

GPR30 在小鼠发情周期卵巢中的分布和表达

耿阳雪, 蒋振兴, 熊东升, 代盈盈, 王文丽, 赵慧英*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 为了获得 G 蛋白偶联受体 30 (GPR30) 在小鼠发情周期卵巢中的分布和表达规律, 分别运用免疫组织化学 SP 法和 RT-PCR 法, 对小鼠发情前期、发情期、发情后期和间情期卵巢中 GPR30 分布及 GPR30 mRNA 的表达进行研究。结果显示: GPR30 免疫反应阳性产物分布于小鼠卵巢各级卵泡的颗粒细胞、卵泡膜细胞、卵母细胞以及黄体细胞和间质细胞的细胞膜和胞浆中, 以次级卵泡和成熟卵泡的颗粒细胞中分布最多、着色最深; GPR30 的相对表达量在小鼠发情周期卵巢中以间情期最低且极显著低于其他 3 个时期 ($P < 0.01$), 发情期最高但与发情前期和发情后期无显著差异 ($P > 0.05$)。发情周期卵巢中 GPR30 mRNA 的表达变化规律与 GPR30 的表达基本一致, 其中发情期最高且极显著高于其他时期 ($P < 0.01$), 间情期最低且极显著低于其他时期 ($P < 0.01$)。GPR30 在小鼠卵巢中的分布和表达量变化与卵泡发育过程以及发情周期雌激素变化规律基本一致, 提示其介导了雌激素对发情周期卵泡发育和卵母细胞成熟的调节。

关键词: GPR30; 小鼠; 卵巢

中图分类号: Q954.62; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)06-0863-04

The distribution and expression of GPR30 in mice ovary during the estrous cycle

GENG Yang-xue, JIANG Zhen-xing, XIONG Dong-sheng, DAI Ying-ying, WANG Wen-li, ZHAO Hui-ying
(College of veterinary medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100)

Abstract: To obtain the distribution and change of GPR30 in the mouse ovary during the estrous cycle, immunohistochemistry SP and RT-PCR methods were used respectively to study the expression of GPR30 and GPR30 mRNA in the mouse ovary during different stages of the estrous cycle. As a result, positive staining of GPR30 was widely located in the granular cells, theca interna cells of the follicles at different levels, oocytes, the luteal cells and interstitial cells, while the deepest staining of GPR30 was found in secondary follicles and mature follicles's granular cells. The immunoreactivity positive substance was mainly distributed in the cell membrane and the cytoplasm. The relative expression levels of GPR30 reached the lowest in the diestrus stage ($P < 0.01$); its expression level was the highest in the estrus stage, but there was no significant difference between proestrus, estrus and metestrus ($P > 0.05$). The changing regularity of GPR30 mRNA was consistent with GPR30 during the estrous cycle, its expression level was significant lower in the diestrus stage than that in other stages ($P < 0.01$), and reached its peak level in the estrus stage ($P < 0.01$). In conclusion, the results suggest that GPR30 involves in regulating the development of follicles and maturity of oocytes during the estrous cycle.

Key words: estrous cycle; GPR30; mouse; ovary

2005 年, Revankar 等^[1]首次提出 G 蛋白偶联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30) 作为一种雌激素膜受体介导了雌激素的多种生理作用。研究表明: GPR30 广泛存在于生殖系统的多种组织

中, 参与了雌激素对仓鼠卵泡发育^[2-3], 斑马鱼卵母细胞成熟^[4-5], 以及小鼠子宫生长的作用^[6]; 但 Otto 等^[7]通过研究却认为 GPR30 并不介导雌激素对生殖系统的作用。Chen 等^[8]认为在雌激素对种系囊分裂

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 抗病转基因牛新品种培育重点专项 (2009ZX08007-008B), 西北农林科技大学 2009 年基本科研业务费重大项目 (Z109021006) 共同资助。

作者简介: 耿阳雪, 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 赵慧英, 女, 教授。E-mail: ylzhaohy@yahoo.com.cn

