

雌二醇对蒙古绵羊输卵管上皮细胞内 -防御素(sBD-1)表达的影响

李淑凤 曹贵方* 宋艳华 姜丽萍 郭宏儒 邵艳红

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018; 内蒙古医学院基础医学院 呼和浩特 010059)

摘要: 为了探索雌二醇与 α -防御素(sBD-1)表达量的关系,体外模拟蒙古绵羊(*Ovis aries*)生理周期,用添加雌二醇浓度 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 的培养液及不添加雌二醇的培养液(即对照组)分别培养蒙古绵羊输卵管上皮细胞,作用 24 h、48 h、72 h 后,提取细胞总 RNA,应用 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 法进行定量分析。结果显示,添加不同浓度雌二醇培养的输卵管上皮细胞中 sBD-1 的相对表达量 0.000 740~0.001 758,与对照组 0.000 190 之间差异显著($P < 0.05$),且小于 10^{-8} mol/L 雌二醇添加浓度与 sBD-1 基因相对表达量变化基本呈正相关。此结果为进一步研究雌激素参与机体防御功能奠定了基础。

关键词: 雌二醇; 绵羊 α -防御素-1(sBD-1); 基因表达量; 输卵管上皮细胞; 蒙古绵羊

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)04-41-07

Effects of Estradiol on the Expression of α -Defensin-1 (sBD-1) in Epithelial Cells of Fallopian Tubes in the Mongolian Sheep

LI Shu-Feng CAO Gui-Fang* SONG Yan-Hua JIANG Li-Ping

GUO Hong-Ru SHAO Yan-Hong

(College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China)

Abstract: Fallopian tube epithelial cells of the Mongolian Sheep (*Ovis aries*) were cultured in the medium containing estradiol. Concentration of estradiol was 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} or 0 mol/L. After culturing for 24, 48, and 72 hours, total RNA was extracted and the cDNA encoding sBD-1 was amplified by RT-PCR, respectively. The results show that sBD-1 expression in Fallopian tube epithelial cells is evidently affected by estradiol treatment. There is a positive correlation between sBD-1 expression and estradiol concentration when the hormone is added less than 10^{-8} mol/L, while sBD-1 expression is decreased when estradiol concentration is more than 10^{-8} mol/L. The data are very important for understanding the relation between estradiol and the defensin.

Key words: Estradiol; Sheep α -defensin-1 (sBD-1); Gene expression level; Fallopian tube epithelial cell; Mongolian sheep

抗微生物肽是生物体内先天性免疫的重要组成部分^[1,2],在动植物界广泛存在,具有广谱抗菌活性^[3]。体外实验证明抗微生物肽可抗多种病原微生物,如革兰阴性和阳性细菌、分支杆菌、霉菌、螺旋体、被膜病毒等^[4];同时病原微

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30460093);

*通讯作者, E-mail: guifangcao@126.com;

第一作者介绍 李淑凤,女,硕士研究生;研究方向:动物组织胚胎发育与分子生物学; E-mail: shufengli33@126.com.

收稿日期:2008-02-01,修回日期:2008-04-28

生物保守分子,如革兰阴性细菌的LPS、革兰阳性细菌的磷壁酸、RNA病毒的双链RNA,提供刺激信号,诱导内源性抗微生物肽的合成,不需要细胞的增殖和分化,远比特异性抗体及细胞介导的获得性免疫反应来得简单和快速,可在感染后数小时内发挥其阻遏、延缓或消除病原微生物的作用^[5];而且内源性抗微生物肽具有特殊的抗性机理,即它们主要作用于病原微生物的细胞膜,病原微生物不易对其产生抗性。基于上述特点,内源性抗微生物肽一直是国内外学者研究的焦点。2006年,Seebah等构建了抗菌肽家族的防御素数据库(网址为 <http://defensins.bii.astar.edu.sg/>)^[6],收集了350多个防御素的序列、结构和活性信息,为抗菌肽的研究提供了极有价值的数据资源。

