

孕酮对蒙古绵羊输卵管上皮细胞 β -防御素 mRNA 表达的影响

唐博^{1,2}, 锡林高娃^{2,3}, 付本懂¹, 杜晨光², 曹贵方^{2,*}

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;
3. 内蒙古民族大学 生命科学学院, 内蒙古 通辽 028043)

摘要: 建立蒙古绵羊输卵管上皮细胞培养体系作为体外实验模型, 分别添加 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} mol/L 孕酮, 运用实时荧光定量PCR方法测定孕酮对上皮细胞内 β -防御素相对表达量的影响。结果显示, 与对照组比较, 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 孕酮组 β -防御素相对表达量显著升高 ($P<0.05$); 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 孕酮组极显著升高 ($P<0.01$); 而 10^{-10} mol/L 孕酮组未见显著性差异。孕酮添加组间比较显示, 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 孕酮组极显著高于 10^{-10} mol/L 组 ($P<0.01$), 其它孕酮添加组间未见显著性差异。分析认为, 一定浓度的孕酮 (10^{-9} — 10^{-6} mol/L) 对培养的输卵管上皮细胞 β -防御素的表达有促进作用。且不同浓度的孕酮对 β -防御素表达的影响程度不同。因而推断, 雌性生理周期下, 雌性生殖道 β -防御素的表达与孕激素相关。

关键词: β -防御素; 实时定量PCR; 孕酮; 相对表达量

中图分类号: Q593.4; Q954.4; Q959.842 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2009) 05-0497-06

Effect of Progesterone on the β -Defensin Expression in Epithelial Cells of Mongolian Sheep Fallopian Tubes

TANG Bo^{1,2}, XILIN Gao-wa^{2,3}, FU Ben-dong¹, DU Chen-guang², CAO Gui-fang^{2,*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. College of Veterinary Medicine and Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

3. College of Life Science, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028043, China)

Abstract: The epithelial cell of the Mongolian sheep's fallopian tubes were cultured as *in vitro* model, different concentrations of progesterone (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} and 10^{-10} mol/L) were added in the culture, and then the relative expressions of sheep β -defensin-1 (sBD-1) mRNA were surveyed by real time PCR. The results showed that, compared with the control group, the relative expressions of sBD-1 mRNA added with 10^{-6} and 10^{-7} mol/L progesterone were significantly higher ($P<0.05$), and those of 10^{-8} and 10^{-9} mol/L groups were remarkably higher ($P<0.01$). However, there was no significant difference between 10^{-10} mol/L group and control. Among groups added with progesterone, the sBD-1 mRNA expressions of 10^{-8} and 10^{-9} mol/L groups were markedly higher than that of 10^{-10} mol/L group ($P<0.01$), but there was no difference among other added groups. The results indicated that progesterone promoted the relative expression of sBD-1 mRNA in the epithelial cell of the fallopian tubes within the indicated concentrations (10^{-9} — 10^{-6} mol/L). And the relative expression of sBD-1 mRNA was varied with the different concentrations of progesterone. In conclusion, the expression of β -defensin was related to progesterone in female reproductive tract.

Key words: sBD-1; Real time PCR; Progesterone; Relative expression

抗微生物肽是生物体内先天性免疫的重要组成部分(Boman, 1995; Ganz & Lehrer, 1997), 在动植物界广泛存在, 具有广谱抗菌活性(Thouzeau et al, 2003), 防御素是其中一大家族。 β -防御素

(β -Defensin)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, 在哺乳动物和鸟类的上皮组织和白细胞内均发现有 β -防御素存在(Lehrer & Ganz, 1996)。

收稿日期: 2009-03-31; 接受日期: 2009-08-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30460093)

*通讯作者(Corresponding author), Tel: 0471-4309202, E-mail: guifangcao@yahoo.com

第一作者简介: 唐博 (1978—), 女 (蒙古族), 内蒙古呼和浩特人, 博士, 讲师, 主要从事分子生物学、细胞生物学和发育生物学方向的研究。E-mail: tangbohu78@163.com

