

不同时期绿色荧光裸鼠雌鼠血浆及组织中性激素水平变化^{*}

尤金炜¹ 董敏¹ 刘彪¹ 赵志刚¹ 王丽娟² 马畅¹ 张旭亮¹ 刘捷¹ 恽时锋¹

(1. 东部战区总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地, 全国科普教育基地, 南京 210002)

(2. 南京农业大学食品科技学院, 南京 210002)

摘要:目的 了解不同妊娠期、泌乳期绿色荧光 (Green Fluorescence Protein, 简称 GFP) 裸鼠雌鼠血浆中雌激素、孕激素、泌乳素及各组织中泌乳素及泌乳素受体 mRNA 水平变化。方法 通过电化学发光法测定血浆中激素的水平, 通过荧光定量 PCR 法测定泌乳素及泌乳素受体 mRNA 相对表达量。结果 GFP 裸鼠雌鼠妊娠期内雌激素和泌乳素水平不断下降、孕激素的水平先升后缓慢下降、组织中泌乳素 mRNA 水平较低、泌乳素受体水平较高; 而在泌乳期内雌激素、孕激素水平较稳定、组织中泌乳素 mRNA 水平较高, 泌乳素受体水平较低。结论 不同时期 GFP 裸鼠雌鼠体内性激素的水平不同, 参与裸鼠妊娠调控过程, 为解决雌鼠不孕、易流产等问题提供了基础参考值和内分泌水平的解决思路。

关键词:绿色荧光裸鼠; 雌激素; 孕激素; 泌乳素; 泌乳素受体

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0010-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.003

GFP 裸鼠是一种将绿色荧光蛋白稳定表达于裸鼠各个组织器官的转基因小鼠类型, 其同时具有普通裸鼠的胸腺缺陷特性和稳定、系统表达绿色荧光的特性, 在生物、医学研究中具有重大意义^[1]。

本课题组自成功构建 GFP 裸鼠模型后, 已将其多种生理生化指标检测完善, 主要组织中绿色荧光分布特点也基本明确^[2-4]。GFP 裸鼠模型构建过程中, 主要的难点在于该种系裸鼠繁殖能力低下, 特别是雌鼠不孕情况多发。本课题组已检测该种系雌鼠的动情周期, 发现 GFP 裸鼠雌鼠动情周期发生率明显低于 BALB/c 裸小鼠^[5]。裸鼠动情周期发生率主要取决于其下丘脑-垂体-卵巢性腺轴分泌的激素水平, 但此方面文献报道较少^[6]。为确定雌性 GFP 裸鼠血清中性激素水平, 明确其不孕的发生原因, 本课题组将不孕、孕早期、孕中期、孕晚期、泌乳早期、泌乳中期、泌乳晚期共 7 种不同生殖阶段雌性绿色荧光裸鼠血清及生殖相关各组织 (下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫) 中泌乳素水平加以对照, 为后期研究 GFP 裸鼠的生殖功能铺平道路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

分别取不孕、孕早期 (妊娠 6 d)、孕中期 (妊娠 12 d)、孕晚期 (妊娠 18 d)、泌乳早期 (泌乳后 6 d)、泌乳中期 (泌乳后 12 d)、泌乳晚期 (泌乳后 18 d) SPF 级雌性 GFP 裸鼠 (GFP nu/nu) 各 10 只, GFP 裸鼠为本实验室提供 [SCXK (军) 2012-0014]。动物均在 SPF 级设施饲养 [SYXK (军) 2012-0047]。

1.2 妊娠时间确定方法

合笼后第二天早 8 点采用观察阴道栓的方法确定是否受精, 如受精, 则定该天为妊娠第 1 天; 雌鼠产下新生鼠当日为产后第 1 天, 第 1 天至第 6 天为泌乳早期, 第 7 天至第 12 天为泌乳中期, 第 13 天至第 18 天为泌乳晚期。

1.3 血清性激素水平检测

使用电化学发光法检测小鼠血清中雌二醇、泌乳素、孕激素水平, 试剂提供商为德国罗氏诊断公司。

收稿日期: 2019-02-21

^{*} 基金项目: 中国人民解放军东部战区总医院科学研究课题 (No. 2016056)