和原始卵泡形成的调节过程中 GPR30 不发挥介导作用。这表明关于 GPR30 是否作为一种雌激素膜受体对生殖系统发挥作用目前仍存在一定的争议。因此,本试验拟通过对小鼠发情周期卵巢中 GPR30 分布和 GPR30 mRNA 表达的研究,探讨 GPR30 与动物发情周期的关系,并为进一步研究 GPR30 在介导的雌激素对卵巢的作用提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及分组 雌性昆明白品系小鼠 40 只,3~4 周龄,体重 20~25 g,购于第四军医大学实验动物中心。在室温 22℃,光照 14 h(6:00~20:00),黑暗 10 h,自由取食、饮水条件下适应性饲养 1 周。根据小鼠阴道涂片将其分为发情前期、发情期、发情后期和间情期 4 组,每组 10 只,其中 5 只用于免疫组化研究,5 只用于 RT-PCR 研究。

1.1.2 引物设计及合成 根据 GenBank 发表的小鼠 GPR30 基因序列,用 Beacon Designer 7.9 软件设计引物,由上海生工生物工程公司合成,以持家基因 β -actin 作为内参。GPR30 基因上下游引物序列为:

(F) 5'-TTCATCAGTGTCCACCTAC-3'

(R) 5'-CGTCTTCTGCTCCACATA-3'

目的片段大小为 198 bp。 β -actin 基因上下游引物序列为:

(F) 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'

(R) 5'-CTGGGTCATCTTTTCACGGT-3'

目的片段大小为 139 bp。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 SP 法检测卵巢中 GPR30 蛋白的分布 小鼠经水合氯醛(剂量为 0.75 mg·g⁻¹)腹腔麻醉后,打开胸腔,先用 20 mL 生理盐水经左心室冲洗血液,再用 40 g·L⁻¹ 多聚甲醛固定液 20 mL 灌注固定,然后取卵巢放入相同的固定液中后固定 24 h;常规石蜡切片制备;用 0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸盐抗原修复液(pH 6.0)对切片进行抗原热修复。按照即用型免疫组织化学超敏 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明依次进行免疫组织化学染色:滴加 SP 试剂盒 A 液、B 液、C 液、D 液,依次各室温孵育 15、15、10 和 10 min,并在 B 液之后滴加兔抗鼠 GPR30 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, 1:200),4℃过夜;以上每步完成后均用 0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 5 min。DAB(福州迈新生物技术开发有限公司)显色 3~5 min,蒸馏水终止反应;脱水、透明、封片。阴性对照以 0.01

mol·L⁻¹ PBS 液(pH 7.4)代替一抗,其余步骤相同。

每组切片中各随机选取 5 张,在 400 倍显微镜下进行拍照,用江苏捷达 801 形态分析软件统计每个视野的阳性强度均值(用平均吸光度表示)和阳性面积,再计算出相对表达量(μ^2): $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{阳性强度均值} \times \text{阳性面积} / \text{像素}$,结果用“平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)”表示,用 SPSS 软件进行统计分析,采用单因素方差分析比较各组小鼠卵巢中 GPR30 的表达。

1.2.2 RT-PCR 检测卵巢中 GPR30 的 mRNA 水平 小鼠脱颈处死后,迅速取出卵巢,经液氮冷冻后研磨,移入匀浆器中,每 50~100 mg 组织加入 1 mL Trizol (TaKaRa)进行匀浆处理,之后按使用说明提取总 RNA,分光光度计测定所得 RNA 的 260/280 nm OD 值及浓度。按照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)说明,对得到的 RNA 进行反转录,反应体系为 20 μ L,所加 RNA 约 5 μ g。PCR 反应体系为 25 μ L: PCR Master Mix(2 \times) (Fermentas) 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L, cDNA 第一链产物 2.5 μ L,加无核酸酶水至 25 μ L。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,循环 40 次,最后 72℃延伸 10 min。 β -actin cDNA 特异性引物作为对照。PCR 反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察拍照,应用 Image J 软件得 GPR30 和 β -actin 基因 PCR 产物的灰度值,计算相对灰度值,计算结果用“平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)”表示,利用 SPSS 软件进行统计分析,采用单因素方差分析比较各组小鼠卵巢中 GPR30 mRNA 的表达。