雌性生殖道是体内直接与外界连通的场所,容易受外界杂菌的侵害,因此,雌性生殖道的先天免疫屏障显得尤为重要。目前,小鼠(Bals et al, 1998)以及人类(Horne et al, 2008)的生殖道内已发现多种防御素参与先天免疫。鉴于防御素的优势,它在生殖道的防御机制以及与生殖道环境、激素的关系值得深入研究。

雌性动物卵巢分泌雌激素和孕激素,在雌激素和孕激素的周期性作用下,形成生理周期。卵巢分泌的孕激素主要为孕酮(progesterone, P)。Quayle et al (1998)研究发现雌性生殖道防御素受雌激素的影响,在不同生理周期呈现不同的表达量。King et al (2003)系统研究了自然抗菌肽 β -防御素 3(HBD3)和 β -防御素 4(HBD4)在子宫内皮的差异表达,研究结果表明:人的子宫内皮 HBD3 和 HBD4 表达具有循环依赖模式,并保护子宫内皮不被感染。因此,提示防御素基因的表达受到体内一些激素的调节,而且与生理周期有一定关系。

关于生殖道防御素的研究主要涉及人类和小鼠;国内外对家畜,特别是反刍动物生殖道防御素研究较少或缺乏。本研究利用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术,对蒙古绵羊输卵管上皮细胞内 β -防御素在不同浓度孕酮作用下的表达情况进行相对定量,为探讨蒙古绵羊 β -防御素的表达和雌性生殖道的关系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 动物及其组织

成年蒙古绵羊输卵管组织,用 37℃ 灭菌生理盐水带回无菌间,培养输卵管上皮细胞。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 (GIBCO); 胎牛血清(TBD); 孕酮、丙酮酸钠、青霉素、链霉素、碳酸氢钠均购自 sigma 公司; 微量 RNA 提取试剂盒(W6221)购自上海华舜公司; 荧光定量 SYBR Green I 反转录 PCR 试剂盒 (Cat.NO.DRR053S) 购自大连宝生物公司。

1.3 蒙古绵羊防御素引物及内参基因 β -Actin 引物的设计

引物运用 DNASTar 软件设计,根据 GenBank 中羊 β -防御素(β -Defensin)序列(U75250.1)设计合成引物(产物大小为 300bp 左右), P1 (5'-GCC AAC ATG AGG CTC CAT CAC CTG CTC CT -3'); P2 (5'-AAC TTT GAA CAA AAT TTA TTC TGG TTT

AAA TT- 3')。

根据 GenBank 中羊的 β -Actin 的序列 (AF035422), 设计一对产物为 310 bp 左右的 β -Actin 引物: P3 (5'-CCC AAG GCC AAC CGT GAG AAG ATG A -3'); P4 (5'-CGA AGT CCA GGG CCA CGT AGC AGA G -3')。该引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4 输卵管上皮细胞的原代培养及传代培养

输卵管上皮组织 0.25%胰蛋白酶消化, 20%血清 DMEM/F12 培养液, 37℃, 5%CO₂ 原代培养。1:1 的 0.25%胰蛋白酶: 0.02%EDTA 37℃ 消化原代细胞, 20%血清 DMEM/F12 培养液中, 37℃, 5%CO₂ 培养。传代细胞 4d 80%汇合待用。

1.5 孕酮添加量与作用时间

参考 Zhao et al (2004) 提供的山羊雌二醇生理浓度, 本实验添加孕酮的浓度分为 5 组: 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 和 10⁻¹⁰ mol/L, 同时设对照组(不加孕酮)。所有处理组均提前无血清培养基饥饿 10 h, 然后添加孕酮相应浓度培养 48 h, 每组 5 个重复, 24 h 更换一次培养液。培养后分别提取细胞总 RNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测。