作者简介: 尤金炜 (1983—), 男, 硕士, 研究方向: 医学实验动物研究与实验室管理. E-mail: jsyjw000@163.com

通信作者: 恽时锋 (1965—), 男, 教授, 研究方向: 医学实验动物研究与管理. E-mail: yunshifeng1@163.com

1.4 组织泌乳素水平检测

按照罗氏公司提供说明书进行反转录,获得

cDNA 后进行荧光定量 PCR 检测。试剂提供商为德国罗氏公司,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Quantitative PCR primer sequence

基因名	登录号	序列	位置
mPRL	FJ424613	F:GACGTGGCTTCTGTGCTTGCTG	12-33
		R:GCAGCACTGTCTTCTCGAGCTG	273-252
mPRL-R	BC125651	F:CTGGCCATCCTCCTGTCTTAC	715-735
		R:GTCCAGGTC TCGCAATAG	912-895
GAPDH	XM_001476723	F:ACCACAGTCCATGCCATCAC	434-453
		R:TCCACCACCCTGT TGCTGTA	885-866

1.5 统计方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,各组数据均用平均值±标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析法,两组间均数比较采用独立样本 t 检验。运用 Pearson Bivariate Correlation 进行双侧相关分析。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 各期 GFP 裸鼠雌鼠血清中雌二醇、孕激素、泌乳素水平

在 GFP 裸鼠雌鼠血清中,可以观察到,雌激素在妊娠早期达到高峰之后随妊娠进程不断下降,至泌乳晚期降至最低;孕激素在妊娠早期有一个幅度较大的下降,之后上升至未孕水平,泌乳期时孕激素水平不断缓慢下降;泌乳素与雌激素较为相似,但其在泌乳早期多了一个分泌高峰,见图 1、图 2、图 3。

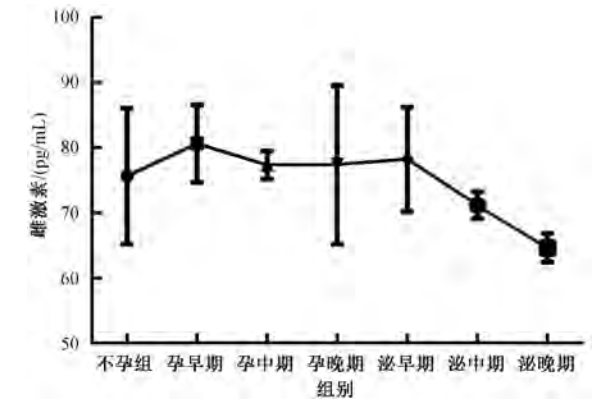


图 1 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中雌激素水平 (pg/mL)
Fig.1 The levels of estrogen in the serum of female mice in each group

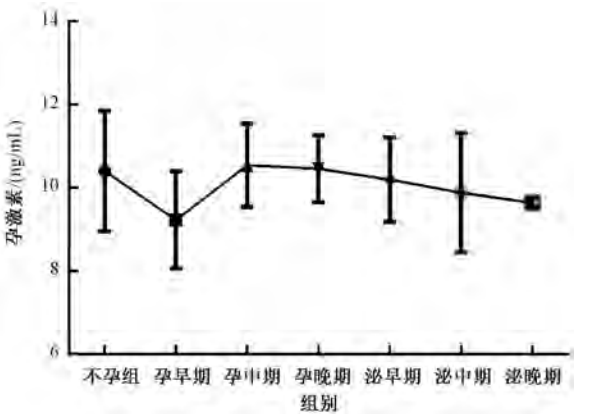


图 2 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中孕激素水平 (ng/mL)
Fig.2 The levels of progesterone in the serum of female mice in each group

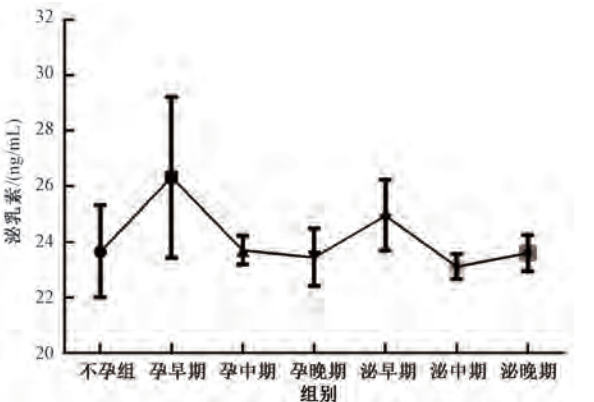


图 3 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中泌乳素水平 (ng/mL)
Fig.3 The levels of prolactin in the serum of female mice in each group

