 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。

各组切片中各随机选取 5 张进行显微观察和拍照, 使用 Image-Pro Plus 软件对图片阳性结果进行统计并计算 EGFR 相对表达量, 再应用 SPSS 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

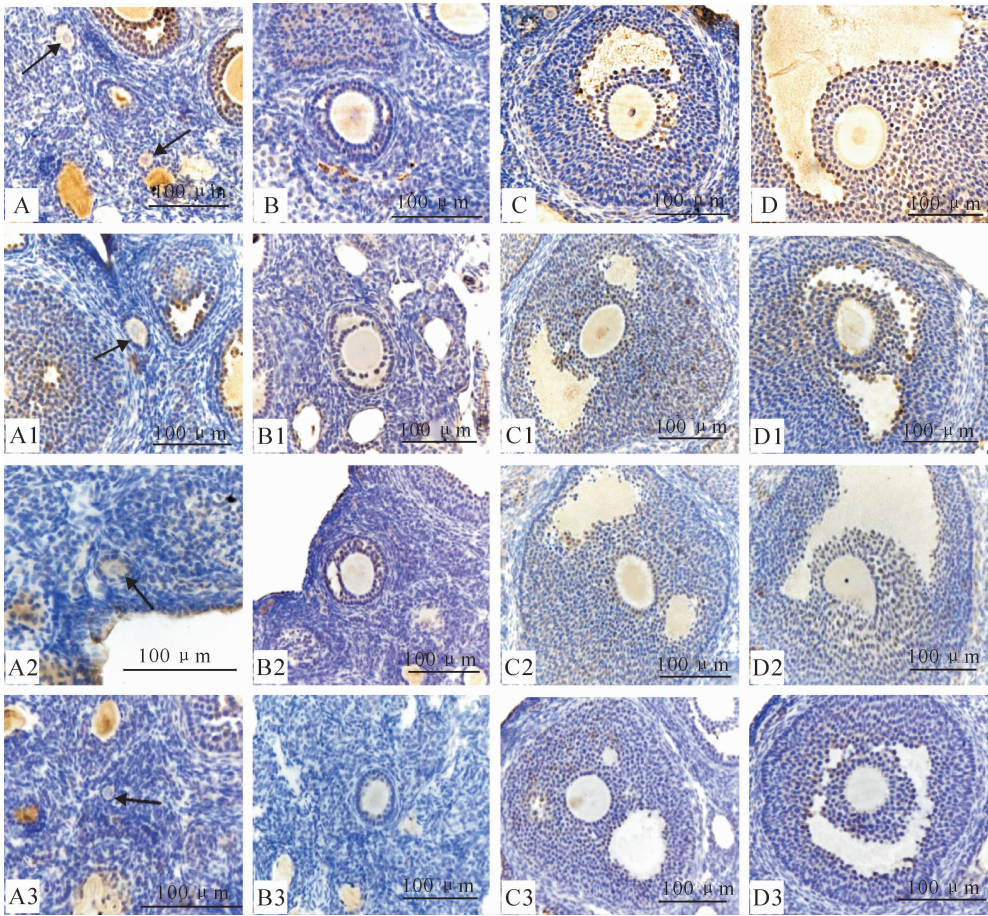
从液氮中取出卵巢并提取其总 RNA, 以此 RNA 为模板进行反转录合成 cDNA。通过 GenBank 查得小鼠 EGFR 基因序列, 应用 Primer 软件

设计引物,并以持家基因*GAPDH*作为内参。*EGF-R*基因上游引物序列为5-TCTTCAAGGATGTGA-AGTGTG-3,下游引物序列为5-GTGTACGCTTT-CGAACAATGT-3,目的片段长度为 146 bp。*GAPDH*基因上游引物序列为5-GTGTTCCTAC-CCCCAATGTGT-3,下游引物序列为(5-ATTGT-CATACCAGGAAATGAGCTT-3。PCR 反应体系为 20 μ L,其中 2 $\times$ TransStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L,Passive Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L),cDNA 2 μ L,ddH₂O 6.8 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算 *EGFR* mRNA 的相对表达量,并用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 G15 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 分布的影响

免疫组化染色结果见图 1。由图 1 可知,EGFR 免疫阳性产物呈不同程度的棕黄色分布于卵巢的各级卵泡和黄体中。EGFR 免疫阳性产物在初级卵泡中呈弱阳性表达(图 1-A),染色程度随着卵泡的发育而逐渐加深(图 1-B、C),成熟卵泡中呈棕黄色强阳性表达(图 1-D),有腔卵泡的卵泡液中也呈棕黄色染色(图 1-C、D);同时,越接近卵母细胞的颗粒细胞其免疫阳性染色越强。注射 G15 后,各情期小鼠卵泡中的染色程度明显随 G15 注射剂量的增加而减弱。



