

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00347

小鼠 *ERβ* 基因片段的克隆及其在胚胎发育中的表达

张子峰^{1,2}, 樊少华^{1,2}, 陆军^{2,3}, 吴冬梅², 单群^{1,2}, 胡斌^{1,2}, 李飞¹, 郑元林^{1,2}

1. 徐州师范大学生命科学学院, 徐州 221116;
2. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 徐州 221116;
3. 东南大学基础医学院, 南京 210000

摘要: 为探讨 *ERβ* 在小鼠胚胎发育过程中的表达, 首先设计 *ERβ* 引物并扩增 *ERβ* 基因片段, 构建 *ERβ*-pGEM-3Z 重组质粒进行克隆, 分别用 *EcoR* 和 *Hind* 进行酶切得到线性化 DNA 片段, 以 Sp6 和 T7 聚合酶合成地高辛标记的(dig)正、反义 RNA 探针。然后通过胚胎整体原位杂交技术分析 *ERβ* 在小鼠胚胎中的表达。运用该探针检测到 *ERβ* 基因在 10.5 dpc 胚胎的脑、脊神经管、生殖脊、心包、肢芽及颌弓部位表达, 在 13.5 dpc 胚胎的端脑、中脑、延髓、脊髓、肢芽中表达。推测 *ERβ* 基因可能在小鼠胚胎性别分化过程中起调节作用; 可能在小鼠胚胎神经管的早期区域化过程中起作用并在 3 个原始脑泡进一步分化及脊髓的分化过程中起作用; 可能在小鼠胚胎肢芽中的骨与软骨的形成与分化中起调控作用; 可能在小鼠胚胎心脏发育过程中起作用, 可能在小鼠胚胎颌弓的表面分化过程中起调控作用。

关键词: 雌激素受体 β ; 基因克隆; 整体原位杂交; 小鼠胚胎

Cloning of gene fragment of estrogen receptor- β and its expression in mouse embryo

ZHANG Zi-Feng^{1,2}, FAN Shao-Hua^{1,2}, LU Jun^{2,3}, WU Dong-Mei², SHAN Qun^{1,2}, HU Bin^{1,2}, LI Fei¹, ZHENG Yuan-Lin^{1,2}

1. School of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;
2. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou 221116, China;
3. School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing 210000, China

Abstract: In order to study the expression and regulation effects of estrogen receptor- β (*ERβ*) in the development of mouse embryo, the primer of *ERβ* was designed, the *ERβ* fragment was first obtained by RT-PCR and subcloned into plasmids pGEM-3Z, then the recombinant plasmids were linearized with the restriction enzymes of *EcoR* and *Hind*. Using Sp6 and T7 RNA polymerase, the digoxigenin(dig) labeled sense and anti-sense probes were transcribed *in vitro*, respectively. Then the expression of *ERβ* in mouse embryo was examined with the probes by whole-mount *in situ* hybridization. The results indicated that *ERβ* is expressed in the brain, spinal neural tube, genital ridge, pericardium, limb bud and mandibular arch of 10.5 dpc embryo, and is also expressed in the telencephalon, mesencephalon, medulla oblongata, spinal cord and

收稿日期: 2007-09-04; 修回日期: 2007-12-21

基金项目: 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目(编号: 2007KJA36029)、江苏省青蓝工程中青年学术带头人培养项目(编号: 2004)、江苏省药用植物生物技术重点实验室课题和徐州师范大学自然科学基金重点项目(编号: 07XLA09)资助[Supported by the Major Fundamental Research Program of Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions of China (No.2007KJA36029), Grants from Qing Lan Project of Jiangsu Province, P. R. China (No.2004), Grants from Key Laboratory of Jiangsu Province, and Grants from Key Natural Science Foundation of Xuzhou Normal University (No.07XLA09)]

作者简介: 张子峰(1975-), 男, 江苏无锡人, 讲师, 硕士, 研究方向: 动物分子遗传学、动物发育生物学。E-mail: zhangzifengsuper@xznu.edu.cn

通讯作者: 郑元林(1961-), 男, 江苏泰州人, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向: 动物分子遗传学、动物发育生物学。

E-mail: ylzhang@xznu.edu.cn

limb bud of 13.5 dpc embryo. These results suggest that *ERβ* maybe play a role of regulation in sexual differentiation, primal differentiation of neural tube, further differentiation of three primary cerebral vesicles and spinal cord, generation and differentiation of bone and cartilage of limb bud, development of pericardium and configuration differentiation of mandibular in mouse embryo.