2.2 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫中泌乳素水平

泌乳素在延髓和肾上腺表达普遍较其他组织高,最高峰位于泌晚期,泌乳期整体较妊娠期 PRL 合成多;泌乳素受体与之相反,妊娠期整体较泌乳期表达高,且妊娠早期表达最高,随妊娠进行,泌乳素受体逐渐表达下降,见图 4 和图 5。

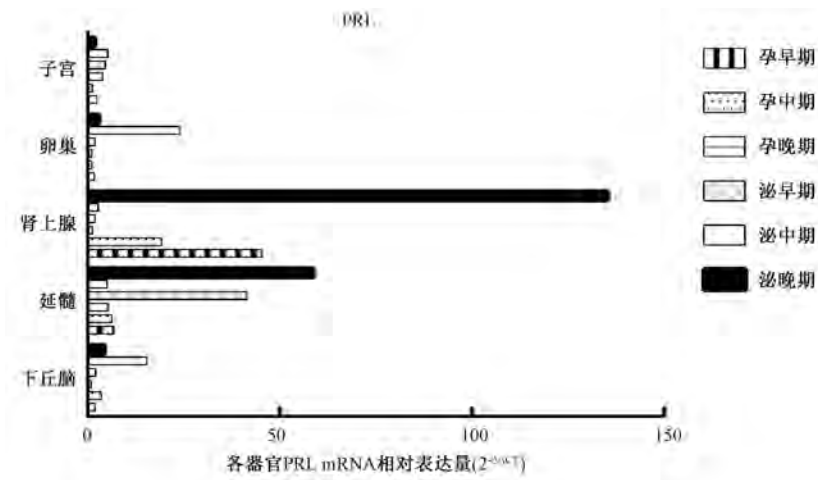


图 4 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫组织中 PRL mRNA 水平对比
Fig.4 Comparison of PRL mRNA levels in hypothalamus, medulla oblongata, adrenal gland, ovary and uterus in different stages

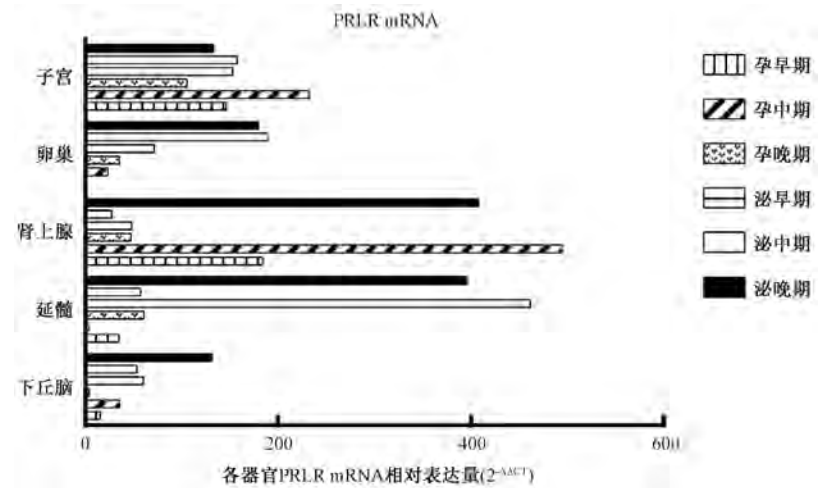


图 5 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫组织中 PRLR 受体 mRNA 水平对比
Fig.5 Comparison of PRLR mRNA levels in hypothalamus, medulla oblongata, adrenal gland, ovary and uterus in different stages

3 讨论

哺乳动物在妊娠时高剂量的孕激素对胚胎发育是有益且必须的,但高剂量雌激素会影响胚胎结构抑制胎儿生长^[7]。我们在 GFP 裸鼠雌鼠妊娠血清中同样发现了相似的现象:雌激素在妊娠早期含量最高,随着妊娠进展不断下降;孕激素在妊娠早期没有明显升高,甚至比未孕鼠血清中含量还低,但随着妊娠发展,孕激素水平不断升高且直至泌乳晚期均维持在较高水平。

本课题组同时发现:GFP 裸鼠雌鼠血清中泌乳素水平在妊娠早期升至最高,以后不断下降。此结

果与前期其他课题组在普通小鼠血清中发现的妊娠期及泌乳期泌乳素水平变化趋势相同^[8]。结合我们同期观察发现的表达于子宫的泌乳素受体含量在妊娠早期最高,说明与普通裸鼠相似,GFP 裸鼠雌鼠于妊娠早期同样需要大量泌乳素发挥生物学功能。

