

文章编号: 0253-2239(2010)s100502

激光共聚焦显微技术对小鼠乳腺中瘦素及其长型受体的定位与定量研究

林 叶 李庆章

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要 瘦素(Leptin)通过作用于长型受体(OB-Rb)调控乳腺的发育和泌乳。为阐明小鼠乳腺发育循环过程中瘦素和 OB-Rb 的表达含量和表达部位的变化,采用间接免疫荧光和激光共聚焦显微技术对青春期、妊娠期、泌乳期和退化期的小鼠乳腺中瘦素和 OB-Rb 的表达含量和表达部位进行检测。结果表明:乳腺脂肪垫、导管上皮细胞和腺泡上皮细胞中均可检测到瘦素的表达,导管上皮细胞和腺泡上皮细胞的基底侧可以检测到 OB-Rb 的表达。乳腺中瘦素和 OB-Rb 的表达变化趋势一致,在青春期最高,妊娠期下降,泌乳期维持低水平,退化期重新上调,恢复到青春期水平。相关性分析显示瘦素和 OB-Rb 的表达呈显著正相关($r=0.941$, $P\leq 0.01$)。

关键词 光学与生物技术;定位与定量;激光共聚焦显微技术;乳腺;瘦素;长型瘦素受体

中图分类号 O334 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201030.s100502

Research on Localization and Quantification of Leptin and Its Long form Receptor in Mouse Mammary Gland by Laser Scanning Confocal Microscopy

Lin Ye Li QingZhang

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract Leptin and its long form receptor (OB-Rb) were expressed in many tissues including mammary gland. To elucidate the expression location and relative expression quantity of leptin and OB-Rb in different development stage of mouse mammary gland, the expression and localization of leptin and OB-Rb were detected by introducing indirect immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. The images required were analyzed by Image Pro 5.0 Plus and the quantification of leptin and OB-Rb were represented by gray value. The results showed that leptin was detected in mammary fat pad, ductal epithelial cells and acinar epithelial cells. OB-Rb was detected on the basal surface of ductal epithelial cells and acinar epithelial cells. The expression variations of leptin and OB-Rb reached the highest level in virgin, and then decreased in pregnancy. In lactation, the expression of leptin and OB-Rb become lower. After offspring withdrew, the expression of leptin and OB-Rb increased and recovered to the original level of about virgin. The expression quantity of leptin was a little higher than OB-Rb in the whole development cycle. Correlative analysis showed that there was a positive correlation between the expression of leptin and OB-Rb ($r=0.941$, $P\leq 0.01$).

Key words photology and biotechnology; localization and quantification; laser scanning confocal microscopy; mammary gland; leptin; long form receptor

OCIS codes 170.1790; 180.1790

收稿日期: 2010-03-20; 收到修改稿日期: 2010-05-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30671538)资助课题。

作者简介: 林 叶(1980—),女,博士,副教授,主要从事泌乳生物学与乳腺功能调控等方面的研究。

E-mail: linlu516@163.com

* 通信联系人。E-mail: qingzhangli@hotmail.com

本文电子版彩色效果详见中国光学期刊网(<http://www.opticsjournal.net>)

1 引 言

瘦素(Leptin)可由乳腺自身合成和分泌,直接影响乳腺的发育和泌乳。现有乳腺中瘦素及其受体表达的研究可分为细胞水平和整体水平。细胞水平研究表明,在小鼠乳腺上皮细胞系 HC11、人类乳腺上皮细胞以及培养的牛乳腺上皮细胞系(MAC-T)中可以检测到瘦素及其长型受体 mRNA 的表达^[1~4]。对乳腺中瘦素及其受体表达的整体水平研究表明,绵羊乳腺中有瘦素 mRNA 的表达,其表达水平在妊娠 80、106 和 112 天较低,妊娠 140 天上调,在整个泌乳期维持在低水平^[5]。RT-PCR 和原位杂交方法证明妊娠和泌乳期绵羊乳腺中表达长型和短型瘦素受体的 mRNA,特异性分布于乳腺上皮细胞中^[6]。采用 RT-PCR 方法在泌乳期和干乳期的牛乳腺组织也检测到瘦素及其长型和短型受体的 mRNA;泌乳期的牛乳腺中瘦素 mRNA 的表达高于干乳期;在泌乳期瘦素及其受体的 mRNA 主要在乳腺上皮细胞中表达,在干乳期则主要分布于基质^[7]。