Keywords: *ERβ*; gene cloning; whole-mount *in situ* hybridization; mouse embryo

1996 年, Kuiper 等首先从大鼠前列腺组织中成功克隆出一种新型雌激素受体, 它由不同于雌激素受体的基因编码, 因此命名为雌激素受体 (Estrogen Receptor β , *ERβ*)^[1]。人类 *ERβ* 基因定位于染色体 14q22-24, 包括 7 个内含子和 8 个外显子。*ERβ* 由 530 个氨基酸残基组成, 其相对分子质量为 59 200, 其一级结构自 N 端到 C 端, 可分为 A/B、C、D、E/F 等 4 个功能区。A/B 区是转录调控区, 能调节 *ERβ* 与 DNA 的相互作用, 选择正确的雌激素应答元件 (estrogen response element) 及调控靶基因的表达。*ERβ* 被激活的途径有 3 条: (1) 经典的雌激素激活途径, 作为一种配体(激素)依赖的转录因子, 其激活后可形成二聚体, 与靶基因启动子区中的雌激素反应元件(ERE)结合, 在一系列共激活子和共抑制子作用下, 激活靶基因转录; (2) 以膜受体的方式被激活, *ERβ* 可以结合在细胞膜上, 介导膜启动的类固醇信号传达(membrane-initiated steroid signaling, MISS), 在表达 *ER* 的 CHO 细胞中, E2 通过膜 *ERβ* 激活 JNK, 而通过 *ERα* 抑制这种激酶^[2]; (3) *ER* 还存在配体非依赖性激活的方式, 包括 *ER* 的磷酸化, 可与相关信号通路发生相互作用^[3]。

ERβ 在成体的生殖系统、中枢神经系统、心血管系统、骨骼及其他组织内有广泛的表达, 在这些组织中起生理调节功能^[4-6]。*ER* 表达下降与乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌等肿瘤的发生相关^[7,8]。

Hong 等^[9]报道, 在人类未分化的胚胎干细胞中, *ER* 表达明显, 认为 *ER* 对胚胎干细胞的分化具有调节作用。然而 *ER* 在胚胎发育过程中的确切表达时期、部位及其功能尚未明确。目前尚未见有关利用克隆的 *ER* 基因片段制备探针, 用胚胎整体原位杂交技术检测其在小鼠胚胎发育过程中表达的文献报道。本实验通过克隆小鼠 *ER* 基因的片段, 制备地高辛标记的 RNA 探针, 运用胚胎整体原位杂交技术研究 *ER* 在小鼠胚胎发育几个时期的表达情况,

为进一步研究打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

健康的成年雌性小鼠及孕鼠, 由徐州医学院实验动物中心提供。

1.1.2 试剂

Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司, RTKit 购于 Qiagen 公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR*、*Hind* 均购于 MBI Fermentas 公司, 小量质粒抽提 Kit、pGEM-3Z 载体、T7 与 Sp6 聚合酶均购于 Promega 公司, 胶回收 Kit 购于 Promega 公司, 地高辛探针标记 Kit 购于 Roche 公司, DEPC 购于 Sigma 公司, 蛋白酶 K 购于 MBICK 公司, 甲酰胺购于 Sigma 公司, 酵母 tRNA 购于 Invitrogen 公司, 绵羊血清购于 Chemicon 公司, 封闭剂购于 Boehringer Mannheim 公司, 抗地高辛抗体购于 Roche 公司, NBT、BCIP 购于 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 *ERβ*/pGEM-3Z 重组质粒的构建

根据 GenBank 中已知的小鼠 *ER* 基因序列 (GenBank accession No. AJ000220), 用 Primer 6.0 软件设计引物, 序列如下:

上游引物: 5'-AGAGAATTCGTCCAGCCAC-GAATCAG-3',

下游引物: 5'-AGAAAGCTTCATCAGCACCT-CCATCC-3'。

所设计引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 预期扩增片段长度 467 bp, 其编码区为 419 至 885。

无菌条件下, Trizol 法提取成年雌性小鼠脑组织中总 RNA, 经逆转录合成第一链 cDNA。进行 PCR 扩增, 条件如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 72℃ 再延

伸 10 min。

1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 采用胶回收 Kit 回收并纯化 PCR 产物, 通过 T4 DNA 连接酶连接反应, 将 PCR 产物连接到 pGEM-3Z 质粒中。