2 结果与分析

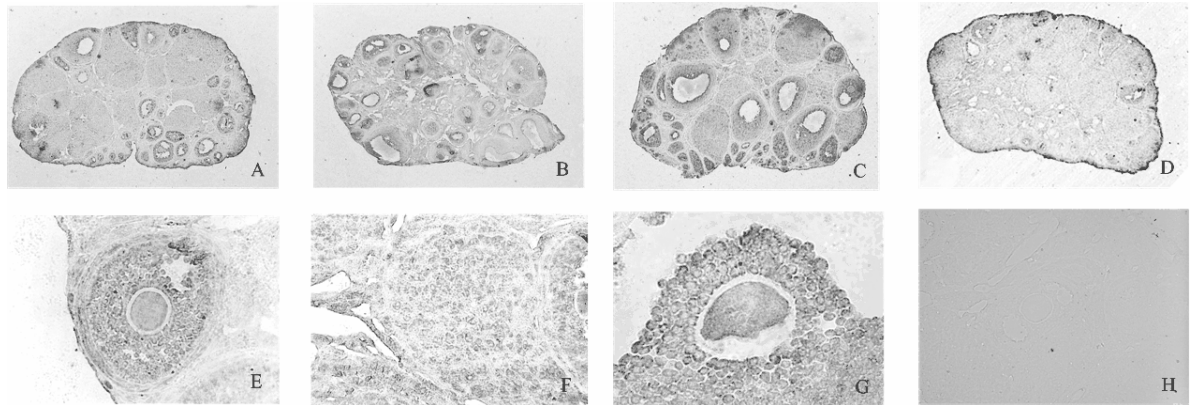
2.1 小鼠发情周期卵巢中 GPR30 的定位

GPR30 免疫反应阳性产物呈黄棕色分布于发情周期各时期卵巢中,在卵巢各级卵泡的颗粒细胞、卵母细胞、卵泡膜内膜细胞以及黄体细胞和间质细胞中均有分布(图 1-A、B、C、D)。其中以次级卵泡和成熟卵泡的颗粒细胞分布最多、着色最深,其阳性物质着色于细胞的胞膜和胞质,胞核不着色(图 1-E、G);在卵母细胞中 GPR30 阳性产物为全细胞强着色,较颗粒细胞着色稍浅;黄体中 GPR30 阳性产物表达较颗粒细胞弱,粒黄体细胞数量多,呈卵圆形,亦为胞膜和胞质着色;在黄体周边有少量的膜黄体细胞,细胞形态不明显,为全细胞着色(图 1-F),着色较弱。卵巢间质中有极弱的 GPR30 表达。

发情周期卵巢中 GPR30 的相对表达量呈规律

性变化, 发情前期、发情期、发情后期整体较高且以发情期最高, t 检验后 3 个时期差异不显著 ($P >$

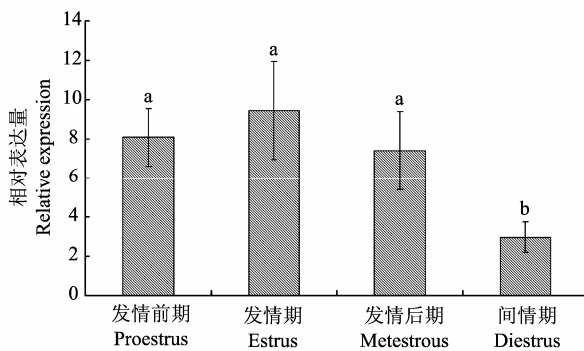
0.05), 间情期最低且极显著低于其他 3 个时期 ($P < 0.01$) (图 2)。



A-D. 发情前期、发情期、发情后期、间情期卵巢($\times 40$); E. 次级卵泡($\times 400$); F. 黄体($\times 400$); G. 卵丘($\times 1000$); H. 阴性对照组
A-D. Proestrus, Estrus, Metestrus and Diestrus ovary($\times 40$); E. Secondary follicle($\times 400$); F. Corpus luteum($\times 400$); G. Cumulus oophorus($\times 1\ 000$); H. Negative control