1.6 蒙古绵羊输卵管上皮细胞总 RNA 的提取

培养细胞按微量 RNA 提取试剂盒说明操作。无 RNA 酶水溶解 RNA 沉淀, -70℃ 保存备用。

1.7 组织中 β -Defensin mRNA 相对含量的实时荧光定量 PCR 检测

按照宝生物试剂盒说明书操作, 实时荧光定量 PCR 联机运行软件为 MJ Opticon Monitor™ Analysis Software Version 3.1, 优化条件, 采用四步法(Zhang et al, 2004; Chen et al, 2004)运行程序: 95℃ 预变性 1min; 95℃ 5s, 55℃ 30s, 72℃ 6s, 读板, 80℃ 1s, 读板, 39 个 PCR 循环; 72℃ 6s, 70℃ 到 95℃ 隔 0.5℃、1s 制作融解曲线。

SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 可以通过分析 Ct 值, 对起始模板相对含量进行测定。理论上同一组织中的目的基因与内标基因扩增效率相一致, 利用看家基因 β -Actin 作为内标基因, 通过内标基因对目的基因进行均一化处理, 得到目的基因起始模板相对量 (X_n)。

当扩增效率 $Ex \rightarrow 1$ 时: $X_n = 2^{-\Delta Ct}$

$$\lg X_n = -\Delta Ct$$

目的基因起始模板相对量的对数值与 ΔCt 呈线性关系。 $2^{-\Delta Ct}$ 方法是实时荧光定量 PCR 技术中分

析基因表达相对变化的一种简便计算方法 (Schmittgen & Zakrajsek, 2000)。利用 $2^{-\Delta Ct}$ 值可以表示组织中目的基因表达水平相对量。

据实时荧光定量 PCR 方法制作标准曲线, 以证明扩增效率 $E_x \rightarrow 1$, 进而可以运用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法, 以及 $2^{-\Delta Ct}$ 公式对 sBD-1-mRNA 进行相对表达量的检测。

