

郑吉松, 陈双, 杨强, 等. 限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响及机制 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 48-53.
ZHENG Jisong, CHEN Shuang, YANG Qiang, et al. Effects of feed restriction on mammary gland development of pubertal mice and the involved mechanisms[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 48-53.

限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响及机制

郑吉松, 陈 双, 杨 强, 张 静, 袁 聪, 朱晓彤,
束 刚, 王丽娜, 高 萍, 江青艳, 王松波

(华南农业大学 动物科学学院/广东省动物营养调控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响及机制, 为动物乳腺发育的营养调控提供科学依据。【方法】选用 24 只 4 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 分为对照组和限饲组。试验为期 4 周, 每周称体质量并统计采食量和饮水量, 在试验结束前对小鼠进行体成像和体组成检测。试验结束后采集小鼠乳腺并称质量。采集血液, 测定血清中胰岛素样生长因子 (IGF-1) 和雌二醇 (E2) 的水平。采用 Whole-mount 染色观察小鼠乳腺发育情况, 统计小鼠乳腺终末乳芽 (TEB) 和导管分支数量。利用免疫荧光染色检测乳腺组织中增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达。【结果】限饲组小鼠体质量、体增质量、平均日采食量、平均日能量摄入均极显著低于对照组 ($P<0.001$), 但其饮水量显著高于对照组 ($P<0.05$)。限饲对小鼠肌肉含量和脂肪含量无显著影响。限饲使小鼠的乳腺质量降低了 29% ($P<0.05$), 对乳腺指数无显著影响。Whole-mount 染色结果表明, 限饲显著抑制初情期小鼠的乳腺发育, 其乳腺组织的 TEB 数量和导管分支数量均显著低于对照组 ($P<0.05$)。此外, 限饲对血清中 E2 水平无显著影响, 但使血清中 IGF-1 水平降低了 34% ($P<0.05$)。限饲显著抑制了小鼠乳腺组织中 PCNA 蛋白的表达。【结论】限饲可显著抑制初情期小鼠乳腺发育, 这可能与限饲可降低血清中 IGF-1 水平和乳腺组织中增殖相关蛋白 PCNA 表达有关。

关键词: 限饲; 初情期小鼠; 乳腺发育; IGF-1; 雌二醇; 增殖细胞核抗原
中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0048-06

Effects of feed restriction on mammary gland development of pubertal mice and the involved mechanisms

ZHENG Jisong, CHEN Shuang, YANG Qiang, ZHANG Jing, YUAN Cong, ZHU Xiaotong,
SHU Gang, WANG Lina, GAO Ping, JIANG Qingyan, WANG Songbo
(College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial
Key Laboratory of Animal Nutrition Control, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of feed restriction on mammary gland development of pubertal mice and explore the involved mechanisms, and provide a scientific basis for nutritional regulation during mammary gland development of animals. 【Method】Twenty-four 4-week-old C57BL/6J female mice were randomly divided into the control group and feed restriction group. The trial lasted for four weeks. The body weight, feed intake and water intake were recorded weekly, and the body imaging and body composition of mice were examined before the end of the trial. At the end of the trial, the mouse mammary gland was collected and weighed. The blood was collected and the levels of insulin-like growth factor (IGF-1) and estradiol (E2) in serum were measured. The mammary gland development was observed and assessed by using whole-mount

staining and the numbers of mammary gland terminal end bud (TEB) and duct branches were analyzed. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the mammary gland tissue of pubertal mice. 【Result】 The body weight, body weight gain, average daily feed intake and average daily energy intake of mice in feed restriction group were significantly lower than those of mice in control group ($P<0.001$), while the water intake of feed restriction group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). Feed restriction had no effect on muscle and fat contents. In addition, feed restriction significantly decreased the mammary gland weight by 29%($P<0.05$), with no effect on mammary gland index. The results of whole-mount staining showed that feed restriction significantly inhibited the development of mammary gland, with significant lower number of TEB and duct branches ($P<0.05$). Furthermore, feed restriction significantly reduced the serum level of IGF-1 by 34%($P<0.05$), with no influence on serum E2 level. Feed restriction significantly inhibited PCNA protein expression in the mammary gland of pubertal mice. 【Conclusion】 Feed restriction significantly inhibits mammary gland development of pubertal mice, which might be associated with the decreased level of IGF-1 in serum and expression of proliferation-associated protein PCNA in mammary gland tissue.