1.2.2 *ERβ* RNA 探针的制备

将 *ERβ*/pGEM-3Z 重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 中, 经筛选、提取、纯化, 再根据 pGEM-3Z 载体的多克隆位点与 *ER* 本身的酶切位点, 选用限制性内切酶 *EcoR*、*Hind* 进行双酶切鉴定克隆的质粒。再进行测序, 鉴定准确后, 分别用限制性内切酶 *Hind* 和 *EcoR* 酶切, 使其线性化。分别回收酶切片段后, 作为正义和反义 *ER* 探针模板。采用 T7 和 Sp6 转录酶, 按照地高辛标记试剂盒提供的步骤, 分别合成正义和反义 dig-*ER* RNA 探针。

1.2.3 胚胎整体原位杂交

胚胎的制备: 将孕鼠断颈处死, 取出胚胎, 将胚胎固定于 4%的多聚甲醛中, 4℃慢速振摇过夜, 胚胎日龄以 dpc(交配后的天数, day post coitum)表示。

第 1 天: 以 PBT(含 1%吐温-20 的 PBS)4℃洗 1 次(5 min), 再于室温下以 25%、50%、75%甲醇/PBT 各 5 min 洗涤, 最后以 100%甲醇洗 5 min。若额外再以 100%甲醇洗 1 次(5 min), 经此处理的胚胎可在 -20℃保存最多 6 个月。将脱水处理后的胚胎于室温下依次以 75%、50%、25%甲醇/PBT 及 PBT 各洗涤 5 min。室温下 6%过氧化氢漂白 1 h, PBT 洗 3 次, 每次 5 min, 然后以适当浓度的蛋白酶 K/PBT(10~20 μg/mL)室温处理胚胎适当时间, 再以 2 mg/mL 甘氨酸/PBT 处理胚胎 10 min, 停止蛋白酶 K 反应, PBT 洗 2 次, 每次 5 min, 最后将胚胎于 0.2%戊二醛/4%多聚甲醛/PBT 室温下再固定 20 min。室温下 PBT 洗胚胎 2 次, 每次 5 min, 以 1:1 混合的杂交液/PBT 洗胚胎 10 min, 杂交液配方: 50%甲酰胺, 5 × SSC(pH 4.5), 1% SDS, 50 μg/mL 酵母 tRNA, 0.5 μg/mL 肝素钠, 再以杂交液洗胚胎 10 min。70℃预杂交至少 1 h, 换新鲜的杂交液, 加探针, 70℃杂交过夜。

第 2 天: 以预热至 70℃的溶液洗胚胎 3 次, 70℃, 每次 30 min (溶液配方: 50%甲酰胺, 5 × SSC(pH 4.5), 1% SDS); 以预热至 65℃的溶液Ⅲ洗胚胎 3 次, 65℃, 每次 30 min (溶液Ⅲ配方: 50%甲酰胺, 2 × SSC(pH 4.5))。室温下以新鲜的 TBST 洗胚胎 3 次, 每次 5 min, 室温下封闭 60~90 min。封闭液配方: 10%热灭活的绵羊血清/0.1% Boehringer Mannheim blocking reagent/TBST。胚胎粉预吸附处理, 换封闭液, 加抗体(1:2000), 4℃孵育过夜。

第 3 天: 室温下以 TBST 洗胚胎 3 次, 每次 5 min, 再以 TBST 洗胚胎 5 次, 每次 1~1.5 h, 再以 TBST 洗胚胎, 4℃慢速振摇过夜。

第 4 天: 室温下以 NTMT 洗胚胎 3 次, 每次至少 10 min, 换 NTMT, 加反应混合液(125 μg/mL BCIP 与 250 μg/mL NBT 于 NTMT 中), 室温下轻摇至反应完全。以 PBS 或 PBT 洗胚胎, 以 4%多聚甲醛/0.2%戊二醛后固定胚胎, PBS 洗胚胎 2 次。摄影记录。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增 *ER* 片段

本实验首先提取健康成年雌性小鼠脑组织总 RNA, 经 RT-PCR, 扩增 *ERβ* 片段。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 在 467 bp 附近处出现单一条带, 与预期扩增片段大小相符(图 1)。

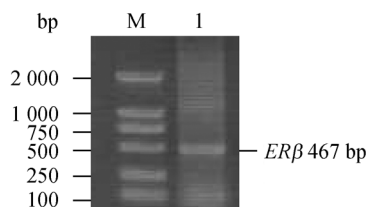


图 1 RT-PCR 扩增 *ERβ* 产物

M: DNA 分子量标准品(DL2000); 1: *ERβ* PCR 产物。

Fig. 1 PCR products of *ERβ* gene

M: DNA Marker DL2000; 1: PCR products of *ERβ* gene.