2 结 果

2.1 传代细胞培养结果

传代培养 7 d 后, 细胞长成漩涡状排列的致密单层细胞集落, 其细胞呈多角形或蝌蚪形, 边界清楚, 排列紧密, 胞浆呈颗粒状, 核圆而大 (图 1)。

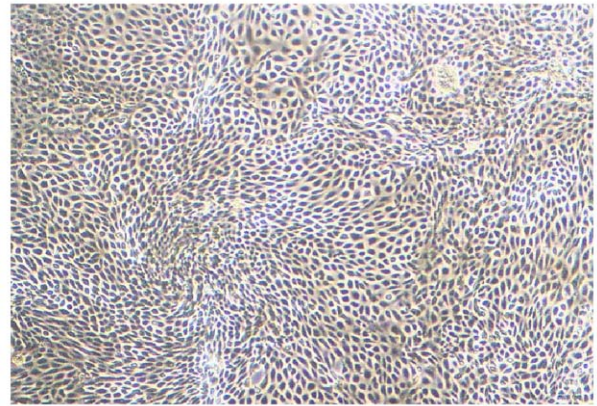


图 1 培养 7 d 传代上皮细胞形态
Fig. 1 The character of epithelial cell at 7 d after passage
放大倍数 (Magnification): $\times 52$ 。

```

1   GCCAACATGAGGCTCCATCACCTGCTCCTCGTCTTCTTCGTGGTC TGTCTGCTGGGTC 62
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
54  GCCAACATGAGGCTCCATCACCTGCTCCTCGTCTTCTTCGTGGTC TGTCTGCTGGGTC 115
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
63  AGGATTTACTCAAGGAGTAAGAAATCGTCTAAGCTGCCATAGGAATAAAGGCGTCTGTGT 122
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1588 AGGATTTACTCAAGGAGTAAGAAATCGTCTAAGCTGCCATAGGAATAAAGGCGTCTGTGT 1647
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
123  GCCGAGCAGGTGCCCTAGACACATGAGACAGATTGGCACCTGTGCGGGGCCCCAGTAAA 182
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1648 GCCGAGCAGGTGCCCTAGACACATGAGACAGATTGGCACCTGTGCGGGGCCCCAGTAAA 1707
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
183  ATGCTGCAGAAAGAAGTAACAGAAGGCGAAGACGCGGCCAGGACCGATGTGGAGTCAGAA 242
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1708 ATGCTGCAGAAAGAAGTAACAGAAGGCGAAGACGCGGCCAGGACCGATGTGGAGTCAGAA 1767
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
243  ACTGCGCCCTTAGACAGAGCAT CAAAATTTAAACCAGAATAAATTTGTCAAAGTT 301
   ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
1768 ACTGCGCCCTTAGACAGAGCAT CAAAATTTAAACCAGAATAAATTTGTCAAAGTT 1825
   ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||

```

图 2 sBD-1 cDNA 的核苷酸序列与 GenBank 中序列比对结果
Fig. 2 The sequence of sBD-1 cDNA compared with that of GenBank

2.2 荧光定量 RT-PCR 产物的测序

将 β -Defensin 和 β -Actin 的荧光定量 RT-PCR 产物, 送上海生物工程公司测序, 目的片段大小为 301 bp, 经过 DNASTar 软件比对, 与 GenBank 中绵羊 U75250.1 序列一致性达 99% (图 2)。进而证明, 荧光定量 RT-PCR 方法可以检测 β -Defensin 基因的表达。 β -Actin 的荧光定量 PCR 产物经序列测定, 与 GenBank 公布的羊 β -Actin 基因序列完全一致 (图略)。

2.3 荧光定量 RT-PCR 结果

2.3.1 β -Defensin 基因 PCR 扩增曲线及融解曲线

β -Defensin 和 β -Actin 的实时荧光定量 PCR 扩增反应动力学曲线, 如图 3, 融解曲线, 如图 4。 β -Defensin 及 β -Actin 基因扩增产物分别在 83.5°C 和 90.0°C 时出现单一峰, 表明 PCR 扩增片段为单一特异性产物。

2.3.2 β -Defensin 基因和 β -Actin 基因扩增效率曲线的制作 将 β -Defensin 和 β -Actin 基因 cDNA 以 10 倍梯度进行稀释, 分别进行荧光定量 PCR 扩增曲线绘制, 由扩增曲线绘制得到相应扩增效率曲线, 如图 5 和图 6。

从图 5 和图 6 中扩增效率曲线得出, 两方程回

归系数 R^2 均大于 0.99 接近 1。因此,待测基因(β -Defensin基因、 β -Actin基因)表达量的对数值(y)与 Ct 值(x)成反比例关系,并且表达量在 $100\sim 10^{-3}$ 浓度单位内,基因表达量的对数值与 Ct 值成线性关系。证实可以运用SYBR Green I实时荧光定量PCR方法以及 $2^{-\Delta Ct}$ 公式检测sBD-1的相对表达