Key words: feed restriction; pubertal mouse; mammary gland development; IGF-1; estradiol; proliferating cell nuclear antigen

作为哺乳动物的泌乳器官,良好的发育是乳腺充分发挥泌乳功能的前提,对动物子代的生长发育及畜牧业生产具有重要影响。因此,研究影响乳腺发育的因素及其机制对提高动物泌乳性能及畜牧业生产提质增效具有重要意义。

哺乳动物乳腺发育期包括初情期、妊娠期和泌乳期等不同阶段^[1]。猪乳腺发育有 3 个关键阶段,分别是 90 日龄到性成熟期间、妊娠期后三分之一阶段和哺乳期^[2]。乳腺的发育受到遗传、激素、营养和环境等不同因素的影响^[1-3],其中营养对乳腺的发育起着非常重要的作用^[3-4]。前期研究发现,高脂日粮会抑制初情期小鼠乳腺的发育^[5-6];相反,限饲或者过瘦也会影响乳腺的发育,例如:母猪 90 日龄至性成熟期间,25% 的限饲可显著降低乳腺实质质量、乳腺组织 DNA 和 RNA 含量^[7]。此外,一定程度的能量限制是预防乳腺癌的潜在策略^[8],但是过量限饲也会抑制乳腺的正常发育。目前,对于限饲调控初情期哺乳动物乳腺发育的机制尚不清楚。

本试验以初情期小鼠为对象,在研究限饲对初情期小鼠乳腺导管发育的基础上,进一步探索限饲对初情期小鼠血清中胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like growth factor 1,IGF-1) 和雌二醇 (Estradiol, E2) 水平及乳腺组织中增殖相关蛋白增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达的影响,旨在揭示限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响及其机制,为动物乳腺发育的营养调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验设计

选用 24 只 4 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠 (购于广东省医学实验动物中心),预饲喂正常日粮 3 d 后,根据体质量随机分为 2 组:对照组 (自由采食日粮) 和限饲组 (每天饲喂对照组小鼠前一天平均采食量的 70%),每组 12 只。将小鼠同室分笼饲养,自由采食饮水;每天光照与黑暗各 12 h,环境温度控制在 (25±1) °C,湿度 (60±5)%。每周进行小鼠采食量、饮水量和体质量的测定,采样前对小鼠进行体成像和体组成检测,饲养 4 周后,眼球采血静置离心分离得到血清,并对血清 IGF-1 和 E2 水平进行检测;通过颈部脱臼方式处死小鼠,采集小鼠乳腺组织、褐色脂肪和内脏脂肪组织并称质量,同时对乳腺进行染色和蛋白表达等检测。

1.2 试验材料

小鼠日粮购于广东省医学实验动物中心;百里酚、胭脂红和硫酸铝钾购于成都艾科达化学试剂有限公司;轻型小动物成分分析仪 (上海纽迈电子科技有限公司) 用于对小鼠进行体成像和体成分测定;IGF-1 放射免疫试剂盒购于天津九鼎医学生物工程有限公司;PCNA 抗体购于 Cell Signaling Technology。

