

R-(α)-甲基组胺对 AtT20 垂体瘤细胞 Pomc 及其转录因子表达的影响

王晓敏,潘志强,梁龙龙,方肇勤,卢文丽,刘小美
(上海中医药大学基础医学院,上海 201203)

摘要: [目的] 研究 R-(α)-甲基组胺[R-(α)-MeHA]对 AtT20 垂体瘤细胞 Pomc 及其转录因子表达的影响。[方法] 以小鼠垂体瘤细胞(AtT20)为实验对象,分别采用 0.02~12.5 μ mol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 24h,通过 MTT 检测药物对细胞增殖的影响;采用 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 30min、1、2、4、8、12h 等相应时间,运用 ELISA 方法检测细胞分泌至培养液的促肾上腺皮质激素(ACTH)含量,RT-qPCR 方法检测相关基因 mRNA 表达,Western blot 方法检测相关蛋白表达。[结果] 0.02~12.5 μ mol/L 的 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞的增殖无抑制作用更无毒性作用。0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞 ACTH 分泌功能无明显作用。与对照组比较,0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 4h 后,可增强阿片促黑素皮质素原(Pomc)基因表达,0.5 μ mol/L R-(α)-MeHA 促进 Pomc 蛋白表达;此外 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 30min~12h 不同时间点后 *Pou1f1* 基因表达均显著上调,其中以 4h 最为明显,上调达 3 倍 ($P<0.05$);同样,0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 作用 4h 也显著促进 *Egr1* 基因表达上调约 2 倍 ($P<0.05$);作用 1h 显著增强了 *Prop1* 基因表达,上调近 4 倍 ($P<0.05$);干预 4h、8h 均显著上调 *Foxl2* 基因表达,上调约 3 倍 ($P<0.05$),对 *Neurod1*、*Pitx1* 和 *Tbx19* 基因表达无明显影响。[结论] R-(α)-MeHA 具有促进 Pomc 基因以及其转录因子 *Pou1f1*、*Egr1*、*Prop1* 和 *Foxl2* 的表达作用。

关键词: AtT20 垂体瘤细胞;R-(α)-甲基组胺;基因表达;Pomc;Acth;Pou1f1

中图分类号: R739 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2017)08-0650-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.08.A012

Effect of R-(α)-MeHA on Expression of Pomc and Transcription Factors in Pituitary Tumor AtT20 Cells

WANG Xiao-min, PAN Zhi-qiang, LIANG Long-long, et al.

(Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: [Purpose] To study the effect of R-(α)-MeHA on the expression of Pomc and transcription factors in mouse pituitary tumor AtT20 cells. [Methods] Mouse pituitary tumor AtT20 cells were treated with 0.02~12.5 μ mol/L R-(α)-MeHA for 24h, and cell proliferation was detected by MTT assay. Then, AtT20 cells were treated with 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA for 30min, 1, 2, 4, 8, 12h, and cell culture supernatants were collected and ACTH were tested by ELISA kit. The cells total RNA was extracted using TRIzol kit and was reverse transcribed to obtain the cDNA, which was amplified by real time quantitative PCR (RT-qPCR). The cells were lysed with RIPA lysis buffer and protein expression was detected by Western blot. [Results] Compared with the control group, the proliferation of AtT20 cells was not affected by 0.02~12.5 μ mol/L R-(α)-MeHA and ACTH level was slight changed by 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA. However, R-(α)-MeHA promoted pomc mRNA and POMC protein expression after treatment for 4h. *Pou1f1* and *Egr1* mRNA expression was significantly increased after 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA treatment for 4h ($P<0.05$); the *Prop1* mRNA expression was significantly increased after treatment for 1h ($P<0.05$); and *Foxl2* mRNA expression was increased significantly after treatment for 4h and 8h ($P<0.05$). However, *Neurod1*, *Pitx1* and *Tbx19* mRNA expression were not affected by R-(α)-MeHA treatment. [Conclusion] Pomc and its transcription factors *Pou1f1*, *Egr1*, *Prop1* and *Foxl2* gene expressions are regulated by R-(α)-MeHA in mouse pituitary tumor AtT20 cells.