量。

2.4 孕酮对培养的输卵管上皮细胞内 sBD-1 相对表达量的影响

提取各实验组培养细胞总RNA,进行实时荧光定量PCR检测, ΔCt 值见表 1, 用 $2^{-\Delta Ct}$ 值进行统

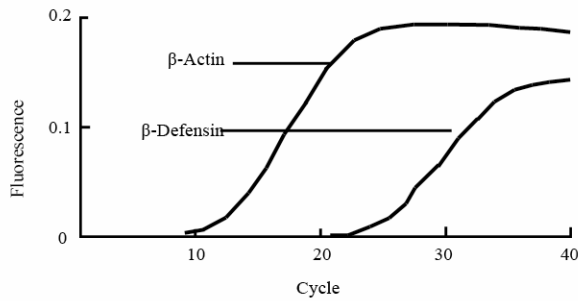


图 3 sBD-1 基因和 β -Actin 基因荧光定量的扩增曲线

Fig. 3 The real time PCR amplification curve of sBD-1 and β -Actin gene

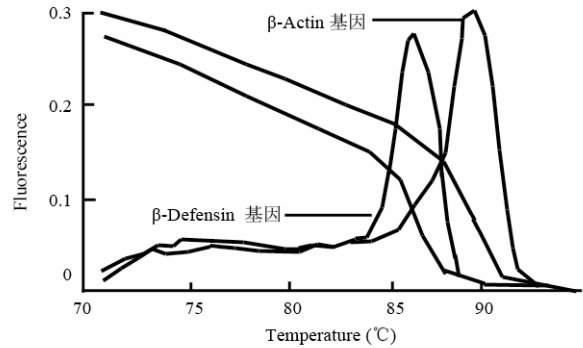


图 4 sBD-1 基因和 β -Actin 基因荧光定量 PCR 的融解曲线

Fig. 4 The real time PCR melting curves of sBD-1 and β -Actin gene

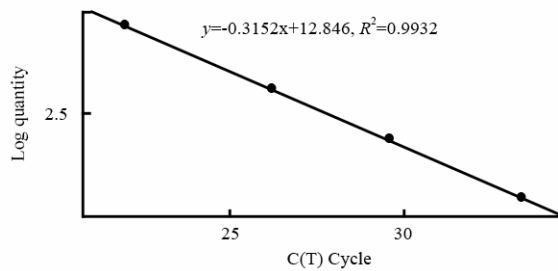


图 5 sBD-1 基因实时 PCR 扩增效率曲线

Fig. 5 The amplification efficiency curve of sBD-1 gene by real time PCR

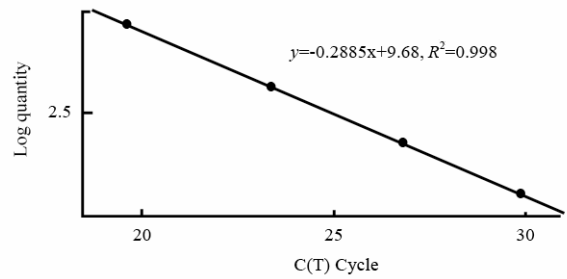


图 6 β -Actin 基因实时 PCR 扩增效率曲线

Fig. 6 The amplification efficiency curve of β -Actin gene by real time PCR

计分析, β -Defensin 的相对表达量见图 7。不添加孕酮组作为对照组。

由图 7 可知, 添加不同浓度孕酮后 β -Defensin 的相对含量发生变化, β -Defensin 的相对含量由多到少的排序为: 10^{-8} 组 $>$ 10^{-9} 组 $>$ 10^{-7} 组 $>$ 10^{-6} 组 $>$ 10^{-10} 组 $>$ 对照组。

组间差异显著性分析见表 2, 不同浓度孕酮(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L)对 β -Defensin 的表达有影响。添加 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L孕酮后, β -防御素相对表达量显著高于对照组($P < 0.05$), 其中 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L孕酮组极显著高于对照组($P < 0.01$); 而 10^{-10} mol/L孕酮组与对照

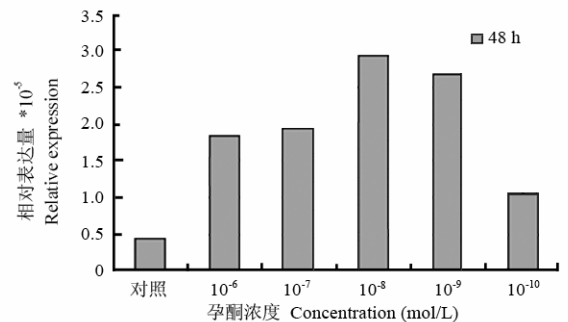


图 7 不同孕酮处理组 β -防御素表达量柱状图

Fig. 7 The histogram of different expression of β -defensin treated with different progesterone concentration