-防御素是一类新发现的富含半胱氨酸的抗微生物肽,其分子内含有由6个半胱氨酸残基形成的3对二硫键,广泛分布于哺乳动物和鸟类的上皮组织及白细胞内^[7]。大量实验已证明,-防御素是雌性生殖道天然免疫的重要组成部分,1998年,Bals^[8]报道鼠(*Mus musculus*)的-防御素存在于雌性生殖道的上皮细胞内,并且起抗菌作用;Quayle等^[9]研究了人(*Homo sapiens*)防御素5在雌性生殖道的基因表达、免疫定位及分泌;黄宁等^[10]发现人子宫颈黏膜能分泌抗菌多肽,其中-防御素在子宫颈抗菌机理中发挥重要作用。2002年,Wiesenfeld等^[11]研究了中性粒细胞防御素水平的提高与子宫内膜炎的关系,提出当盆腔受到感染时,病人的生殖道内中性粒细胞防御素水平比盆腔没有被感染的正常人要高。2003年,King等^[12]系统研究了自然抗菌肽-防御素3(HBD3)、-防御素4(HBD4)在人子宫内膜的差异表达。2004年,Yenugu等^[13]研究发现,人的附睾分泌的蛋白中有一种新的-防御素DEFB-118,且DEFB-118是一种精子结合蛋白,通过抑菌试验证明随着时间和剂量的增加其抗菌活性也增加。以上研究表明,人及鼠的生殖系统由于其特殊的生理功能,能够形成黏膜屏障,此屏障具有先天性免疫功能,也具有保护生殖健康的功能。

关于生殖道-防御素的研究主要涉及人类、小鼠,国内外对家畜、反刍动物生殖道防御素研究较少。本文主要研究绵羊-防御素1(sBD-1),实验通过体外模拟蒙古绵羊(*Ovis aries*)生理周期,在无菌条件下,添加不同浓度的雌二醇,培养输卵管上皮细胞,根据GenBank中已知的sBD-1 cDNA序列设计合成引物,利用荧光定量RT-PCR技术定量检测sBD-1基因相对表达量变化,进而探索雌二醇与sBD-1基因相对表达量变化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 成年、健康状况良好的间情期雌性蒙古绵羊,由呼和浩特市回民屠宰场提供。绵羊屠宰后立刻割取输卵管组织,放入生理盐水中备用。

1.2 主要仪器设备及试剂

1.2.1 仪器设备 Eppendorf 5417R 低温高速离心机,德国生物公司生产;TC-100 PCR仪、DNA Engine OPTICON CFD-3200,美国MJ生物公司生产;DYY 型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂生产;Tanon GS-1000 凝胶成像分析系统,天能科技(上海)生物公司生产;37 恒温培养箱等。

1.2.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、17-雌二醇(No:E2758)购自Sigma公司;总RNA极速抽提试剂盒 FASTA_{GEN}-RNA_{fast200} (Cat. No. 220010) 购自上海飞捷生物公司;SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit (No:DRR041S) 购自大连宝生物工程公司。

1.3 PCR引物的设计与合成 根据GenBank提供的羊sBD-1基因及内标基因-肌动蛋白(-actin)序列(U75250,AF035422),用Primer 5.0设计引物,引物由上海生工生物工程公司合成。所用引物序列见表1。

1.4 输卵管上皮细胞的培养

1.4.1 输卵管上皮细胞原代培养 于无菌条件下取蒙古绵羊输卵管,用0.1 mol/L PBS(含双抗)洗三次,然后用眼科剪刀剪开输卵管管腔,0.1 mol/L PBS冲洗三次,用灭菌刮刀轻刮输卵

管上皮细胞,将刮下来的上皮细胞吹打成单细胞,1 000 r/min 离心 10 min,以 1.0×10^5 个/ml 的浓度接种于 DMEM/F12 培养液中。置于