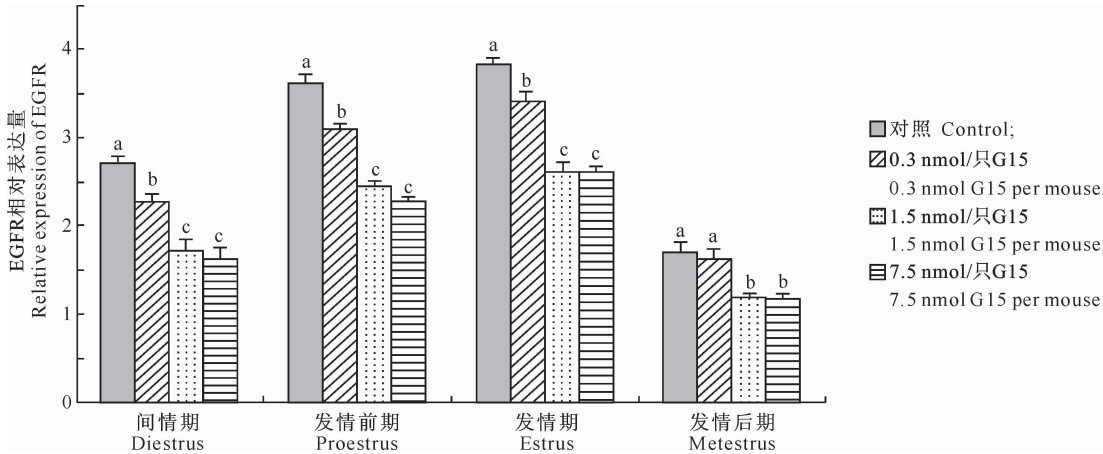
A~A3. 发情后期初级卵泡;B~B3. 间情期次级卵泡;C~C3. 发情前期三级卵泡;D~D3. 发情期成熟卵泡;A~D. 对照组;
A1~D1. 0.3 nmol/只 G15 注射组;A2~D2. 1.5 nmol / 只 G15 注射组;A3~D3. 7.5 nmol/只 G15 注射组。箭头所指为初级卵泡
A—A3. Primary follicle in metestrus;B—B3. Secondary follicle in diestrus;C—C3. Tertiary follicle in proestrus;
D—D3. Mature follicle in estrus;A—D. Control group;A1—D1. 0.3 nmol G15 per mouse injection group;
A2—D2. 1.5 nmol G15 per mouse injection group;A3—D3. 7.5 nmol G15 per mouse injection group. Arrows for primary follicles

图 1 EGFR 在小鼠卵泡中的免疫组织化学定位
Fig. 1 Immunohistochemical localization of EGFR in follicles of mouse ovary

2.2 G15 对发情周期小鼠卵巢中 EGFR 相对表达量的影响

由图 2 可知,各组小鼠卵巢中 EGFR 的相对表达量均表现出发情期>发情前期>间情期>发情后期的变化规律。注射 G15 后,各情期卵巢中 EGFR 的相对表达量均随 G15 注射剂量的增加而降低。

除 0.3 nmol/只 G15 注射组发情后期小鼠卵巢 EGFR 相对表达量下降不明显外,其他情期 EGFR 的相对表达量均较对照组极显著降低($P<0.01$);1.5 和 7.5 nmol/只 G15 注射组小鼠各情期卵巢中的 EGFR 相对表达量无显著差异($P>0.05$),但均极显著低于 0.3 nmol/只 G15 注射组($P<0.01$)。



图柱上标不同小写字母表示同一情期不同处理组间差异极显著($P<0.01$),下图同

Different small letters show very significant difference among groups at the same stage of estrous cycle ($P<0.01$), the same below

图 2 G15 对不同情期小鼠卵巢中 EGFR 的相对表达量的影响

Fig. 2 Effect of G15 on relative expression of EGFR in mice ovary among different stages of estrous cycle

