

# 产蛋鸡与休产鸡肝脏、 输卵管雌激素受体含量的比较

邵 凯 汪琳仙

(北京农业大学动物生理教研组)

## 摘 要

本试验选用正在产蛋和休产的来航鸡, 用放射配体结合分析法, 分别测定两组鸡的肝脏和输卵管胞浆和胞核受体含量。胞浆液的蛋白含量用考马斯亮蓝 G 250 法测定; 胞核 DNA 含量用紫外吸收法测定。试验结果表明: 两组鸡的肝脏和输卵管的胞浆雌激素受体含量均无明显差异; 两组鸡的肝脏和输卵管的胞核雌激素受体含量, 产蛋鸡肝脏的胞核雌激素受体是休产鸡的 15 倍, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而输卵管的胞核雌激素受体差异不明显。

关键词 雌激素受体, 肝脏, 输卵管, 蛋鸡

## 前 言

在哺乳动物, 雌激素受体的研究较深入, 从分布<sup>[1]</sup>、提纯、结构分析<sup>[2]</sup>、功能及其作用机制<sup>[3,4]</sup>已有许多报道, 而在禽类这方面的工作报道还很少, 往往是在研究雌激素作用机理时, 应用鸡的输卵管材料<sup>[5]</sup>, 有关鸡肝脏雌激素受体研究的资料尚未见到。

禽类卵巢雌激素分泌是有规律的, 产蛋鸡血中雌二醇含量在排卵前数小时形成高峰<sup>[6]</sup>, 此时肝脏对脂肪和蛋白质等卵黄成分的合成量大大增加, 在此期间, 输卵管组织细胞的活动也有变化<sup>[7]</sup>。为了解禽类卵巢雌激素分泌量的变化对靶组织特异性受体的影响, 本试验选用排卵前 6 ~ 2 小时的产蛋鸡和休产鸡, 检测其肝脏和输卵管组织的胞浆及胞核雌激素受体含量, 并进行比较。为进一步研究禽类排卵和蛋形成的调控提供基础资料。

## 材 料 与 方 法

### 一、实验动物和主要药品

成年来航系产蛋鸡和休产鸡各 5 只 (由本校畜牧系鸡场提供)。产蛋鸡在连续产蛋期间, 产蛋前数小时 (即排下一个卵前约 6 ~ 2 小时), 放血处死, 分别在肝脏和输卵管 (膨大部) 的相同部位取样, 用缓冲液冲洗后, 放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 另 5 只休产鸡 (停产的蛋鸡) 的取样和保存方法同产蛋鸡。

(<sup>2,4,6,7-<sup>3</sup>H</sup>) 雌二醇 (中国科学院上海原子核研究所产品, 比活性 107Ci/mmol), 二巯苏糖醇 (DTT, Serva 产品), 活性碳和葡聚糖 (上海内分泌研究所提供), 2,5-二苯基噁唑 (PPO), 1,4-双-[5-苯基噁唑基-2]苯 (POPOP), 考马斯亮蓝 G 250, 二烷基硫酸钠

\* 本文于 1991 年 2 月 28 日收到。

(SDS), 蛋白酶K (华美公司), 己烯雌酚 (DES)。

## 二、方法

胞浆雌激素受体 (ER) 和胞核 ER 定量均采用放射配体结合法<sup>[8,9]</sup> (一点法<sup>[14]</sup>) 测定。

1. 胞浆 ER 的定量测定: 分别取肝脏和输卵管300~400毫克, 加4~5毫升冷却的 TED 缓冲液 (0.01M Tris, 0.0015M EDTA, 0.001M DTT, pH7.4), 将组织剪碎, 进行匀浆, 均在冰浴中操作。然后以800~900 g 离心20分钟, 取上清液进行胞浆受体测定, 沉淀物做核受体测定。

上清液进一步在 24000 g 下离心20分钟, 得上清液即为胞浆受体液。取小试管, 每个样品分 A 和 B 两组管, 分别加以下试剂: A 组 (双管平行) 加 50 $\mu$ l <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (终浓度20nM), 50 $\mu$ l TED 缓冲液; B 组 (双管平行), 加 50 $\mu$ l <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (20nM 终浓度), 50 $\mu$ l DES (2 $\mu$ M 终浓度)。以上各管均加入 400 $\mu$ l 胞浆受体液, 使总体积为 500 $\mu$ l, 置 30°C 温育30分钟, 冰浴 5 分钟, 终止反应; 加 DCC 吸附液 (1% 活性碳, 0.1% 葡聚糖) 250 $\mu$ l, 4°C 下反应 10 分钟; 于 800 g 离心10分钟, 将上清液倒入盛有5ml 闪烁液 (0.5% PPO, 0.01% POPOP, 溶于二甲苯) 的测定瓶中, 过夜; 再将测定瓶置于液闪仪测定每分钟放射性的脉冲数 (CPM)。所得结果以 A 组管 CPM 的平均值减去 B 组管 CPM 的平均值, 即得特异结合的 CPM 值。再换算成受体含量/mg Pr.。