37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 培养箱中培养。约 48 h 可贴壁,每三天换液一次。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	基因片段长度 Gene fragment (bp)
羊防御素 sBD-1 Sheep α -defensin-1	上游:CTG TCT GCT GGG TCA GGA TTT AC 下游:AAC TTT GAA CAA AAT TTA TTC TGG TTT AAA TT	252
羊 α -肌动蛋白 Sheep α -actin	上游:GTC ACC AAC TGG GAC GAC A 下游:AGG CGT ACA GGG ACA GCA	208

1.4.2 传代培养 待原代的细胞 80 % 汇合后(约 7 d),弃去培养液,用 PBS 洗一次,加入 1 l 的 0.25 % 胰蛋白酶 0.02 % EDTA(Na)溶液,于 37 $^{\circ}$ C 消化 5 ~ 15 min,再加入含 20 % 血清的培养液终止消化,1 000 r/min 离心 8 min,吹打成单细胞,以 1.0×10^5 个/ml 接种于新的培养皿培养。传代细胞约 24 h 可贴壁,3 d 后约有 80 % 聚集长满。

1.4.3 激素添加量与作用时间 待传代细胞 80 % 汇合后换无血清培养液。处理 10 h 后,分别换加含 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、0 mol/L 雌二醇的无血清培养液,其中 10^{-8} mol/L、 10^{-10} mol/L 分别用来模拟生理状态下的发情期和妊娠期,以上浓度依据赵伟等^[14]文献提供的羊发情周期和妊娠期外周血浆中雌二醇浓度添加。各浓度分别培养 24 h、48 h、72 h,每隔 24 h 换一次培养液。

1.5 上皮细胞总 RNA 的提取 采用上海飞捷生物公司的总 RNA 极速抽提试剂盒,按其说明进行。最后用无 RNA 酶去离子水溶解 RNA 沉淀, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 荧光定量 RT-PCR

1.6.1 sBD-1 基因的 RT-PCR cDNA 第一链的合成参照 TaKaRa SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit 试剂盒说明书进行。RNA 逆转录反应体系为 10 μ l: 5 \times Prime Script Buffer(for Real Time) 2 μ l, Prime Script RT Enzyme Mix 0.5 μ l, Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 0.5 μ l, Random 6 mers (100

μ mol/L) 0.5 μ l, Total RNA 500 ng, 补加无 RNA 酶水至 10 μ l; 反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 保存,得到 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

cDNA 扩增反应体系总体积为 20 μ l: SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, Template cDNA 2 μ l, 无菌水 7 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 72 $^{\circ}$ C 读板, 80 二次读板, 40 个循环。PCR 反应结束后执行熔解曲线测定步骤。同时以不加模板的体系和 RNA 为模板的体系作对照,以排除试剂污染和基因组 DNA 污染引起假阳性的可能。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6.2 α -actin 基因的 RT-PCR RT-PCR 反应体系及反应条件均同于 1.6.1。

1.6.3 实时定量 PCR 扩增效率曲线制作 将 cDNA 以 10 倍浓度梯度进行稀释,分别做 sBD-1 基因和 α -actin 基因实时定量 PCR 扩增效率反应,反应体系及运行程序同 1.6.1,程序结束后机器自动给出不同浓度下 sBD-1 基因及 α -actin 基因 PCR 扩增效率曲线。

1.7 PCR 产物序列测定 定量 PCR 产物送上海生工生物工程公司进行基因序列测定。

1.8 sBD-1 基因的表达水平 取 1.4.3 培养的蒙古绵羊输卵管上皮细胞,提取 RNA,进行荧光定量 PCR,且每个时间段、每个浓度的样品分别重复 3 次,分别得到 sBD-1 基因和 α -actin 基因的 Ct 值,根据公式 $2^{-\text{Ct}}$ ^[15] 求出添加不同浓度雌二

醇蒙古绵羊输卵管上皮细胞 sBD-1 基因的相对表达量,其中 $C_t = C_t - \text{defensin} - C_t - \text{actin}$ 。

2 结果

2.1 细胞培养结果 准备培养的原代细胞形

态为圆形,细胞悬浮在液体中,极少数 3~5 个聚集。培养 48 h 后,细胞极少数聚集贴壁生长。培养 7 d 后细胞长成漩涡状排列的致密单层细胞集落(图 1)。传代细胞生长迅速,72 h 后即可有 80% 以上聚集生长。