2.2 *ER* /pGEM-3Z 重组质粒的双酶切鉴定与序列测定

采用胶回收 Kit 将 PCR 产物胶上回收, 将其克隆到 pGEM-3Z 载体, 以限制性内切酶 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切鉴定, 显示出和插入片段相符的条带(图 2)。

插入片段送上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 测序鉴定, 经 GenBank 检索与 *ERβ* 序列 99.8%同源。

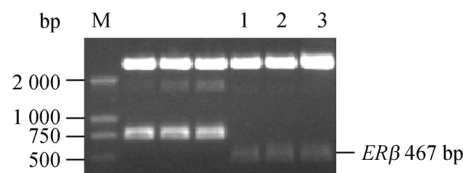


图 2 *ERβ*/pGEM-3Z 重组质粒双酶切产物

M: DNA 分子量标准品(DL-2000); 1~3: *ERβ*/pGEM-3Z 重组质粒双酶切产物。

Fig. 2 The products of recombinant plasmids *ERβ*/pGEM-3Z digested by double enzymes

M: DNA Marker DL2000; 1~3: Products of *ERβ*/pGEM-3Z digested by double enzymes.

对制备的正反义探针紫外检测 OD 值, 正义探针为 0.003, 浓度计算为 360 ng/ μ L, 反义探针 OD 值为 0.004, 浓度计算为 480 ng/ μ L, 适用于原位杂交。

2.3 胚胎的整体原位杂交

采用制备的正、反义探针检测小鼠胚胎, 胚胎整体原位杂交的结果显示: 反义探针杂交的 10.5 dpc 胚胎在脑、脊神经管、生殖脊、心包、肢芽及颌弓部位呈现清晰的杂交信号(图 3, A), 而正义探针杂交的胚胎无阳性信号(图 3, B); 反义探针杂交的 13.5 DPC 胚胎在端脑、中脑、延髓、脊髓、肢芽部位呈现清晰的杂交信号(图 3, C), 而正义探针杂交的胚胎无阳性信号(图 3, D)。

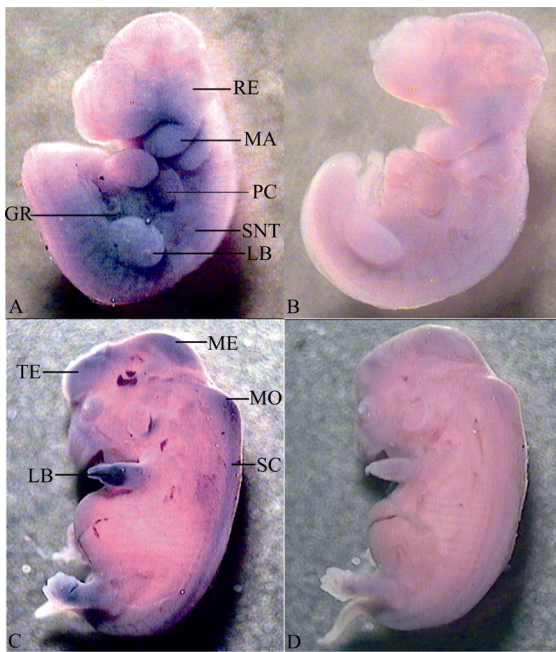


图 3 小鼠胚胎整体原位杂交

A: 小鼠 10.5 dpc 胚胎 $ER\beta$ 反义 RNA 探针的杂交结果: RE(菱脑), MA(颌弓), PC(心包), SNT(脊神经管), GR(生殖脊), LB(肢芽); B: 小鼠 10.5 dpc 胚胎 $ER\beta$ 正义 RNA 探针的杂交结果; C: 13.5 dpc 胚胎 $ER\beta$ 反义 RNA 探针的杂交结果: TE(端脑), ME(中脑), MO(延髓), SC(脊髓), LB(肢芽); D: 小鼠 13.5 dpc 胚胎 $ER\beta$ 正义 RNA 探针的杂交结果。

Fig. 3 Whole-mount *in situ* hybridization of mouse embryo

A: Hybridization results of 10.5 dpc embryo detected by $ER\beta$ RNA anti-sense probe: RE (rhombencephalon), MA (mandibular arch), PC (pericardium), SNT (spinal neural tube), GR (genital ridge), LB (limb bud); B: Hybridization results of 10.5 dpc embryo detected by $ER\beta$ RNA sense probe; C: Hybridization results of 13.5 dpc embryo detected by $ER\beta$ RNA anti-sense probe: TE (telecephalon), ME (mesencephalon), MO (medulla oblongata), SC (spinal cord), LB (limb bud); D: Hybridization results of 13.5 dpc embryo detected by $ER\beta$ RNA sense probe.