2.3 G15 对发情周期小鼠卵巢 EGFR mRNA 表达的影响

从图 3 可见,G15 对各情期小鼠卵巢 EGFR mRNA 表达的影响与其对 EGFR 相对表达量的影

响趋势完全一致,即表现为发情周期各阶段小鼠卵巢中的 EGFR mRNA 表达量均随 G15 注射剂量的增加而下降。

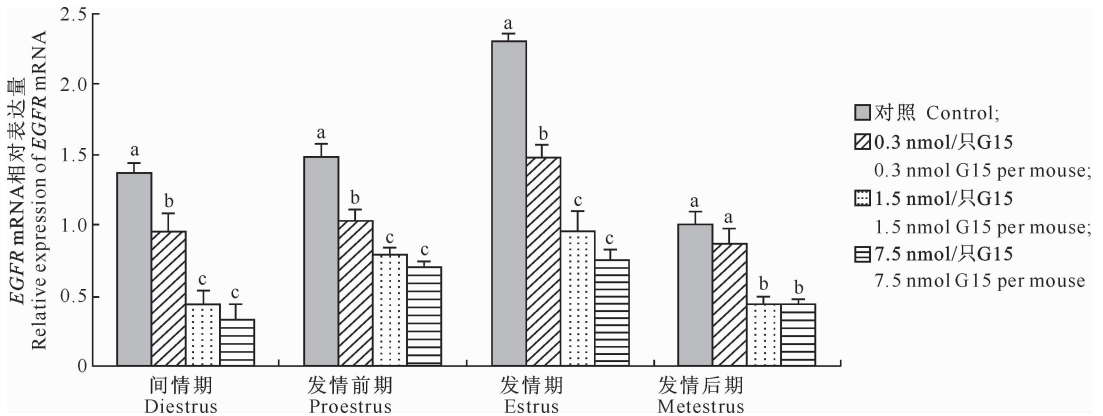


图 3 G15 对不同情期小鼠卵巢中 EGFR mRNA 相对表达量的影响

Fig. 3 Effect of G15 on relative expression of EGFR mRNA in mice ovary among different stages of estrous cycle

3 讨论

有研究证实,EGF 与 EGFR 结合可介导卵丘卵母细胞的成熟^[10]。本研究中 EGFR 相对表达量随着卵泡的发育而增多,也表明 EGFR 可能对卵泡的生长发育有促进作用。有研究证实,雌激素可通过

GPER 介导的 EGFR 反式激活和 MAPK 磷酸化来调节斑马鱼卵母细胞减数分裂的阻滞^[11]及鸡原始生殖细胞的增殖^[12];Mo 等^[13]研究发现,由雌激素和 G-1 引起的乳腺癌细胞增殖及 MAPK 激活所引起的促增殖效应均可被 G15 所抑制,且此抑制效应类似于 EGFR 的抑制剂 AG1478,可明显抑制 EG-

FR 的表达。在表达 GPER 而不表达 ER α 和 ER β 的乳腺癌细胞 SKBr3 中,G15 不能单独引起其反应,却可将 E2 诱导的反应大幅降低^[7]。本试验结果显示,注射 GPER 特异性抑制剂 G15,可降低发情周期小鼠卵泡中的 EGFR 及其 mRNA 的表达,说明 GPER 与 EGFR 激活之间存在独特的交联关系,进一步证实了雌激素膜受体 GPER 可调控其下游信号 EGFR 的表达。

本研究表明,注射不同剂量 G15 对小鼠卵巢中 EGFR 的表达有不同程度的影响,其中低剂量组 EGFR 的表达量在发情期、发情前期和间情期与对照组相比均极显著下降($P<0.01$),但在发情后期与对照组并无显著差异,这可能和黄体分泌孕酮影响 EGFR 的表达有关^[14]。中、高剂量组小鼠各发情时期的 EGFR 表达量均极显著低于低剂量组($P<0.01$),但高剂量组与中剂量组间却无显著差异($P>0.05$),说明在小鼠体内雌激素的诱导下,G15 可发挥其对 GPER 的抑制效应,且只能阻断小鼠体内雌激素经 GPER 所介导的部分效应。Dennis 等^[7]研究表明,G15 可通过 GPER 抑制子宫上皮细胞 50% 的雌激素增殖效应。这与本研究结果相符,说明 G15 可通过 GPER 在一定程度上抑制小鼠卵巢中 EGFR 的表达。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Notas G, Kampa M, Pelekanou V, et al. Interplay of estrogen receptors and GPR30 for the regulation of early membrane initiated transcriptional effects: a pharmacological approach [J]. *Steroids*, 2012, 77(10): 943-950.
- [4] Wang C, Prossnitz E R, Roy S K. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary; differential regulation by gonadotropins and steroid hormones [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(10): 4853-4864.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Prossnitz E R, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 7(12): 715-726.
- [9] Filardo E J, Quinn J A, Bland K I, et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF [J]. *Molecular Endocrinology*, 2000, 14(10): 1649-1660.
- [10] 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.
- [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(1): 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(7): 3504-3516.
- [13] Mo Z, Liu M, Yang F, et al. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer [J]. *Breast Cancer Research*, 2013, 15(6): 1-15.
- [14] Garnett K, Wang J, Roy S K. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary; follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone [J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 67(5): 1593-1604.