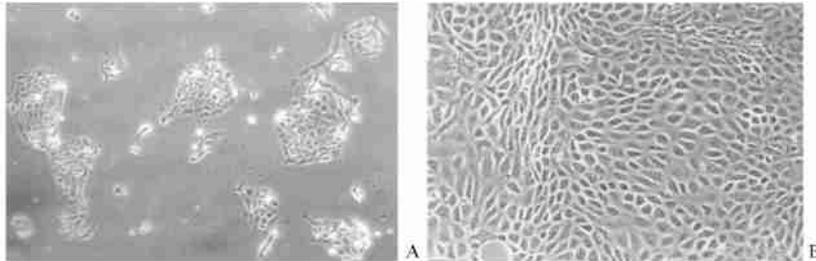


图 1 上皮细胞培养结果

Fig. 1 Epithelial cells after culture

A. 培养 48 h 后上皮细胞形态, $\times 16$; B. 培养 7 d 的上皮细胞形态, $\times 100$ 。

A. Epithelial cells 48 h after culture, $\times 16$; B. Epithelial cells 7 d after culture, $\times 100$.

2.2 RNA 及 RT-PCR 结果

RNA 经琼脂糖凝胶电泳,成像系统显示清晰的 28S 及 18S 条带,无明显 5S 条带降解(图 2)。

2.2.1 RNA 纯度及质量分析 所提取的总

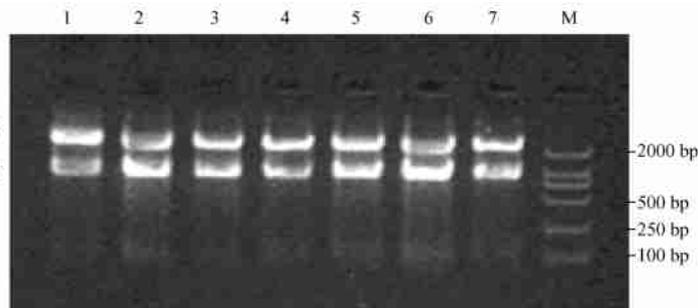


图 2 输卵管上皮细胞 RNA 电泳图

Fig. 2 The of electrophoretogram of total RNA in Fallopian tube epithelial cells

1~6. 分别为添加雌二醇 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} mol/L; 7. 不加激素的对照组; M. DL2000 DNA 分子量标准。

1 - 6. Estradiol 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} mol/L; 7. Control group; M. DL2000 DNA Marker.

2.2.2 标准品的鉴定 以含有 sBD-1 及 β -actin 基因片段的 cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增反应。产物经凝胶电泳显示条带清晰,片段长度正确(图 3)。经过测序证实其序列与 GenBank 中 sBD-1 及 β -actin 基因序列一致。

模板量对数值之间具有良好的线性关系,并拟合得出扩增效率曲线(图 4)。结果可见,sBD-1 相关系数为 0.994, β -actin 的相关系数为 0.992。

2.3 sBD-1 基因与 β -actin 基因的扩增曲线及扩增效率曲线 含 sBD-1 基因的标准品分别以 10 倍等比稀释(稀释成 4 个浓度)后做定量 PCR,所得到的 C_t 值与不同浓度标准品的初始

2.4 雌二醇对输卵管上皮细胞内 sBD-1 基因的相对表达量的影响

2.4.1 sBD-1 基因的相对表达量 由表 2 可知,添加不同浓度雌二醇,输卵管上皮细胞 sBD-1 基因的相对表达量较对照组(即不添加雌二醇培养的输卵管上皮细胞)均有所提高。