3 讨论

$ER\beta$ 在成体的两性生殖系统中有着非常广泛

的表达。 ER 在成体的卵巢粒细胞、卵泡膜细胞、上皮细胞、基质细胞和黄体中均有表达; 在成体子宫内, ER 主要表达在内膜腔上皮和腺上皮细胞, 部分表达于子宫平滑肌细胞; 在成体阴道上皮细胞和平滑肌细胞中均发现 $ER\beta$ 的表达; $ER\beta$ 在成体睾丸的支持细胞、输精管上皮细胞、附睾与前列腺的上皮细胞中均有表达, 并有研究表明在成体卵泡颗粒细胞和发育中的精子细胞中只表达 $ER\beta$, 说明 $ER\beta$ 在成体两性生殖系统功能的维持中起调节作用 [10-12]。 $ER\beta$ KO 成体小鼠子宫、阴道、睾丸的组织病理学研究表明它们与野生型小鼠没有区别, $ER\beta$ KO 成体小鼠卵巢可见发育的卵泡, 但排卵的迹象很少。 $ER\beta$ KO 雌雄性小鼠均可育, 但 $ER\beta$ KO 雌性小鼠生殖能力被削弱, 表现为受孕的胎数明显减少, 卵泡闭锁和停止排卵, 卵巢间质增生 [13]。这些研究表明, $ER\beta$ 对小鼠生殖系统发育及正常功能的维持的影响并不是决定性的。小鼠胚胎生殖系统发育过程中, 生殖嵴从临近中肾的间介中胚层隆起, 最早约在 10 dpc 可见明显的肾生殖嵴, 而生殖嵴原基明显的性别分化迹象最早要到 12.5 dpc 才可见, 12 dpc 稍后开始形成两性生殖腺, 因此该时期是性别分化的关键时期。本实验的结果表明, $ER\beta$ 在小鼠 10.5 dpc 胚胎的生殖嵴中有着强烈的表达, 并维持到 11.5 dpc (结果未显示), 暗示着 $ER\beta$ 可能在性别分化过程中起调节作用, 其在性别分化过程中扮演何种角色有待进一步研究。

$ER\beta$ 在成体的中枢神经系统中有着广泛分布。 $ER\beta$ 在成体小鼠基底前脑的内侧隔核、斜角带垂直部、斜角带水平部及嗅结节岛等部位均有表达; 在间脑的室旁核和视上核 $ER\beta$ 高表达, 其中视交叉上核、下丘脑结节、松果体只表达 $ER\beta$ mRNA; 在脑干的黑质、中脑导水管、三叉神经脑桥核、三叉神经运动核前庭上核等部位均有 $ER\beta$ 表达; 在海马结构、杏仁核簇中, $ER\beta$ 高表达于海马、杏仁内侧核、皮质核部位, 在海马下托表达最强, CA3、CA4 与齿状回相对较弱; 在脊髓的 III-V、VIII 和 IX 层仅表达 $ER\beta$ [4,14,15]。 $ER\beta$ 可能介导了雌激素对学习记忆的调节, 可能是学习记忆的功能性受体, $ER\beta$ KO 小鼠的学习记忆能力严重受损 [16]。另外推测 $ER\beta$ 在中脑的多巴胺系统区域参与运动、认知、情感功能调节 [17]。此外, $ER\beta$ 还参与神经内分泌系统的调节, 并具有神经元保护作用。小鼠胚胎神经板最早在 7.5 dpc 时出现, 其两侧边缘升高形成神经褶, 之后融合形成神经管, 直到 10.5 dpc 神经管最终闭合。神经管沿前后轴产

生区域分化, 分化形成各脑区与脊髓, 10~14 dpc 是神经管分化的关键时期。本实验的结果表明, *ERβ* 在 10.5 dpc 胚胎的菱脑及脊神经管有着强烈的表达, 并在 11.5 dpc、12.5 dpc 胚胎的脑及脊髓区域持续表达(结果未显示), 暗示着 *ERβ* 可能在小鼠胚胎神经管的早期区域化过程中起作用; *ERβ* 在 13.5 dpc 胚胎的端脑、中脑、延髓及脊髓中表达明显, 说明 *ERβ* 也许在 3 个原始脑泡进一步分化及脊髓的分化过程中起作用。