图 1 GPR30 在小鼠卵巢中的表达

Figure 1 Expression of GPR30 in mouse ovary

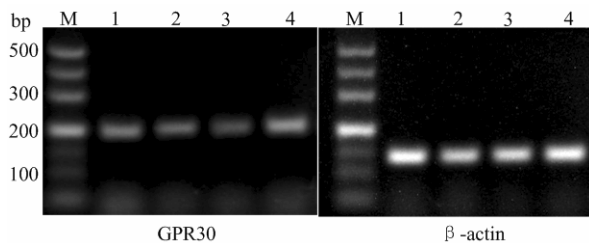


字母不同者为差异极显著($P < 0.01$), 相同者为差异不显著($P > 0.05$)。下同。

Different superscripts indicate significant differences with each other ($P < 0.01$), same superscripts indicate no significant differences with each other ($P > 0.05$). The same below.

图 2 GPR30 在小鼠发情周期卵巢中的相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of GPR30 in ovary during estrous cycle



1. 间情期; 2. 发情前期; 3. 发情期; 4. 发情后期;
M. DNA Marker
1. Diestrus; 2. Proestrus; 3. Estrus; 4. Metestrus; M. DNA Marker

图 3 GPR30 mRNA 在小鼠发情周期卵巢中的表达

Figure 3 Expression of GPR30 mRNA in ovary during estrous cycle

2.2 小鼠发情周期卵巢中 GPR30 mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示, GPR30 mRNA 在小鼠不同发情时期卵巢中都有不同程度的表达 (图 3), 其中间情期最低, 发情期最高。通过对各期卵巢中 GPR30 mRNA 和 β -actin mRNA 的相对灰度值比分析, 小鼠间情期卵巢中 GPR30 mRNA 的表达极显著低于其它 3 个时期 ($P < 0.01$), 小鼠发情期卵巢中 GPR30 mRNA 的表达极显著高于其它 3 个时期 ($P < 0.01$) (图 4)。

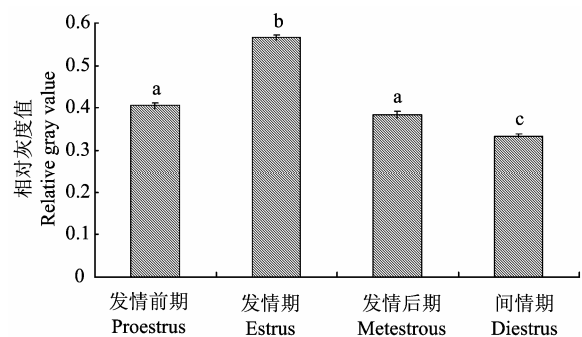


图 4 GPR30 mRNA 在小鼠发情周期卵巢中的相对表达水平
Figure 4 Relative expression levels of GPR30 mRNA in ovary during estrous cycle

3 讨论

已证实雌激素通过其经典的雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 发挥其增进卵母细胞的成熟、促进颗粒细胞的增殖与分化以及卵泡发育等作用^[9], 但人们同时发现 ER 并不能介导雌激素所有的功能^[10]。近年研究证实, 雌激素还可以通过