表 1 不同处理组 β -防御素基因荧光定量 PCR Δ Ct 值 ($X \pm S$)
 Tab. 1 Δ Ct of β -defensin cDNA treated with different group in real time PCR ($X \pm S$)

指标 Index	激素添加组 Groups of adding progesterone (mol/L)					
	对照组 Control	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Δ Ct 平均值 Mean of Δ Ct	17.81 \pm 0.64	15.73 \pm 0.58	15.66 \pm 0.59	15.05 \pm 0.59	15.18 \pm 0.72	16.54 \pm 0.37

表 2 不同浓度孕酮对 β -防御素表达的影响
 Tab. 2 The effect of different progesterone concentration to β -defensin (mol/L)

	对照 control	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
对照 control	—	1.127E-05*	1.740E-05*	2.831E-05**	2.651E-05**	8.929E-06
10^{-6}	-1.127E-05*	—	6.138E-06	1.704E-05	1.524E-05	-2.337E-06
10^{-7}	-1.740E-05*	-6.138E-06	—	1.090E-05	9.103E-06	-8.475E-06
10^{-8}	-2.831E-05**	-1.704E-05	-1.090E-05	—	-1.800E-06	-1.938E-05**
10^{-9}	-2.651E-05**	-1.524E-05	-9.103E-06	1.800E-06	—	-1.758E-05**
10^{-10}	-8.929E-06	2.337E-06	8.475E-06	1.938E-05**	1.758E-05**	—

上下三角中数字表示各组间 β -防御素的相对表达量相差值; * $P < 0.05$, 组间差异显著; ** $P < 0.01$, 组间差异极显著。

The values in the upper and lower triangle areas are the differences among the groups about β -Defensin relative expression. * significant difference in the same column ($P < 0.05$). ** markedly significant difference in the same column ($P < 0.01$).

组未见显著性差异, 即 10^{-10} mol/L 孕酮虽然使得 β -Defensin 的表达略有增加, 但是对 β -Defensin 表达无影响。添加孕酮组间相互比较, 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 孕酮组极显著高于 10^{-10} mol/L 组, 与其它孕酮添加组间未见显著性差异。

3 讨论

动物体内雌激素和孕激素浓度动态变化, 维持着动物生理周期, 根据 Zhao et al (2004) 的研究, 我们选取孕酮 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} mol/L 作为实验组。通过孕酮探讨孕激素对上皮细胞 sBD-1 表达的影响。

结果显示, 一定浓度孕酮对 β -Defensin 的表达有影响。对照组 β -Defensin 表达量极显著低于 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 组; 显著低于 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 组; 但与孕酮 10^{-10} mol/L 组间未见显著性差异。因此, 添加一定量的孕酮对培养的输卵管上皮细胞 sBD-1 表达有明显促进作用。

由此结果推断, 雌性生殖道 β -Defensin 表达与孕酮的存在有相关性, 而且与孕酮的浓度相关。鉴于孕酮通过与相应的孕酮受体 (progesterone receptor, PR) 结合发挥作用的机理, 进而推断孕酮对 β -Defensin 表达调节是通过孕酮与受体结合后发挥作用。PR 是一个可诱导的核受体, 可以配体或非配体方式, 通过与共活化分子和共抑制分子相互作用增强或抑制其转录活性。新合成的 PR 在胞浆中与热休克蛋白和其它的分子伴侣结合, 以非活化形式