实验发现,GFP 裸鼠雌鼠在妊娠早期大量分泌泌乳素,泌乳素对神经系统的自身负反馈作用可能会抑制下丘脑合成泌乳素,而接下来的试验证实了此猜测。我们观察到妊娠早期的下丘脑、延髓、肾上腺组织中泌乳素 mRNA 含量均位于较低水平,同时各个器官中泌乳素受体的表达均较高。可能是由于

泌乳素在妊娠后期开始合成升高,各靶器官中空出大量泌乳素结合位点,为泌乳素在妊娠结束后发挥相应的生物学作用打下基础。

结合早期研究发现的 GFP 裸鼠模型主要存在的不孕、易流产等问题,本课题组从内分泌水平提出解决思路:在未孕鼠合笼早期给与雌激素、泌乳素,而在妊娠全程提供孕激素,妊娠晚期至泌乳期结束提供泌乳素。此种思路结合不同阶段裸鼠不同生理需求,最大程度地模拟裸鼠自身内分泌周期,有较大应用前景。但仍存在一定不足,主要是各个阶段各种激素需求量不尽相同,具体定量工作仍未完成,且各个绿色荧光裸鼠不同个体可能需要激素量也不同,需要进一步研究确认。

参 考 文 献

[1] 张立波,刘彪,田小芸,等. 绿色荧光裸小鼠的选育初报[J].

实验动物与比较医学, 2013, **33**(4):306-309.
[2] 尤金炜,董敏,刘彪,等. GFP 在绿色荧光裸鼠不同组织中的表达及分析[J]. 中国实验动物学报, 2014, **22**(5):67-70.
[3] 尤金炜,刘彪,张旭亮,等. 绿色荧光裸鼠部分免疫学指标的测定及分析[J]. 实验动物科学, 2015, **32**(5):15-17.
[4] 胡文娟,方天,刘彪,等. 绿色荧光裸小鼠睾丸组织学观察及精子质量检查[J]. 实验动物与比较医学, 2016, **36**(2):126-128.
[5] 胡文娟,方天,陈莉,等. 绿色荧光裸小鼠动情周期的观察[J]. 实验动物与比较医学, 2017, **37**(4):109-113.
[6] 杜纳纳,许丹丹,黄莉莉,等. 去卵巢和性成熟期 ICR 小鼠动情周期的观察[J]. 中国病理生理杂志, 2015, **31**(12):2301-2304.
[7] 王沛华.孕早期血清 P、E₂ 监测与妊娠结局相关性的研究[J].山西大同大学学报(自然科学版),2018,**34**(3):51-54.
[8] 朱河水,都军霞,刘涛,等. 不同时期小鼠血浆中催乳素的变化[J]. 贵州农业科学, 2008, **36**(2):123-124.

The Changes of Plasma and Tissue Levels of Sex Hormones in Nude Female Mice with Green Fluorescence at Different Stages

YOU Jinwei¹, DONG Min¹, LIU Biao¹, ZHAO Zhigang¹, WANG Lixian², MA Chang¹,
ZHANG Xuliang¹, LIU Jie¹, YUN Shifeng¹

(1.Department of Comparative Medicine, General Hospital of Eastern Theater Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animal, National Sciene Education Base, Nanjing 210002, China)
(2.College of Food Science and Technology of Nanjing Agricultural University 210002, China)

Abstract:To understand the changes in plasma levels of estrogen, progesterone, prolactin, and prolactin receptor mRNA in mice during pregnancy and lactation. Plasma levels of progesterone were measured by electrochemiluminescence and relative mRNA levels of prolactin and prolactin receptor were measured by fluorescence quantitative PCR. During the gestation period, estrogen and prolactin levels decreased continuously, progesterone levels increased first and then decreased slowly, prolactin mRNA levels were low in tissues, and prolactin receptor levels were high. During lactation, the levels of estrogen and progesterone are relatively stable, the levels of prolactin mRNA in tissues are relatively high, and the levels of prolactin receptors are relatively low. Different levels of sex hormones in nude mice with green fluorescence were different in different periods, and they participated in the process of pregnancy regulation in nude mice. It provides basic reference value and endocrine level for solving the problems of female mouse infertility and abortion.

Key words:Green fluorescent nude mice; Estrogen; Progesterone; Prolactin; Prolactin receptor