Key words: AtT20 pituitary tumor cells; R-(α)-MeHA; gene expression; Pomc; Acth; Pou1f1

垂体是哺乳动物重要的内分泌腺体, 尽管体积

小,但是生理作用强大。垂体前叶各种细胞分泌生长激素(GH)、促甲状腺激素(TSH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、催乳素(PRL)、促性腺激素(FSH与LH)等多种激素,发挥远程调控相应靶器官的生理功能,同时又受下丘脑分泌激素正调控以及垂体自身分泌

收稿日期:2016-09-21;修回日期:2016-12-18

基金项目:上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2014年-2016年)(ZY3-CCCX-3-3010);上海市健康辨识与评估重点实验室建设项目(13DZ2261000)

通讯作者:潘志强, E-mail: pzq527@163.com

激素的负调控。值得注意的是,垂体细胞在分泌这些激素的同时,受到上游不同转录因子的调控,其中 Pou1f1 (原称 Pit1) 是垂体特异性转录因子,它对 *GH*、*PRL*、*TSH β* 基因的表达是必需的^[1];此外,Pitx1 (别称 Ptx1)、*Neurod1*、*Tbx19* (别称 Tpit) 具有调节 ACTH 分泌及 *Pomc* 基因表达的作用^[2]。

有报道,组胺(histamine,HA)作为体内有功能活性的物质,它可调节垂体分泌 ACTH。其中,组胺 H3 受体激动剂 R-(α)-甲基组胺(R-(α)-MeHA,简称 RMeHA)能够促进 AtT20 细胞分泌 ACTH,并能被 H3 受体特异性拮抗剂噻普酰胺(thiopramide)所拮抗^[3,4],然而,并未深入阐明其作用机制。本研究采用 H3 受体激动剂 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 小鼠垂体瘤细胞,观察其对细胞 ACTH 分泌、*Pomc* 及其上游转录因子基因表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠垂体瘤细胞(AtT20),购自中国科学院细胞库。

1.2 药品与试剂

R-(α)-MeHA、二甲基亚砷(DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司。RIPA 裂解液和免疫印迹化学发光试剂 ECL 试剂盒购自上海碧云天生物试剂有限公司,胎牛血清、100U/L 青链霉素、DMEM-F12 培养液均购自 Gibco 公司。TRIzol 裂解液购自 Invitrogen 公司;PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司;采用 Primer3 (v.0.4.0) 在线软件设计引物并委托 Life Technologies 公司合成。小鼠促肾上腺皮质激素 ELISA 试剂盒购自美国 Peninsula Laboratories 公司。抗体 POMC 购自 Abcam 公司、 β -actin 购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 主要仪器

7500 Fast Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司),Elx800 型酶标仪(Biotek 公司),Alpha 化学发光凝胶成像系统(Protein-Simple 公司)等。

1.4 细胞培养及分组

AtT20 细胞用含 10%胎牛血清、100U/L 青链霉素的 DMEM-F12 培养液常规培养,置于 5%CO₂、37℃湿饱和的条件下培养。细胞生长至 80%~85%融

合时,铺板后培养,取其对数生长期细胞进行实验。药物干预细胞时,采用不含血清培养液,依据实验目的分别采用 0.02~12.5 μ mol/L 的 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 24h 进行 MTT 检测;采用 0.1 μ mol/L 的 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 30min、1、2、4、8、12h 等相应时间,对照组采用 0.1% DMSO 作对照,并收集细胞上清培养液用于检测 ACTH 含量,收集细胞进行 mRNA 与蛋白表达检测。

1.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 ACTH 含量

AtT20 细胞经 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 治疗 30min、1、2、4、8、12h 后,收集细胞培养上清液,根据小鼠 ACTH 试剂盒说明书进行操作,检测培养液中 ACTH 含量。

1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测基因 mRNA 表达

上下游引物序列采用 Primer3(v.0.4.0)在线软件合成(Table 1),委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提肾上腺总 RNA;逆转录反应体系 20 μ l,反应条件为 37℃×15min,85℃×5s,4℃;PCR 扩增反应体系为 20 μ l,反应程序为 95℃×3min,95℃×30s,60℃×30s,40 cycles。基因相对表达量分析方法:采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析,以正常组作为对照组,以 β -actin 基因 Ct 均值作为内参组, Δ Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因} (其中,Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值), $\Delta\Delta$ Ct= Δ CT_{实验组}- Δ CT_{对照组},目的基因相对表达量=2^{- $\Delta\Delta$ CT}。

1.7 Western blot 技术检测蛋白表达

采用 RIPA 裂解液处理 AtT20 细胞,收集蛋白质样品并予以定量,通过变性处理,分别执行聚丙烯酰胺电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等实验流程,其中,一抗浓度内参 β -actin 以 1:20 000 稀释、POMC 抗体 1:3000 稀释。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad.Prism6.0 专业软件进行作图及统计分析,采用 Newman-Keuls post-hoc 进行方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞增殖的影响