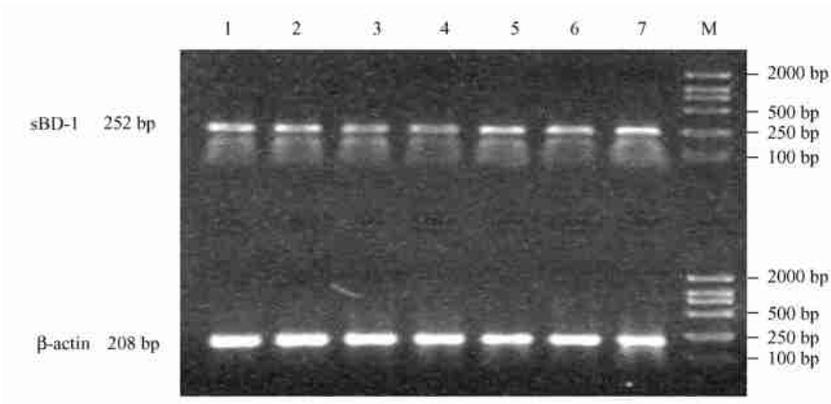


图 3 sBD-1 及 β -actin PCR 电泳图

Fig. 3 The electrophoretogram of PCR products of sBD-1 and β -actin

1. 对照组; 2~7. 分别添加雌二醇 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L; M. DL2000 DNA 分子量标准。

1. Control group; 2- 7. Estradiol 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L; M. DL2000 DNA Marker.

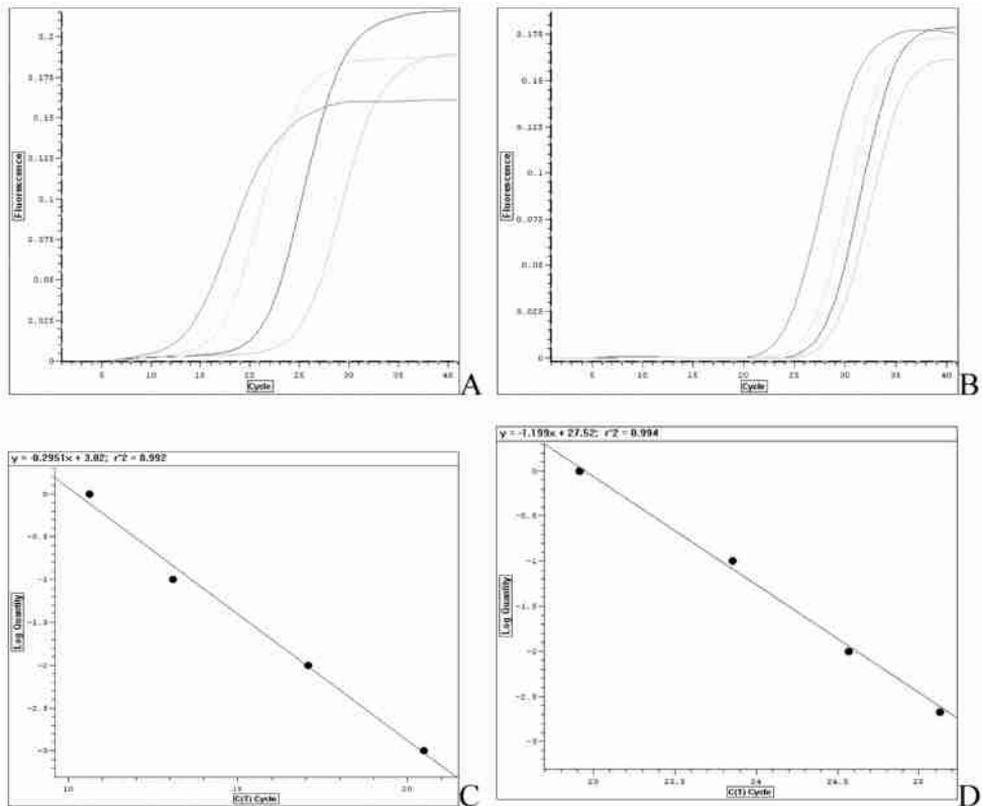


图 4 肌动蛋白与防御素的扩增曲线和扩增效率曲线

Fig. 4 The amplification curve and the amplification efficiency curve of β -actin gene and β -defensin gene