资料显示,对乳腺中瘦素及其受体表达的研究多集中在转录水平,瘦素及其受体蛋白质水平上的表达在乳腺中的全面系统研究较少。为探讨瘦素及其受体在小鼠乳腺发育、泌乳以及退化过程中的表达部位和表达含量变化,本研究采用间接免疫荧光和激光共聚焦显微技术^[8],对小鼠乳腺不同发育时期瘦素及其受体表达部位进行鉴定,并与定量荧光测定、定量图像分析等研究手段相结合^[9],系统地检测了小鼠乳腺不同发育时期乳腺组织中瘦素及其受体的表达含量变化。

2 材料与方 法

2.1 样品采集

取青春期(出生后 20、25、30、35、40、45、50、55 和 60 天)、妊娠期(妊娠 1、4、7、10、13、16 和 19 天)、泌乳期(泌乳 1、4、7、10、13、16、19 和 22 天)和退化期(幼仔离乳后 4、7、10、13 和 16 天)的雌性昆明小白鼠腹部第 4 对乳腺作为实验材料,液氮冻存备用。为消除个体差异,每个时期分别取 3 只雌性昆明小白鼠的乳腺留样。

2.2 实验方法

取雌性昆明小白鼠腹部第 4 对乳腺的不同部位分别制作冰冻切片(厚度为 8 μm),冷丙酮固定 10 min 后,室温风干;然后用 PBS 缓冲溶液清洗 3

次,每次 5 min。将固定好的乳腺组织冰冻切片用 10%的山羊血清 37℃条件下封闭 2h,分别采用瘦素(sc-9014, Santa Cruz Biotechnology, Inc)和 OB-Rb(BA1234, Wuhan Boster Biological Technology, LTD)的抗体进行 4℃孵育过夜。次日经 PBS 缓冲溶液清洗组织切片后,采用 FITC-羊抗兔 IgG(BA1105, Wuhan Boster Biological Technology, LTD)37℃避光孵育 30 min。随后用 PI(P4170, Sigma)复染细胞核,抗荧光淬灭封片剂封片后激光共聚焦显微镜观察。

每个发育时期分别取 3 只雌性小白鼠的乳腺组织制作冰冻切片,每只乳腺取 3 张切片进行检测,每张切片选择 5 个不同视野进行观察,拍照。

2.3 数据处理与分析

瘦素和 OB-Rb 表达的荧光强度用 Image Pro 5.0 Plus 软件进行分析,以每个视野的平均光密度表示瘦素和 OB-Rb 的表达强度。所得数据用平均值±标准差表示,多组数据之间应用 SPSS 统计分析软件进行方差分析。

3 结 果

3.1 小鼠乳腺中瘦素和 OB-Rb 表达部位的变化

分别在每个检测时期取 3 只雌性昆明小白鼠腹部第 4 对乳腺,每个乳腺组织取不连续的切片 7 张,一张用于阴性对照,另外 6 张采用间接免疫荧光方法分别对乳腺组织切片中瘦素和 OB-Rb 的表达进行定位检测,所得结果如图 1 所示。

青春期 20 天,瘦素和 OB-Rb 主要在乳腺脂肪细胞中被检测到。青春期 25 天,瘦素存在于脂肪细胞、乳腺导管的帽细胞、体细胞以及围绕导管的基膜中;OB-Rb 主要存在于脂肪细胞、乳腺导管的帽细胞和体细胞中。青春期 30~35 天,瘦素在脂肪细胞、导管的体细胞、帽细胞以及围绕导管的基膜中均存在;OB-Rb 主要存在于脂肪细胞、乳腺导管的帽细胞和体细胞中。青春期 40 天~妊娠 13 天,瘦素在脂肪细胞、导管上皮细胞和基膜中被检测到;OB-Rb 在脂肪细胞和导管上皮细胞中被检测到。妊娠 16 天和整个泌乳期,瘦素在腺泡上皮细胞靠近基底侧被检测到,OB-Rb 存在于腺泡上皮细胞靠近基底侧的细胞膜上,表达具有细胞极性。幼仔离乳后乳腺组织退化,在退化 4~13 天,瘦素和 OB-Rb 的表达失去细胞极性,存在于成簇的上皮细胞和脂肪细胞中,退化 16 天,瘦素和 OB-Rb 主要存在于脂肪细胞中。