采用 0.02~12.5 μ mol/L 的 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 24h 进行 MTT 检测,与对照组比较,不同浓度

Table 1 The primer sequences of RT-qPCR

Genes	GenBank No.	Primer sequences	Product(bp)
<i>β-actin</i>	NM_007393	Forward:5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' Reverse:5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'	165
<i>Egr1</i>	NM_007913	Forward:5'-CCACAACAACAGGGAGACCT-3' Reverse:5'-ACTGAGTGGCGAAGGCTTTA-3'	124
<i>Foxl2</i>	NM_012020	Forward:5'-CCTCAACGAGTGCTTCATCA-3' Reverse:5'-CCCTTCTCGAACATGTCCTC-3'	102
<i>Neurod1</i>	NM_010894	Forward:5'-CAAAGCCACGGATCAATCTT-3' Reverse:5'-CCCGGGAATAGTGAAGTGA-3'	168
<i>Pitx1</i>	NM_011097	Forward:5'-CTGCCGGCTACTCCTACAAC-3' Reverse:5'-GGCATGGTCATGGAAGAGAT-3'	151
<i>Pomc</i>	NM_001278581	Forward:5'-CATTAGGCTTGGAGCAGGTC-3' Reverse:5'-CTTCTCGGAGGTCATGAAGC-3'	128
<i>Pou1f1</i>	NM_008849	Forward:5'-CACGGCTCAGAATTCAGTCA-3' Reverse:5'-CTGATGGTTGTCTCCGTTT-3'	185
<i>Prop1</i>	NM_008936	Forward:5'-AGAGCTGGGGAGACCTAAGC-3' Reverse:5'-TCACTGAGGCCAGTGTCTTG-3'	174
<i>Tbx19</i>	NM_032005	Forward:5'-GGCTCACTGGATGAAAGCTC-3' Reverse:5'-GGCGAAAGGTTGTACTTGA-3'	244

R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞增殖无明显影响(Figure 1), 提示 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞无抑制作用, 更无毒性作用。

2.2 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞 ACTH 分泌的影响

AtT20 细胞经 0.1μmol/L R-(α)-MeHA 处理 30min~12h 后, 检测细胞上清液中 ACTH 含量, 与对照组比较, ACTH 无明显变化, 细胞分泌量为 7~9ng/ml (Figure 2), 提示 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞 ACTH 分泌功能无明显作用。

2.3 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞 Pomc 基因与蛋白表达的影响

与对照组比较, 0.1μmol/L R-(α)-MeHA 干预

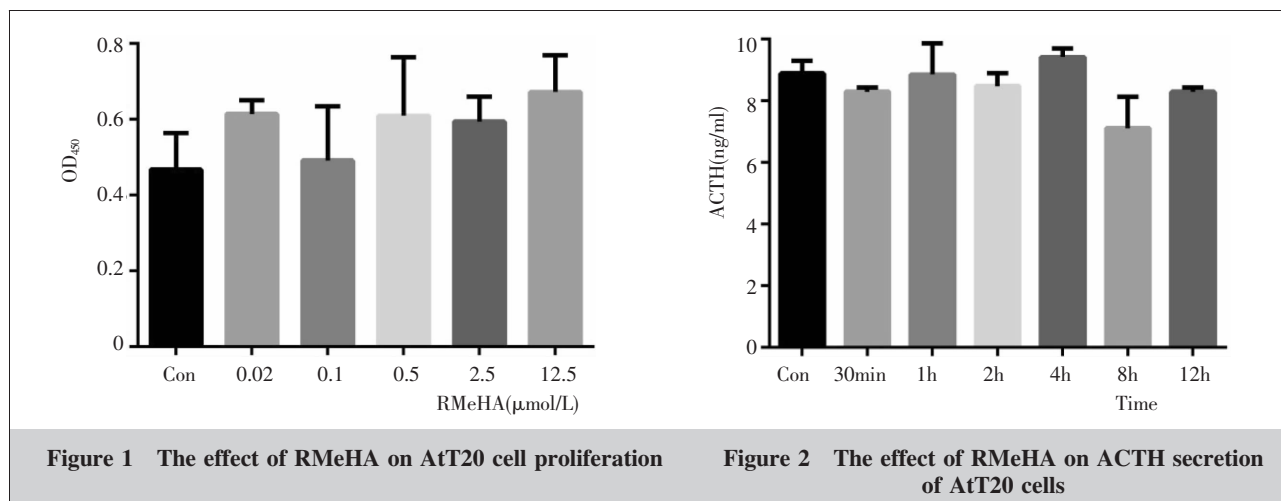
AtT20 细胞 4h 后, 可促进 *Pomc* 基因表达上调 20% 以上 (Figure 3); 与对照组比较, 0.5μmol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 4h 后, 可促进 *Pomc* 蛋白表达 (Figure 4)。提示 R-(α)-MeHA 可能具有促进 AtT20 垂体细胞 *Pomc* 基因与蛋白表达作用。