1.3 测定指标及方法

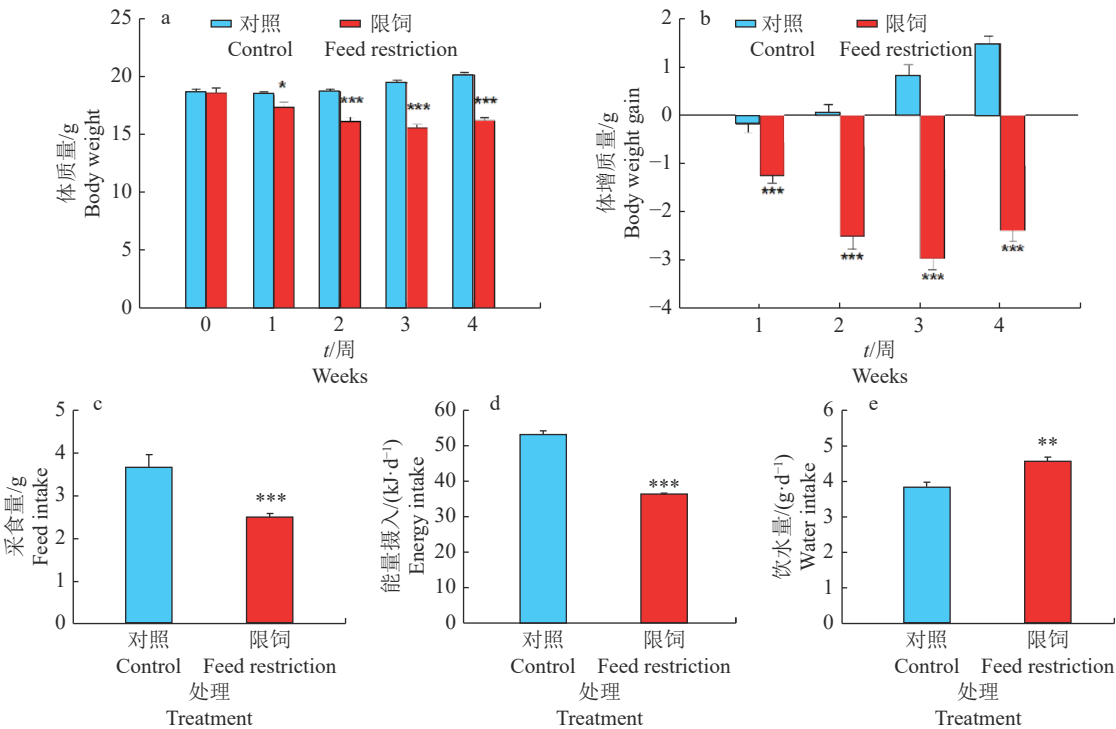
乳腺采集和 Whole-mount 染色:切下右侧乳腺腹腺体 (第 4 对乳腺) 并称质量,涂在玻璃载玻片上,进行 Whole-mount 染色^[5],显微镜下观察初情期

小鼠乳腺组织结构,统计乳腺组织终末乳芽(Terminal end bud, TEB)数量和导管分支数量。

PCNA 蛋白的免疫荧光染色:步骤为组织脱水、包埋、切片、抗原修复、血清封闭、孵一抗过夜、孵二抗、DAPI 复染细胞核、封片,之后在免疫荧光显微镜下观察初情期小鼠乳腺组织荧光强弱并分析。

1.4 数据分析

数据结果用平均值±标准误表示,统计分析采用 SigmaPlot 12.5 软件分析,采用 *t* 检验比较对照组和限饲组的统计差异。



“*”、“**”和“***”分别表示与对照组相比差异达 0.05、0.01、0.001 的显著水平 (*t* 检验)

“*”, “**” and “***” indicate the difference with control group reaches 0.05, 0.01 and 0.001 significance levels respectively (*t* test)

图 1 限饲对初情期小鼠生长性状的影响

Fig. 1 Effects of feed restriction on growth traits of pubertal mice

2.2 限饲对初情期小鼠体组成及不同部位脂肪的影响

体成像和体组成检测结果(图 2、图 3)表明,与对照组相比,限饲不会显著改变初情期小鼠的整体肌肉含量和脂肪含量。

采样褐色脂肪和内脏脂肪的结果表明,与对照组相比,限饲对初情期小鼠的褐色脂肪指数(褐色脂肪质量占体质量百分比)无显著影响(图 4A),但可极显著降低内脏脂肪指数(内脏脂肪质量占体质量百分比)(图 4B)。

2.3 限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响

小鼠乳腺 Whole-mount 染色如图 5 所示,与对照组小鼠相比,限饲组小鼠的乳腺组织在乳腺导管

2 结果与分析

2.1 限饲对初情期小鼠生长性状的影响

如图 1a 所示,限饲组小鼠的第 1 周体质量显著低于对照组 ($P<0.05$),从第 2 周开始,限饲组小鼠的体质量极显著低于对照组 ($P<0.001$);每周限饲组小鼠的体增质量均极显著低于对照组(图 1b);另外,限饲组小鼠平均日采食量和平均日能量摄入均极显著低于对照组(图 1c、1d);然而,限饲组小鼠平均日饮水量极显著高于对照组(图 1e)。