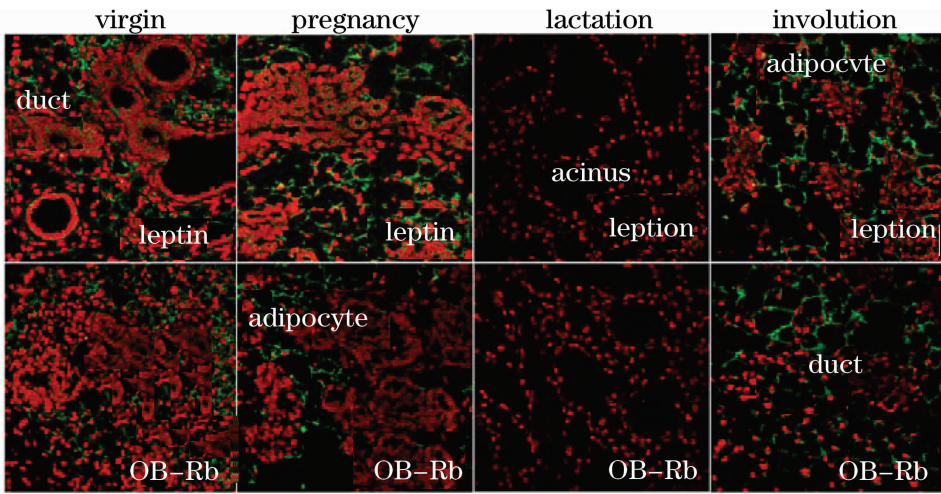


图 1 小鼠乳腺不同发育时期瘦素和 OB-Rb 表达部位的变化(400×)。红色为 PI 标记的细胞核，绿色为 FITC 标记的瘦素或 OB-Rb

Fig. 1 The localization of leptin and OB-Rb in mouse mammary gland (400×). Nuclear was stained by PI (red), leptin and OB-Rb was stained by FITC (green)

3.2 小鼠乳腺中瘦素和 OB-Rb 表达含量的变化

根据乳腺组织切片免疫荧光检测的激光共聚焦图片,采用 Image Pro 5.0 Plus 软件进行荧光强度分析,以每张图片的平均光密度表示瘦素和 OB-Rb 的表达含量。其中每个时期选 3 只体重相似的雌性昆明小白鼠进行取材,每只小鼠的乳腺组织取不同部位的 7 张切片进行实验,其中一张作为阴性对照,另外 6 张用免疫荧光方法分别对乳腺组织切片中瘦素和 OB-Rb 的表达进行研究。每张切片选择 5 个不同视野进行观察,拍照。各个检测时期瘦素和 OB-Rb 的表达情况以每个时期的平均光密度±标准差表示(表 1)。

由表 1 和图 2 可以看出,小鼠乳腺发育各个时期,瘦素和 OB-Rb 蛋白质水平的表达变化趋势相一致,但是 OB-Rb 的表达水平略低于瘦素。青春期 20~25 天,瘦素和 OB-Rb 的表达水平最高;青春期 30~50 天,瘦素和 OB-Rb 表达相对稳定,表达水平较高;青春期 55 天~妊娠 13 天,瘦素和 OB-Rb 的表达逐渐降低;妊娠 16 天,瘦素和 OB-Rb 的表达稍有回升;进入泌乳期(泌乳 4~16 天),瘦素和 OB-Rb 的表达显著下降,在整个泌乳期维持低水平;泌乳 16 天开始,瘦素和 OB-Rb 的表达回升;退化 13 天,瘦素和 OB-Rb 的表达恢复到青春期和妊娠早期的水平。

对乳腺发育各个时期瘦素和 OB-Rb 的表达做相关性分析,结果显示,其相伴概率值小于等于 0.01,表明瘦素和 OB-Rb 的表达呈显著正相关,相关系数 $r=0.941$ (图 3)。