GPR30 介导的快速的非基因组机制影响生殖系统的功能^[2-6]。

Wang 等^[2]通过免疫荧光技术研究发现, GPR30 在仓鼠卵巢的卵母细胞、卵泡颗粒细胞、膜细胞、黄体细胞和间质细胞中都有表达, 本试验免疫组化结果与其相一致, Hazell 等^[11]也证明 GPR30 在大鼠卵巢中主要位于卵泡颗粒和膜细胞中; 同时 GPR30 免疫反应阳性产物也主要定位于细胞的胞膜和胞质中, 表明其作为一种膜受体并进入胞内相应部位如内质网和核周区等, 进而触发下游的信号途径^[12]。GPR30 主要在各级卵泡的颗粒细胞和膜细胞中表达, 以次级卵泡和成熟卵泡中阳性产物最多, 呈色最深, 表明 GPR30 作为一种雌激素膜受体介导了雌激素对卵泡生长和发育的非基因组机制调节过程; 黄体中 GPR30 阳性产物以粒性黄体细胞着色较强, 而膜黄体着色较弱, 这与粒性黄体主要分泌孕激素, 膜性黄体主要分泌雌激素的功能不一致, 推测 GPR30 可能还通过其他途径介导黄体细胞的功能, 但具体的原因和作用途径还有待于进一步研究。同时, 本试验发现在各级卵泡的卵母细胞中均有 GPR30 表达, 这与其他研究者在斑马鱼和仓鼠的研究结果相一致, 并且 Pang 等^[4-5]发现对体外斑马鱼卵泡进行雌激素以及 GPR30 的激动剂 ICI 182780、他莫昔芬和 G1 处理时, 会导致卵母细胞成熟率降低。表明 GPR30 还介导了雌激素对卵母细胞成熟的调节作用。

Wang 等^[2]发现 GPR30 的表达受动情周期的影响, 以及促性腺激素和甾类激素的调节, 他们对切除了垂体的仓鼠进行促性腺激素处理时, FSH 单独或同 LH 一起处理, 可以引起卵泡颗粒细胞中 GPR30 的高表达; LH 单独作用则可以显著增加卵泡膜细胞中 GPR30 的表达; 对体外培养的人的颗粒细胞进行促性腺激素处理时, 发现 FSH 和 LH 也可增加 GPR30 的表达^[13]。本试验结果显示小鼠发情周期卵巢 GPR30 相对表达量呈规律性变化, 且与发情周期中体内雌激素的变化规律基本一致^[14-15]; 小鼠发情周期卵巢中 GPR30 mRNA 的表达量与 GPR30 蛋白表达量变化规律基本一致。进一步提示 GPR30 介导了发情周期雌激素对卵巢的作用。

本研究结果显示 GPR30 在小鼠卵巢中的表达分布与卵泡发育有密切关系, 并且 GPR30 及其 mRNA 表达规律与体内雌激素水平相适应, 且二者随发情周期卵泡生长变化而变化, 表明 GPR30 参与了雌激素对卵巢中卵泡生长和发育、卵母细胞成熟

的调节作用, 为进一步研究 GPR30 在卵巢中的作用提供了一定的依据。

参考文献:

- [1] Revakar C M, Cimino D F, Sklar L A, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1625-1630.
- [2] 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.
- [3] Wang C, Prossnitz E R, Roy S K. G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(9): 4452-4461.
- [4] Pang Y F, Thomas P. Involvement of estradiol-17 β and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30(GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 161(1): 58-61.
- [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] Gao F, Ma X, Ostmann A B, et al. GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor alpha (ER α) phosphorylation signals[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1434-1437.
- [7] Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, et al. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 80(1): 34-41.
- [8] Chen Y, Breen K, Pepling M E. Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary[J]. *Journal of Endocrinology*, 2009, 202(3): 407-417.
- [9] Sakauchi H, Fujimoto J, Hong B L, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat ovary[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2005, 94(1/3): 83-91.
- [10] Pietras R J, Szego C M. Endometrial cell calcium and estrogen action[J]. *Nature*, 1975, 253(5490): 357-359.
- [11] Hazell G G, Yao S T, Roper J A, et al. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues[J]. *Journal of Endocrinology*, 2009, 202(2): 223-236.
- [12] Cheng S B, Graeber C T, Quinn J A, et al. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus[J]. *Steroids*, 2011, 76(9): 892-896.
- [13] Pavlik R, Wypior G, Hecht S, et al. Induction of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and nuclear steroid hormone receptors by gonadotropins in human granulosa cells[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2011, 136(3): 289-299.
- [14] 郑可佳, 杨彩荣, 张岩, 等. ER β /p-ER β 在小鼠发情周期卵巢内的表达[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(7): 85-89.
- [15] Skipper J K, Young L J, Bergeron J M, et al. Identification of an isoform of the estrogen receptor messenger RNA lacking exon four and present in the brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(15): 7172-7175.