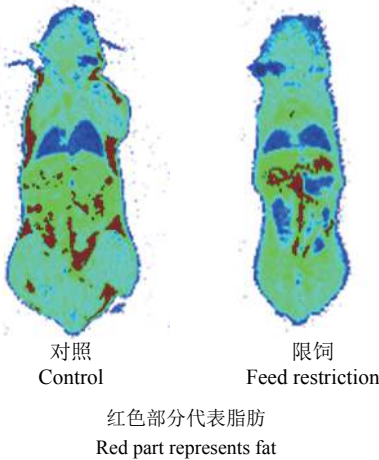


图 2 限饲对初情期小鼠体成像的影响
Fig. 2 Effect of feed restriction on the body imaging of pubertal mice

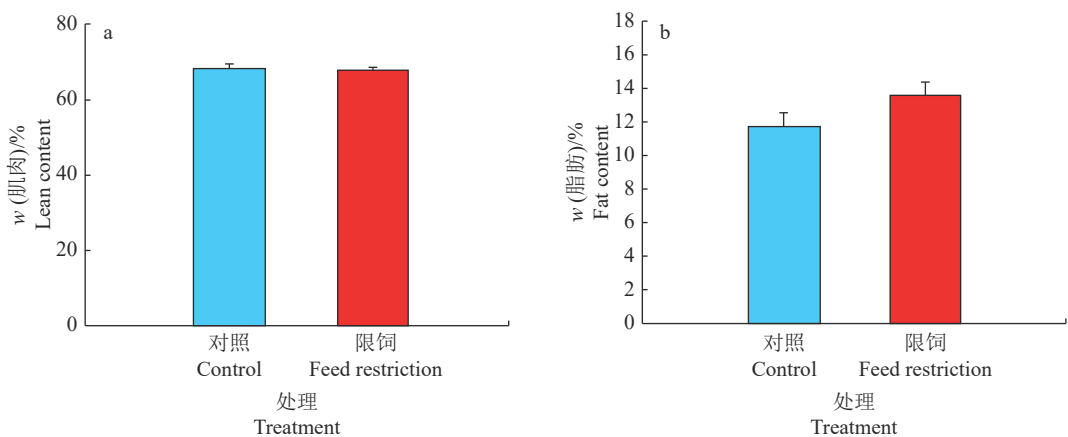
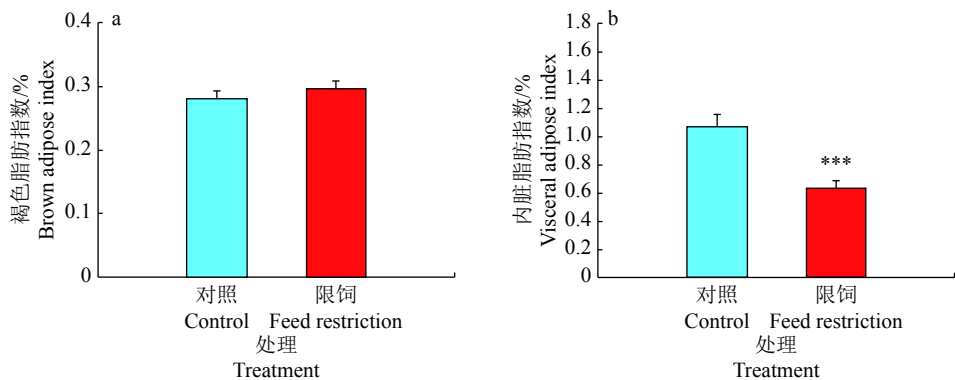


图 3 限饲对初情期小鼠体组成的影响

Fig. 3 Effects of feed restriction on the body composition of pubertal mice

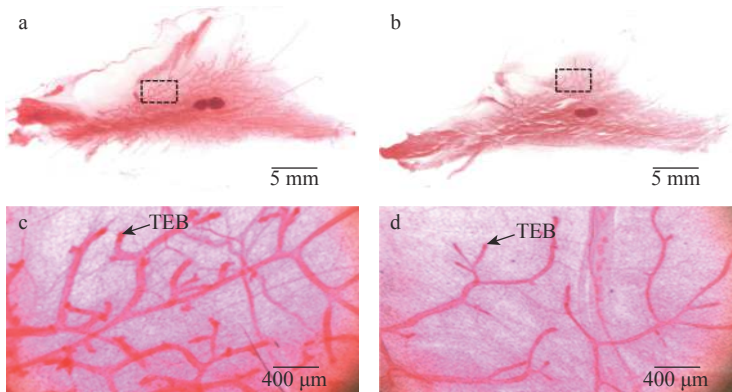


“***” 表示与对照组相比差异达 0.001 的显著水平 (*t* 检验)