表 1 小鼠乳腺中瘦素和 OB-Rb 蛋白质水平的表达含量变化

Table 1 Expression of leptin and OB-Rb in mammary gland of mouse

Period day	Leptin(average optical density ± standard deviation)	OB-Rb(average optical density ± standard deviation)
Virgin 20	4.457±0.221 ^a	3.249±0.178 ^a
Virgin 25	4.443±0.210 ^a	3.407±0.151 ^a
Virgin 30	3.980±0.242 ^b	2.451±0.193 ^{bc}
Virgin 35	3.701±0.181 ^b	2.296±0.231 ^{bcd}
Virgin 40	3.809±0.206 ^b	2.394±0.315 ^{bcd}
Virgin 45	3.647±0.225 ^b	2.237±0.203 ^{bcd}
Virgin 50	3.735±0.234 ^b	2.310±0.215 ^{bcd}
Virgin 55	3.080±0.212 ^c	2.201±0.260 ^{cd}
Virgin 60	2.662±0.153 ^{de}	2.049±0.262 ^d
Pregnancy 1	2.570±0.232 ^e	2.167±0.231 ^{cd}
Pregnancy 4	2.570±0.244 ^e	1.822±0.169 ^e
Pregnancy 7	2.516±0.216 ^{ef}	1.749±0.231 ^e
Pregnancy 10	1.421±0.179 ⁱ	1.118±0.207 ^g
Pregnancy 13	1.211±0.201 ^j	1.189±0.184 ^g
Pregnancy 16	1.958±0.159 ^h	1.384±0.144 ^f
Lactation 1	1.878±0.201 ^h	0.960±0.147 ^{gh}
Lactation 4	0.373±0.133 ^l	0.171±0.077 ^j
Lactation 7	0.752±0.136 ^k	0.310±0.153 ^{ij}
Lactation 10	0.798±0.168 ^k	0.547±0.182 ⁱ
Lactation 13	0.441±0.164 ^l	0.177±0.082 ^j
Lactation 16	0.276±0.132 ^l	0.200±0.089 ^j
Lactation 19	1.010±0.136 ^j	0.492±0.169 ⁱ
Involution 1	1.206±0.199 ^{ij}	0.704±0.196 ^h
Involution 4	2.285±0.215 ^{fg}	1.441±0.158 ^f
Involution 7	2.192±0.174 ^g	2.065±0.216 ^d
Involution 10	2.673±0.172 ^{de}	2.567±0.197 ^b
Involution 13	2.902±0.217 ^d	2.306±0.198 ^{bcd}
Involution 16	2.694±0.209 ^{de}	2.336±0.245 ^{bcd}

$n = 45$. Different small letters in the same array represented significant difference ($P < 0.05$)

根据表 1 的数据,绘出瘦素和 OB-Rb 表达变化趋势图(图 2)。

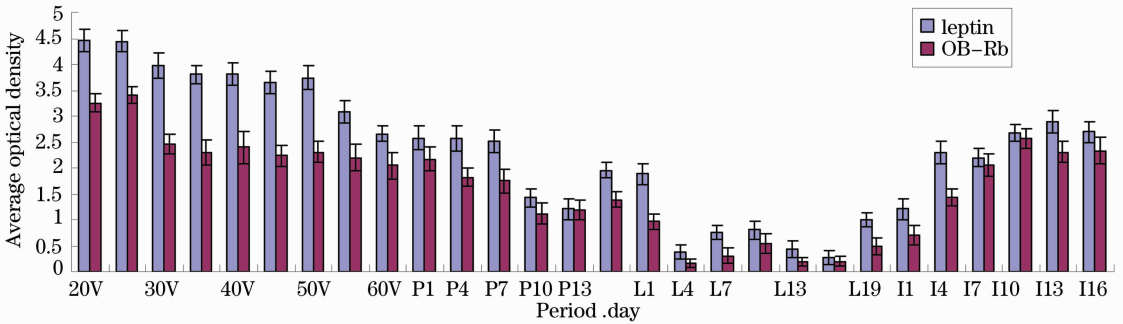


图 2 小鼠乳腺中瘦素和 OB-Rb 的表达变化趋势 V, 青春期; P, 妊娠期; L, 泌乳期; I, 退化期

Fig. 2 Expression of leptin and OB-Rb in mammary gland of mouse. V, P, L, I represents virgin, pregnancy, lactation and involution respectively