A. 肌动蛋白扩增曲线; B. 防御素扩增曲线; C. 肌动蛋白扩增效率曲线; D. 防御素蛋白扩增效率曲线。

A、B 横坐标为循环数,纵坐标为荧光强度; C、D 横坐标为循环阈值,纵坐标为初始模板量对数值。

A. The real time PCR amplification curve of β -actin gene; B. The real time PCR amplification curve of β -defensin gene;

C. The amplification efficiency curve of β -actin gene; D. The amplification efficiency curve of β -defensin gene. A, B X-axis show cycle; Y-axis show fluorescence; C, D X-axis show CT cycle; Y-axis show log quantity of original sample.

其中添加雌二醇 10^{-8} mol/L 的输卵管上皮细胞 sBD-1 基因相对表达量最高,而添加雌二醇 10^{-11} mol/L 的输卵管上皮细胞 sBD-1 基因相对表达量最低,基本接近于对照组。

表 1 添加不同浓度雌二醇对 sBD-1 基因表达的影响

Table 1 The influence of different concentrations of estradiol on sBD-1 expression

组别 Group (mol/L)	时间 Time (h)	Ct (Mean ±SD)	防御素的相对 表达量 2^{-Ct} The relative expression of sBD-1
对照组 Control group	24	12.33 ±0.20	0.000 195
	48	12.30 ±0.13	0.000 199
	72	12.36 ±0.03	0.000 190
10^{-11}	24	11.98 ±0.15	0.000 248
	48	12.09 ±0.10	0.000 229
	72	12.11 ±0.04	0.000 227
10^{-10}	24	10.39 ±0.06	0.000 746
	48	10.40 ±0.03	0.000 740
	72	10.38 ±0.02	0.000 752
10^{-9}	24	9.92 ±0.02	0.001 035
	48	9.82 ±0.09	0.001 110
	72	9.84 ±0.03	0.001 086
10^{-8}	24	9.36 ±0.10	0.001 528
	48	9.15 ±0.08	0.001 758
	72	9.27 ±0.18	0.001 629
10^{-7}	24	10.27 ±0.03	0.000 808
	48	10.28 ±0.02	0.000 806
	72	10.28 ±0.07	0.000 803
10^{-6}	24	10.61 ±0.02	0.000 638
	48	10.56 ±0.02	0.000 661
	72	10.61 ±0.01	0.000 640

2.4.2 雌二醇与细胞内 sBD-1 基因相对表达量的关系 用 SAS 9.0 统计软件分析表 2 数据,在 $P < 0.05$ 水平下,添加不同浓度雌二醇, sBD-1 基因的相对表达量均有显著差异,其中添加 10^{-8} mol/L 雌二醇与对照组之间差异极显著, 10^{-11} mol/L 雌二醇与对照组之间差异不显著,其他浓度与对照组之间差异均显著,而且,3 个不同培养时间之间差异不显著。此外每个浓度的 3 个重复之间差异不显著。结果表明,低浓度的雌二醇与 sBD-1 基因相对表达量变化基本呈正相关,但当浓度达到 10^{-8} mol/L 之后,继

续增加雌二醇浓度, sBD-1 基因的相对表达量不再增加,反而有所下降(图 5)。

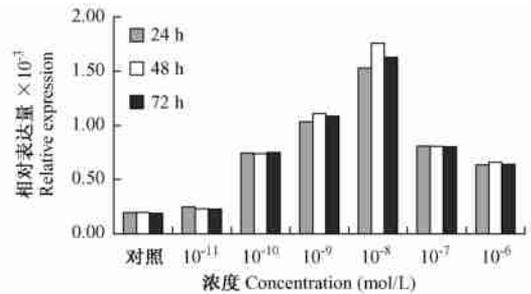


图 5 雌二醇与细胞内 sBD-1 相对表达量的关系

Fig. 5 The relationship between estradiol concentration and relative sBD-1 expression

3 讨论

-防御素作为一类大量存在于哺乳动物上皮组织内的内源性抗微生物肽,由于它们在非特异性免疫反应中占重要地位,国内外研究者非常重视其在感染免疫中的作用,其研究成果有可能为一些重要的感染性疾病的防治开辟新思路。