“***” indicates the difference with control group reaches 0.001 significance level (*t* test)

图 4 限饲对初情期小鼠褐色脂肪和内脏脂肪的影响

Fig. 4 Effects of feed restriction on the brown adipose tissue and visceral adipose tissue of pubertal mice



a, b 分别为 Whole-mount 染色后对照组和限饲组小鼠乳腺组织的低倍显微镜照片; c、d 分别为 Whole-mount 染色后对照组和限饲组小鼠乳腺组织的高倍显微镜照片; TEB: 终末乳芽

a and b are low-power microscope pictures of the breast tissue from mice in the control group and feed restriction group after whole-mount staining, respectively; c and d are high-power microscope pictures of the breast tissue from mice of the control group and feed restriction group after whole-mount staining, respectively; TEB: Terminal end bud

图 5 限饲对初情期小鼠乳腺形态和导管发育的影响

Fig. 5 Effects of feed restriction on mammary gland morphology and duct development of pubertal mice

的密度和数量上有明显的降低;此外,与对照组小鼠相比,限饲组小鼠的乳腺质量显著降低 29%,同时限饲组小鼠乳腺导管分支数量显著降低,导管的 TEB 数量极显著降低 (表 1)。

2.4 限饲对初情期小鼠血清中 IGF-1 和 E2 水平的影响

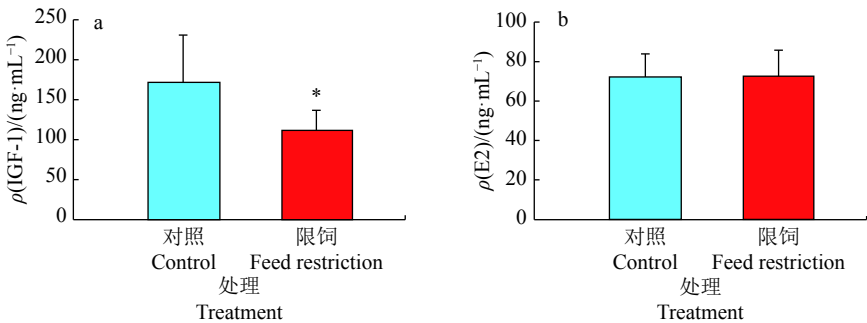
如图 6 所示,与对照组相比,限饲可以使初情期小鼠血清中 IGF-1 水平降低 34%,但是对小鼠血

表 1 限饲对初情期小鼠乳腺(第 4 对右侧)发育性状的影响¹⁾

Table 1 Effects of feed restriction on developmental traits of mammary gland (the right one of the fourth pair) of pubertal mice

处理	乳腺质量/g	乳腺指数/%	终末乳芽数量	导管分支数量
Treatment	Mammary gland weight	Mammary gland index	TEB number	Duct branch number
对照 Control	0.059 5±0.004 7	0.298 1±0.023 7	38.666 7±0.666 7	27.666 7±1.201 9
限饲 Feed restriction	0.042 2±0.003 7*	0.258 5±0.019 2	21.666 7±0.666 7***	21.666 7±1.201 9*

1) “*” 和 “***” 分别表示与对照组相比差异达0.05和0.001的显著水平(*t*检验)
1) “*” and “***” indicate the difference with control group reaches 0.05 and 0.001 significance levels respectively (*t* test)



“*” 表示与对照组相比差异达 0.05 的显著水平 (*t* 检验)
“*” indicates the difference with control group reaches 0.05 significance level (*t* test)