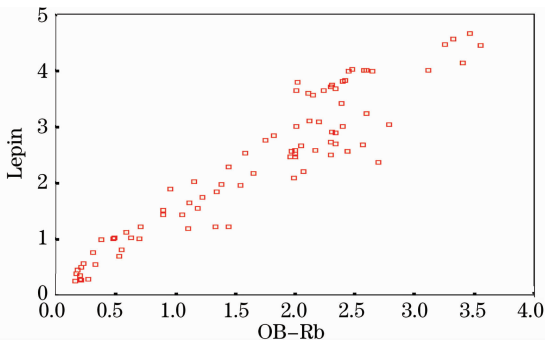


图 3 瘦素与 OB-Rb 表达相关性散点图

Fig. 3 Scatterplot of leptin and OB-Rb expression in correlations

4 讨 论

瘦素是影响乳腺发育和泌乳的细胞因子, OB-Rb 是单一的跨膜蛋白, 与瘦素有很高的亲和力, 瘦素通过这一单一跨膜受体发挥作用。对小鼠乳腺不同发育时期瘦素和 OB-Rb 蛋白质水平的表达与定位的研究表明, 乳腺脂肪垫和乳腺上皮细胞中均可以产生瘦素, 瘦素专一性地诱导 OB-Rb 在乳腺组织中表达。推测瘦素可能是一个自分泌和旁分泌因子, 直接通过受体激活来参与乳腺上皮细胞生长和凋亡的调控。

从小鼠乳腺发育、泌乳和退化过程中瘦素和 OB-Rb 的表达含量和表达部位变化可以看出, 瘦素及其受体的表达变化与乳腺发育过程中结构变化、泌乳机能以及退化期乳腺组织重建过程息息相关。青春期乳腺中瘦素的蛋白水平表达较高, 这是由于青春期乳腺实体组织较少, 大部分为脂肪垫结构, 而脂肪组织是瘦素合成和分泌的主要部位^[10]。青春期 25~30 天, 乳腺组织切片中可以观察到末端乳芽 (TEB) 结构。TEB 由成簇的体细胞和体细胞外单

层排列的帽细胞组成。在乳腺实体组织中, 检测到的瘦素存在于体细胞和帽细胞的边缘, 可能是由乳腺脂肪垫合成和分泌的瘦素通过短型瘦素受体的胞间转运功能运送到该靶位点, 与该细胞表面诱导表达的 OB-Rb 相结合而发挥生物学作用; 也可能是体细胞和帽细胞自身合成的瘦素, 通过自分泌和旁分泌作用于自身或周围的细胞, 促进导管发育。青春期 30~60 天, 乳腺导管逐渐发育成由单层导管上皮细胞合围而成的结构, 瘦素存在于导管上皮细胞和基膜中, 且位于细胞边缘, 可能与基质—上皮细胞的相互作用有关。

进入妊娠期, 在雌激素和孕酮的共同作用下, 乳腺导管开始分支。妊娠 16 天, 导管末端完全分化成功能性腺泡结构, 可以合成和分泌乳蛋白。此时检测到的瘦素是由乳腺腺泡上皮细胞自身合成和分泌的, 其表达部位靠近基底侧, 表现出一定的细胞极性, OB-Rb 也在乳腺上皮细胞靠近基底侧的细胞膜上表达。OB-Rb 是瘦素作用的靶位点, 乳腺上皮细胞合成的瘦素通过胞吐作用定向分泌到细胞外基底侧, 可与自身或邻近的细胞膜上的 OB-Rb 结合, 通过激活细胞内 JAK-MAPK 信号转导通路, 促进乳腺上皮细胞的增殖^[11, 12]。

进入泌乳阶段, 小鼠乳腺中瘦素的表达下降, 泌乳 4 天瘦素的表达水平较泌乳 1 天降低约 80%。从泌乳 4 天到泌乳 16 天, 乳腺中瘦素的表达一直维持在低水平。泌乳 19 天, 瘦素的表达开始升高。这与 Aoki 等用夹心 ELISA 方法检测的小鼠乳汁中瘦素的含量变化趋势一致^[13]。这表明泌乳期乳腺中瘦素蛋白表达的依赖性下调是乳腺组织自身调节的, 而不是通过循环内分泌系统影响血清中瘦素的水平所致。