鉴于国内外对于反刍动物雌性生殖道 -防御素研究比较缺乏,进行 sBD-1 相对表达量变化及其与体内性激素之间关系的研究,对于探索 -防御素基因工程表达的可行性,了解反刍动物妊娠期间防御素表达调控的基本规律及在机体防御功能方面的作用均具有重大的意义。

本实验与白萨日娜《孕酮对绵羊输卵管上皮细胞 -防御素表达的影响》* 一文中讨论的孕酮与 sBD-1 表达量之间的关系相辅相成,实验结果表明,雌二醇与孕酮对生殖道 sBD-1 基因相对表达量均有促进作用。低浓度的雌激素接近于机体的生理状态,与 sBD-1 基因的相对表达量变化基本呈正相关,但当浓度达到 10^{-8} mol/L 之后,继续增加雌二醇浓度, sBD-1 基因的相对表达量不再增加,反而有所下降,推测大

* 白萨日娜. 孕酮对绵羊输卵管上皮细胞 -防御素表达的影响. 呼和浩特:内蒙古农业大学硕士学位论文,2006.

剂量的激素可能破坏细胞内部代谢平衡。由此得出,雌二醇在准备受精、妊娠期间大量分泌,能够促进 sBD-1 基因表达量的增加,从而增加机体抵抗力,保证怀孕过程的顺利完成。

本文为进一步研究雌性动物体内性激素与组织内 α -防御素的相对表达变化提供了理论依据,为动物生殖免疫学与内分泌学等方面的进一步研究奠定了初步基础,但是体内多种性激素对 α -防御素相互作用产生的影响、性激素对 α -防御素的影响机理、防御机制中还有哪些蛋白起到防御作用,以及各种蛋白之间的相互作用机理还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 61 ~ 92.
- [2] Ganz T, Lehrer R I. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol*, 1997, **34**: 343 ~ 354.
- [3] Thouzeau C, Maho YL, Froget G, *et al*. Spheniscins: avian α -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*. *Biol Chem*, 2003, **278**: 51 053 ~ 51 058.
- [4] Ganz T, Lehrer R I. Defensins. *Pharmacol Ther*, 1995, **66**: 191 ~ 205.
- [5] Medzhitov R, Janeway C A. Innate immunity impact: on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 1997, **9**: 4 ~ 11.
- [6] Seebah S, Suresh A, Zhuo S, *et al*. Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 2006, **7**: D1 ~ D4.
- [7] Lehrer R I, Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics: defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann NY Acad Sci*, 1996, **797**: 228 ~ 239.
- [8] Bals R, Mitchell J. Mouse α -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in Epithelia of the Lung and Urogenital Tract. *Infect Immun*, 1998, **66**(3): 1 225 ~ 1 232.
- [9] Quayle A J, Porter E M, Nussbaum A A, *et al*. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 1998, **152**(5): 1 247 ~ 1 258.
- [10] 黄宁,潘小玲,吴琦等. 子宫宫颈液抗菌多肽的分离. *华西医科大学学报*, 1998, **29**(1): 25.
- [11] Wiesenfeld H C, Heine R P, Krohn M A, *et al*. Association between elevated neutrophil defensin levels and endometritis. *Infect Dis*, 2002, **186**(6): 792 ~ 797.
- [12] King A E, Fleming D C, Critchley H O, *et al*. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *Reprod Immunol*, 2003, **59**(1): 1 ~ 16.
- [13] Yenugu S, Hamil K G, Radhakrishnan Y, *et al*. The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human α -defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial α -defensin. *Endocrinology*, 2004, **145**(7): 3 165 ~ 3 173.
- [14] 赵伟,王公金,徐晓波. 波尔山羊发情周期和妊娠期外周血浆中孕酮、雌二醇和睾酮的浓度变化. *江苏农业科学*, 2004, (3): 60 ~ 62.
- [15] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Methods*, 2000, **46**(1-2): 69 ~ 81.