图 6 限饲对初情期小鼠血清中 IGF-1 和 E2 水平的影响

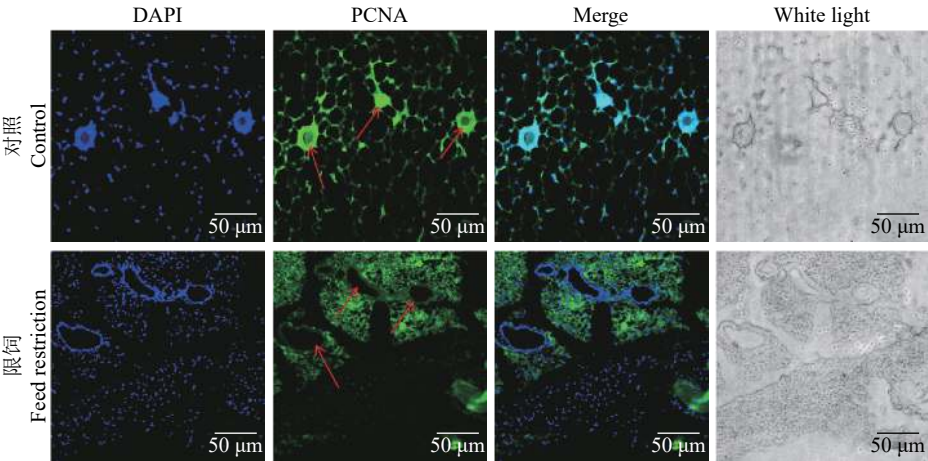
Fig. 6 Effects of feed restriction on the serum levels of IGF-1 and E2 of pubertal mice

清中 E2 水平没有显著影响。

2.5 限饲对初情期小鼠乳腺组织中增殖相关蛋白 PCNA 表达的影响

如图 7 所示, 对照组乳腺组织导管免疫荧光染

色(红色箭头部分)明亮清晰, 而限饲组乳腺组织导管却暗淡模糊, 由此得知, 限饲可以显著降低乳腺导管增殖相关蛋白 PCNA 的表达。



图中 DAPI 表示 4',6-二脒基-2-苯基吲哚荧光染色图片; PCNA 表示增殖细胞核抗原荧光染色图片, 红色箭头处为乳腺导管; Merge 表示 DAPI 荧光染色和 PCNA 荧光染色合并图片; White light 表示光学显微镜拍摄图片

In the figure, DAPI represents 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescence staining picture, red arrow points at mammary duct; PCNA represents the fluorescence staining image of PCNA; Merge represents the combined image of DAPI fluorescence staining and PCNA fluorescence staining; White light represents the image taken by an optical microscope

图 7 限饲对初情期小鼠乳腺组织中 PCNA 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of feed restriction on PCNA protein expression in mammary gland of pubertal mice

3 讨论与结论

3.1 限饲对初情期小鼠生长和体组成的影响

周期性能量限制能显著降低羔羊的生长性

能^[9], 对鸡和鹅的研究也观察到类似情况。叶耀辉等^[10]的研究表明, 限饲对猪胴体蛋白质日沉积量无显著影响, 但能引起胴体脂肪沉积的减少, 从而达到胴体瘦肉比例相对增加的目的。本研究发现, 限

饲同样也能显著降低小鼠的生长性能, 体质量、体增质量、平均日采食量和平均日能量摄入均显著降低, 但是平均日饮水量却显著升高, 这可能是因为限饲组小鼠能量供给不足, 代偿性通过增加饮水量来弥补能量的缺失。另外, 限饲也能显著降低初情期小鼠内脏脂肪指数, 但是对褐色脂肪指数、脂肪含量和肌肉含量均无显著影响。

3.2 限饲对初情期小鼠乳腺发育的影响

许多研究表明, 青春期, 妊娠期和哺乳期的乳腺快速增生期间, 母猪的营养会影响乳腺发育。母猪 90 日龄至性成熟, 相对于正常采食量 25% 的限饲可以显著降低乳腺实质质量、乳腺组织 DNA 和 RNA 含量, 但是, 在断奶后至 90 日龄对母猪进行 34% 的限饲不会影响乳腺的发育^[7]。在本试验中, whole-mount 染色结果表明, 限饲可显著降低乳腺组织导管分支数量以及 TEB 的数量, 提示限饲可显著抑制初情期小鼠乳腺的发育。Park 等^[11]的研究也发现, 能量限制延迟了大鼠青春期的开始并延缓了母代和后代的生长, 减少了乳腺中的脂肪沉积, 但它并没有影响乳腺细胞性质。但是泌乳母猪饲料限制不会对乳汁组成和窝产仔数产生不利影响^[12]。可见, 不同阶段的限饲造成的影响也不相同。