幼仔离乳后, 乳腺退化在 12 h 内启动^[14]。在

乳腺退化过程中,乳腺组织功能性结构迅速消退,乳腺腺泡由于细胞凋亡的启动而瓦解。随着乳腺实体组织的瓦解,乳腺脂肪垫重新生成。在退化阶段,乳腺组织中瘦素的表达逐渐增加,到退化 13 d 已经恢复到青春期和妊娠初期的水平。此时瘦素主要在脂肪细胞和残存的导管上皮细胞中被检测到。这可能是因为瘦素是退化期诱导乳腺细胞发生凋亡的主要细胞因子。瘦素通过与 OB-Rb 结合,诱导 STAT3 的磷酸化,STAT3 则通过与 C/EBP δ 启动子结合,启动乳腺细胞凋亡^[15]。这表明瘦素是退化期诱导乳腺上皮细胞凋亡和乳腺组织重建的主要因素。

5 结 论

瘦素是影响乳腺发育循环的细胞因子,通过作用于 OB-Rb 发挥其生物调控作用。小鼠乳腺中瘦素与 OB-Rb 的表达成显著正相关,且在青春期较高,妊娠期下降,泌乳期维持低水平,退化期重新上调。其表达趋势和表达部位的变化显示瘦素可能在青春期和妊娠期参与调控乳腺导管的增殖、分支,在退化期诱导乳腺上皮细胞凋亡,为乳腺组织重建做准备。

参 考 文 献

- 1 M. Baratta, S. Grolli, C. Tamanini. Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells[J]. *Regul Pept*, 2003, **113**(1-3): 101~107
- 2 S. M. Smith-Kirwin, D. M. O'Connor, J. de Johnston *et al.*. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk[J]. *J. Clin. Endocrinol*, 1998, **83**: 1810~1813
- 3 J. L. Smith, L. G. Sheffield. Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, **22**(3): 145~154
- 4 L. Silva, M. Vandelaar, N. Weber *et al.*. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland[J]. *J Dairy Sci*, 2002, **85**(12): 3277~3286
- 5 M. Bonnet, I. Gourdou, C. Leroux *et al.*. Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of

- adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation[J]. *J. Anim Sci*, 2002, **80**: 723~728
- 6 K. Laud, I. Gourdou, L. Belair *et al.*. Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation [J]. *FEBS Lett*, 1999, **463** (1-2): 194~198
- 7 A. Sayed-Ahmed, M. Kulcsar, P. Rudas *et al.*. Expression and localization of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow [J]. *Acta Vet Hung*, 2004, **52**(1): 97~111
- 8 Xu He, Gao Meihua. He-Ne laser irradiation to the thymus area enhances CD59 expression and activation of cell signaling in T Cells of tumor-bearing Mice [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2603~2608
- 徐 鹤, 高美华. 氩氦激光照射胸腺区促进荷瘤小鼠 T 细胞的 CD59 表达与活化信号转导 [J]. *中国激光*, 2009, **36** (10): 2603~2608
- 9 Qubo, Li Qingzhang. Application of laser scanning confocal microscope in apoptosis in mammary gland [J]. *Journal of Northeseat. Agricultural University*, 2009, **40**(3): 121~125
- 曲 波, 李庆章. 激光共聚焦显微技术在乳腺细胞凋亡研究中的应用 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, **40**(3): 121~125
- 10 C. Roh, G. Thoidis, S. Farmer *et al.*. Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, **279**: E893~899
- 11 Y. Feuermann, A. Shamay, S. Mabeesh. Leptin up-regulates the lactogenic effect of prolactin in the bovine mammary gland in vitro [J]. *J Dairy Sci*, 2008, **91**(11): 4183~4189
- 12 M. Li, Q. Li, X. Gao. Expression and function of leptin and its receptor in dairy goat mammary gland [J]. *J Dairy Res*, 2010, **77**(2): 213~219
- 13 N. Aoki, M. Kawamura, T. Matsuda. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1427**: 298~306
- 14 P. Lee, J. Hwang, L. Mead *et al.*. Functional role of matrix metalloproteinases (MMPs) in mammary epithelial cell development [J]. *J Cell Physiol*, 2001, **188**: 75~88
- 15 Hou Xiaoming, Li Qingzhang. Apoptosis in mouse mammary gland cells and the impact of Leptin [J]. *Acta. Laboratoriam Animlis. Scientia Sinica*, 2008, **16**(1): 48~51
- 侯晓明, 李庆章. 小鼠乳腺细胞凋亡及瘦素对凋亡的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, **16**(1): 48~51