胞浆受体液的蛋白含量以考马斯亮蓝 G 250法<sup>[10]</sup>进行测定。

2. 胞核 ER 定量测定: 分离胞浆液后所得的沉淀, 加入 4~5ml TED 缓冲液, 混匀, 离心, 弃上清液, 重复 3 次, 加入 4ml TED 缓冲液混匀。取小试管, 每个样品分 A 和 B 两组管, 加入以下试剂: A 组 (双管平行), 50 $\mu$ l <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (20nM 终浓度), 50 $\mu$ l TED 缓冲液; B 组 (双管平行), 50 $\mu$ l <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (20nM 终浓度), 50 $\mu$ l DES (2 $\mu$ M 终浓度)。各管加入 400 $\mu$ l 核受体液, 于 30°C 温育60分钟, 离心, 弃去上清液, 核沉淀加入 1.5ml TED 缓冲液, 混匀后, 于 800 g 离心10分钟, 重复 3 次。所得沉淀加 1ml 无水乙醇提取 <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>, 30°C 温育10分钟; 800 g 离心10分钟, 将上清液倒入盛有 5ml 闪烁液的测定瓶内, 放置 1 小时, 置于液闪仪测定 CPM。以 A 管的 CPM 值减去 B 管的 CPM 值, 即为特异结合的 CPM 值。然后再换算成受体含量 /mg DNA。

胞核受体液 DNA 含量测定<sup>[11]</sup>: 取核受体液 200 $\mu$ l 于 1.5ml 的 Eperndorf 管中, 加蛋白酶 K (终浓度 100 $\mu$ g/ml) 和 SDS (终浓度 0.5%), 50°C 温育 5~6 小时; 加等体积酚, 充分混匀抽提 5 分钟, 离心 5 分钟, 取上层液; 加等体积的酚/氯仿 (1:1) 抽提; 再加等体积氯仿抽提; 上层液加入 0.8CM 宽的透析袋内, 用 TE 液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 透析, 室温 1~2 小时, 去除 SDS, 更换 TE 液 1~2 次, 于 4°C 下搅拌过夜; 将样品取出, 适当稀释后, 取 400 $\mu$ l 比色, 测定其在 260nm 和 280nm 波长处的 O. D 值, 以 TE 液作空白, 计算每毫升样品 DNA 含量, 并换算成每 400 $\mu$ l 核受体液中的 DNA 含量, 单位为 mg DNA/400 $\mu$ l 核受体液。

## 结 果

### 一、产蛋鸡与休产鸡肝脏、输卵管胞浆 ER 测定结果

测得产蛋鸡肝脏和输卵管胞浆 ER 为  $11.59 \pm 4.58$  fmol/mg pr. 和  $6.23 \pm 3.16$  fmol/mg pr.;

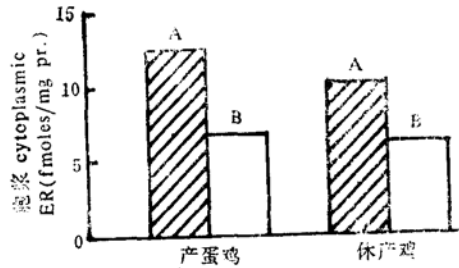


图1 产蛋鸡与休产鸡肝脏和输卵管胞浆ER含量

Fig. 1 The cytoplasmic ER contents in the liver and oviduct of laying and non-laying hens

A—liver B—oviduct n=5

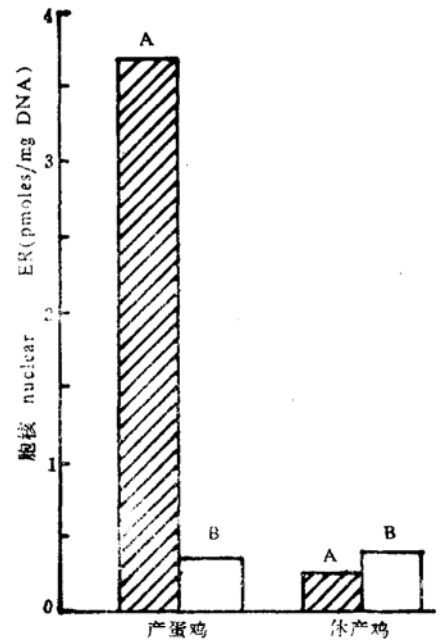


图2 产蛋鸡与休产鸡肝脏和输卵管胞核ER含量

Fig. 2 The nuclear ER contents in the liver and oviduct of laying and non-laying hens

A—liver B—oviduct n=5

休产鸡为 $9.44 \pm 5.28$  fmol/mg pr. 和  $5.86 \pm 4.4$  fmol/mg pr.。尽管产蛋鸡的结果均高于休产鸡，但两组鸡的肝脏之间和输卵管之间并无显著性的差异。而且无论肝脏或输卵管的胞浆ER水平都较低（见图1）。