3.3 限饲对初情期小鼠血清 IGF-1 和 E2 水平及乳腺组织中 PCNA 蛋白表达的影响

IGF-1 是动物出生后生长调节的重要因子, 有研究报道, IGF-1 能增加乳腺上皮细胞存活率并刺激乳腺上皮细胞的增殖, 还促进乳腺肿瘤发生^[13]。Clemmons^[14]的研究结果表明, 血清中 IGF-1 能够提高动物体内能量和蛋白的沉积, 加快生长速度。E2 是卵巢卵泡颗粒细胞分泌的一种自然雌激素, 能增进和调节雌性器官及副性征的正常发育。有研究表明, 17 β -雌二醇能显著促进人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的增殖^[15]。本研究发现, 限饲能显著降低初情期小鼠血清中 IGF-1 水平, 这可能是导致限饲组小鼠生长发育受阻的重要原因。但是, 限饲对初情期小鼠血清中 E2 水平无显著影响。

研究发现, IGF-1 在初情期小鼠优先激活 PI3K/Akt 通路, 增加细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1) 表达^[13]。本研究中乳腺组织的免疫荧光结果表明, 限饲可以显著降低乳腺组织增殖相关蛋白 PCNA 的表达, 提示限饲可能抑制血清 IGF-1 水平, 从而降低乳腺组织增殖相关蛋白 PCNA 的表达来抑制乳腺发育。

综上所述, 限饲可抑制初情期小鼠乳腺发育, 其乳腺导管分支数量和 TEB 数量显著减少。限饲对初情期小鼠乳腺发育的抑制作用可能与其抑制增殖相关蛋白 PCNA 的表达和降低血清中 IGF-1

水平有关。本论文研究结果为动物和人类乳腺健康发育的营养调控提供了科学的参考依据。

参考文献:

[1] MACIAS H, HINCK L. Mammary gland development[J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012, 1(4): 533-557.

[2] FARMER C. Nutritional impact on mammary development in pigs: A review[J]. *J Anim Sci*, 2018, 96(9): 3748-3756.

[3] FARMER C. Review: Mammary development in swine: Effects of hormonal status, nutrition and management[J]. *Can J Anim Sci*, 2013, 93(1): 1-7.

[4] REZAEI R, ZHENLONG W U, HOU Y, et al. Amino acids and mammary gland development: Nutritional implications for milk production and neonatal growth[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2016, 7(4): 437-458.

[5] 孟莹莹, 张静, 张枫琳, 等. 高脂日粮对初情期小鼠乳腺发育的影响及分子机制 [J]. *华南农业大学学报*, 2017, 38(3): 9-14.

[6] OLSON L K, TAN Y, ZHAO Y, et al. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness[J]. *Int J Obes*, 2010, 34(9): 1415-1426.

[7] SORENSEN M T, FARMER C, VESTERGAARD M, et al. Mammary development in prepubertal gilts fed restrictively or ad libitum in two sub-periods between weaning and puberty[J]. *Livest Prod Sci*, 2006, 99(2): 249-255.

[8] HARVIE M, HOWELL A. Energy restriction and the prevention of breast cancer[J]. *P Nutr Soc*, 2012, 71(2): 263-275.

[9] SONG S, WU J, ZHAO S, et al. The effect of periodic energy restriction on growth performance, serum biochemical indices, and meat quality in sheep[J]. *J Anim Sci*, 2018, 96(10): 4251-4263.

[10] 叶耀辉, 许培文. 限饲对猪皮下各脂肪层脂肪沉积及胴体组成的影响 [J]. *福建农业学报*, 1998(4): 42-45.

[11] PARK C S, BAIK M G, KELLER W L, et al. Dietary energy restriction-mediated growth and mammary development in rats[J]. *J Anim Sci*, 1994, 72(9): 2319-2324.

[12] GESSNER D K, GRONE B, ROSENBAUM S, et al. Effect of a negative energy balance induced by feed restriction in lactating sows on hepatic lipid metabolism, milk production and development of litters[J]. *Arch Anim Nutr*, 2015, 69(5): 399-410.

[13] TIAN J, BERTON T R, SHIRLEY S H, et al. Developmental stage determines estrogen receptor alpha expression and non-genomic mechanisms that control IGF-1 signaling and mammary proliferation in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 192-204.

[14] CLEMMONS D R. The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(1): 25-27.

[15] 马春艳, 郭丽丽, 梁前进, 等. 双酚-A 和 17 β -雌二醇对人乳腺癌细胞生长的影响 [J]. *中国环境科学*, 2002, 22(5): 408-411.