存在, 当与孕酮结合后, PR 构象发生改变与热休克蛋白解离形成二聚体, 磷酸化后转移到胞核内, 构象的改变促使共活化因子如类固醇受体活化分子家族 (SRC)、E6 相关蛋白、类固醇受体 RNA 活化分子 (SRA) 等同 PR 的 AFs 功能区相结合, 这些共活化因子可导致染色质的重构并桥联基本转录因子于孕激素反应元件启动子区形成转录起始复合物, 促进靶向基因的转录。根据 PR 可诱导的特点, 结合我们实验结果分析, 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 孕酮与 PR 结合后可以启动一些基因的表达, 使得产生的某些分子或蛋白诱导 β -防御素的表达。而且这两个浓度和 PR 的诱导结合是最合适的, 因此对 sBD-1 的诱导表达差异极显著。而浓度稍高的 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L 孕酮, 虽然对 β -Defensin 的表达同样有促进作用, 但是推测其浓度和 PR 受体结合和促进能力较 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L 稍差, 但是依然能起到对 PR 及 β -防御素表达的促进作用。而 10^{-10} mol/L 孕酮虽然对 sBD-1 表达无显著作用, 然而从图 7 依然能看出对 β -防御素表达量有所提高, 推测此浓度对 PR 及 β -防御素表达的促进作用与较高浓度孕酮所经历的信号通路一致, 但是由于其浓度较低, 不能完全启动对 β -Defensin 表达的促进作用。关于孕酮对 β -Defensin 表达促进的机理研究可以进一步通过与孕酮受体结合研究, 进而更深入一步探明生殖道生殖激素对防御系统加强的作用通路。

对照组有 β -Defensin 表达说明, 孕酮对于防御素表达是防御素表达的相关因素之一。由此结果推

断生理状态下雌性生殖道雌激素的分泌同时影响着防御素的分泌,为雌性生殖道这个特殊场所提供了很好的防御和免疫屏障,为雌性生殖道在不同生

理周期以及妊娠期都起到了很好的防御功能。本研究为进一步探讨孕激素参与机体防御功能机理奠定了基础。

参考文献:

- Bals R, Goldman MJ, Wilson JM. 1998. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract [J]. *Infect Immun*, **66** (3): 1225-1232.
- Boman HG. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, **13** (3): 61-92.
- Chen YJ, Hu CJ, Zhao MQ. 2004. Construction of real-time quantitative polymerase chain reaction platform with SYBR Green I [J]. *Pract J Med Pharm*, **21** (11): 997-999. [陈英剑, 胡成进, 赵苗青. 2004. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台的建立. 实用医药杂志, **21** (11): 997-999.]
- Ganz T, Weiss J. 1997. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia [J]. *Semin Hematol*, **34** (4): 343-354.
- Horne AW, Stock SJ, King AE. 2008. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract [J]. *Reproduction*, **135** (6): 739-749.
- King AE, Fleming DC, Critchley HO, Critchley HO, Kelly RW. 2003. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium [J]. *J Reprod Immunol*, **59** (1): 1-16.
- Lehrer RI, Ganz T. 1996. Endogenous vertebrate antibiotics Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides [J]. *Ann NY Acad Sci*, **797** (8): 228-239.
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract [J]. *Am J Pathol*, **152** (5): 1247-1258.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR [J]. *J Biochem Biophys Methods*, **46** (1-2): 69-81.
- Thouzeau C, Le Maho, Froget G, Sabatier L, Le Bohec C, Hoffman JA, Bulet P. 2003. Spheniscins: avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus* [J]. *Biol Chem*, **278** (51): 51053-51058.
- Zhang CY, Zhang GH, Yang M, Ben KL. 2004. 4-step program eliminating the effect of primer-dimers (PDs) in SYBR green real-time RT-PCR [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, **20** (3): 387-392. [张驰宇, 张高红, 杨敏, 贲昆龙. 2004. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响. 中国生物化学与分子生物学报, **20** (3): 387-392.]
- Zhao W, Wang GJ, Xu XB. 2004. The concentration of progesterone, estrogen and testosterone in the peripheral blood plasma of Boer Goat in oestrus and gestation period [J]. *Jiangsu Agric Sci* **20** (3): 60-62. [赵伟, 王公金, 徐晓波. 2004. 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, **20** (3): 60-62.]