## 二、产蛋鸡与休产鸡肝脏、输卵管的核ER含量的测定结果

产蛋鸡肝脏的胞核ER含量 ( $3.72 \pm 2.5$  pmol/mg DNA) 显著高于休产鸡肝脏的胞核ER含量 ( $0.25 \pm 0.09$  pmol/mg DNA),  $P < 0.05$ , 是休产鸡的15倍。输卵管的胞核ER含量在两组鸡之间 (产蛋鸡  $0.34 \pm 0.20$  pmol/mg DNA, 休产鸡  $0.40 \pm 0.22$  pmol/mg DNA) 差异不显著 (见图2)。

## 讨 论

卵黄的成分主要包括卵黄蛋白原和一类富含甘油三脂的脂蛋白。它们由肝脏合成，通过血液转运到卵巢，并进入生长中的卵泡<sup>[12]</sup>。本实验对肝脏和输卵管组织中ER的测定结果发现胞浆ER的含量在产蛋鸡和休产鸡都很低，而产蛋鸡肝脏的胞核ER含量要比休产鸡高约15倍，差异显著。由于我们是在产蛋鸡即将产蛋之前取其肝脏和输卵管的，此时恰好处

于下一个卵排放之前6~2小时,正是雌二醇分泌的高峰期<sup>[6]</sup>,产蛋鸡的E<sub>2</sub>分泌量明显高于休产鸡;此时测得肝脏的胞核ER含量增多,提示可能是由于雌二醇的调节作用。表明胞核ER数量的变化在介导雌二醇对合成卵黄的蛋白质和脂类过程中可能有着重要的作用。同时,这一结果支持了McNaught<sup>[13]</sup>等提出的E<sub>2</sub>与ER的“核定位模型”。他们的实验证明,E<sub>2</sub>的作用方式主要是直接进入细胞核与核内的特异受体结合。认为胞浆中的受体仅仅是从胞核内移出的。因此,处于E<sub>2</sub>分泌高峰期的产蛋鸡肝脏核受体比休产鸡的显著增加,可能是E<sub>2</sub>进入胞核对受体的上调作用。至于输卵管核受体二组鸡之内无明显差异,是否由于蛋形成过程的不同阶段输卵管ER有着自身的变化规律,有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Jensen, E. V., and DeSombre, E. R. Estrogen-receptor interaction. Estrogenic hormones effect transformation of specific receptor proteins to a biochemically functional form. *Science*. 182, 1973, 126~133.
- [2] Greene, G. L., and Press, M. F. Steroid receptor structure. Structure and dynamics of the estrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* 1986, 24, 1~7.
- [3] Welshons, W. V., et al. Nuclear localization of unoccupied receptors for glucocorticoids, estrogens, and progesterones in GH3 cells. *Endocrinol.* 1985, 117, 2140~2147.
- [4] King, W. J. and Greene, G. L. Mono clonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*. 1984, 307, 745~747.
- [5] Joab, I. et al. Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormone. *Nature*. 1984, 308, 850~853.
- [6] Johnson, A. L., and Tienhoven, A. Van. Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biol. Reproduction*. 1980, 23, 386~393.
- [7] 田名部雄一. 家畜生理生化学. 养贤堂, 东京. 1978, 254~256.
- [8] Katzenellenbogen, J. A. et al. Studies on the uterine, cytoplasmic estrogen binding protein. Thermal stability and ligand dissociation rate. An assay and filled sites by exchange, *Biochemistry*. 1973, 12:4091.
- [9] Anderson, J. et al. Estrogen and nuclear binding sites; determination of specific sites by <sup>3</sup>H-estradiol exchange, *Biochem. J.* 1972, 126:561.
- [10] Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248~254.
- [11] 张龙翔等. 生化实验方法与技术. 人民教育出版社. 1981, 221~223.
- [12] Griffin, H. D. et al. Yolk formation. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Vol. 5. Academic Press. 1984, 345~380.
- [13] McNaught, R. W. et al. Receptor interconversion model of hormone action. I. ATP-mediated conversion of estrogen receptors from a high to lower affinity state and its relationship to antiestrogen action. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 17011~17017.
- [14] 王迺功等. 雌酮和16, 17-吡唑雌酮对大鼠子宫雌激素受体的作用. *药理学报*, 1986, 21(2):98~101.

## QUANTITATIVE STUDY ON ESTROGEN RECEPTORS OF HEN LIVERS AND OVIDUCTS

Shao Kai, Wang Linxian

*(Department of Animal Physiology and Biochemistry,  
Beijing Agricultural University, 100094, Beijing)*

### Abstract

Using radio-ligand binding assay, we quantified the estrogen receptors in the liver and oviduct of laying and non-laying hens. The cytoplasmic estrogen receptor contents in the liver and oviduct of the two groups of hens were very low. There was no significant difference between the two groups. The concentrations of estrogen receptors in the nuclear fractions of liver tissue between the two groups were significantly different, 3.72 picomoles/mg DNA in laying, and 0.25 picomoles/mg DNA in non-laying. No significant difference in nuclear estrogen receptor contents of oviduct was found between the two groups of hens.

**Key words** Estrogen receptors, Liver, Oviduct, Hen