小鼠胚胎的前肢芽最早约在 9.0~9.5 dpc 出现在临近第 7~12 对体节处, 后肢芽在 9.5~10 dpc 出现在第 23~28 对体节处。本实验结果显示, *ERβ* 在 10.5~13.5 dpc 胚胎的肢芽中持续表达, 说明 *ERβ* 在小鼠肢芽分化中起作用。研究表明 *ERβ* 在骨生长板的增殖及肥大前软骨细胞中高表达, 其在骨形成过程中起重要作用^[18]。因此, 我们推测 *ERβ* 可能在肢芽中的骨与软骨的形成与分化中起调控作用。另外, *ERβ* 在 10.5 dpc 胚胎的心包内表达明显, 推测可能在心脏发育过程中起作用。*ERβ* 在人血管平滑肌中先于 *ERα* 表达^[19], 其对心血管系统起保护作用。据此, 我们推测 *ERβ* 也许在心脏发育过程中, 在心血管及心肌的形成中起作用。

参考文献(References):

- [1] Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 5925-5930. [\[DOI\]](#)
- [2] Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ERα and ERβ expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(2): 307-319. [\[DOI\]](#)
- [3] Taylor AP, Osorio L, Craig R, Raleigh JA, Ying ZI, Goldenberg DM, Blumenthal RD. Tumor-specific regulation of angiogenic growth factors and their receptors during recovery from cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 1213-1222.
- [4] Thakur MK, Sharma PK. Transcription of estrogen receptor α and β in mouse cerebral cortex: effect of age, sex, 17β-estradiol and testosterone. *Neurochem Int*, 2007, 50(2): 314-321. [\[DOI\]](#)
- [5] Walker VR, Korach KS. Estrogen receptor knockout mice as a model for endocrine research. *ILAR J*, 2004, 45(4): 455-461.
- [6] Geng L, Yao ZW, Yang HC, Luo JY, Han LL, Lu Q. Association of CA repeat polymorphism in estrogen receptor β gene with postmenopausal osteoporosis in chinese. *J Genet Genom*, 2007, 34(10): 868-876. [\[DOI\]](#)
- [7] Gwendal L. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2006, 231(2): 151-157. [\[DOI\]](#)
- [8] Bardin A, Hoffmann P, Bouille N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5861-5869. [\[DOI\]](#)
- [9] Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SL, Lee JB, Yoon HS, Kim CH. Expression of estrogen receptor alpha and beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells*, 2004, 18(3): 320-325.
- [10] Mowa CN, Lwanaga T. Differential distribution of oestrogen-α and -β mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by *in situ* hybridization. *J Endocrinol*, 2000, 165(1): 59-66. [\[DOI\]](#)
- [11] Fu X, Rezapour M, Xu XX, Li L, Sjögren C, Ulmsten U. Expression of estrogen receptor-alpha and beta in anterior vaginal walls of genuine stress incontinent woman. *Int Urogynecol J*, 2003, 14(4): 276-281. [\[DOI\]](#)
- [12] Fujimoto N, Nakajima O, Kitamura S, Ohtsuka S. *In vivo* function of the 5' flanking region of mouse estrogen receptor β gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 105(1-5): 57-62. [\[DOI\]](#)
- [13] Hewitt SC, Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res*, 2000, 2(5): 345-352. [\[DOI\]](#)
- [14] Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 1997, 388(4): 507-525. [\[DOI\]](#)
- [15] Alves SE, Lopez V, McEwen BS, Weiland NG. Differential colocalization of estrogen receptorβ (ERβ) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 3281-3286. [\[DOI\]](#)
- [16] Rissman EF, Heck AL, Leonard JE, Shupnik MA, Gustafsson JA. Disruption of estrogen receptor-β gene impairs spatial learning in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 3996-4001. [\[DOI\]](#)
- [17] Creutz LM, Kritzer MF. Estrogen receptor beta immunoreactivity in the midbrain of adult rats: regional, subregional, and cellular localization in the A10, A9, and A8 dopamine cell groups. *J Comp Neurol*, 2002, 446(3): 288-300. [\[DOI\]](#)
- [18] Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocr Metab*, 2001, 86(5): 2309-2314. [\[DOI\]](#)
- [19] Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham JD, Horwitz KB, Horwitz LD. Estrogen receptor α and β prevalence of estrogen receptor β mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation*, 2000, 101(15): 1792-1798.