2.4 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞激素分泌相关转录因子基因表达的作用

与对照组比较, 0.1μmol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 30min~12h 均上调 *Pou1f1* 基因表达, 以 4h 作用后显著促进 *Pou1f1* 基因表达, 上调 3 倍 ($P < 0.05$) (Figure 5); 同样, 0.1μmol/L

R-(α)-MeHA 作用 4h 也显著促进 *Egr1* 基因表达, 上调约 2 倍 ($P < 0.05$) (Figure 6)。提示组胺 H3 受体激动剂 R-(α)-MeHA 短时程干预 AtT20 细胞后以作用 4h 时点可增强垂体的特异性转录因子 *Pou1f1* 基因表达, 及核转录早期反应因子 *Egr1* 基因表达, 从而调控相应的靶基因转录功能。

与对照组比较, 0.1μmol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 1h 显著增强 *Prop1* 基因表达, 上调近 4 倍 ($P < 0.05$) (Figure 7); 0.1μmol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 4h、8h 均显著上调 *Foxl2* 基因表达, 上调约 3 倍, $P < 0.05$ (Figure 8)。提示组胺 H3 受体激动剂 R-(α)-MeHA 短时程干预 AtT20 细胞后可促进核转



录因子 *Prop1* 和 *Foxl2* 基因表达, 但作用的时点有差异性。

然而, 与对照组比较, 0.1 μ mol/L R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 30min~12h, 对 *Neurod1*、*Pitx1* 和 *Tbx19* 基因表达无明显影响(Figure 9~11)。

3 讨论

据本课题组既往的小鼠垂体组织表达谱基因芯片数据可知^[5], *Pomc* 基因表达量在垂体组织排序第一位, 提示 *Pomc* 在垂体生理功能的重要性。已知

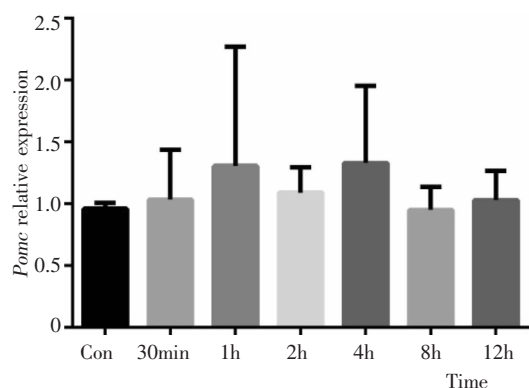


Figure 3 *Pomc* mRNA expression by RMeHA in AtT20 cells

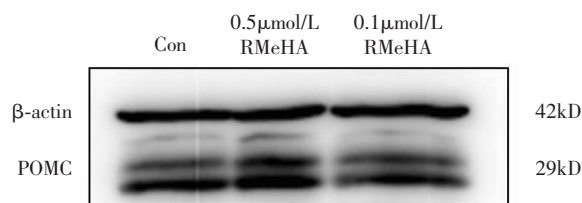


Figure 4 *Pomc* protein expression by RMeHA in AtT20 cells

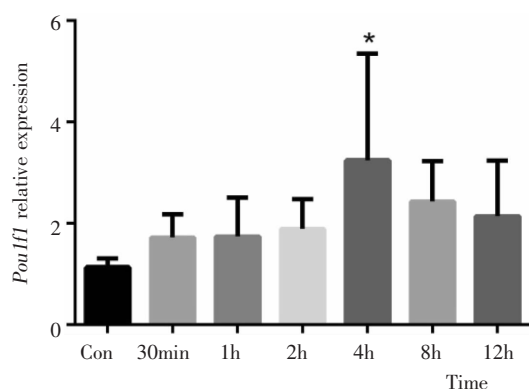


Figure 5 *Pou1f1* mRNA expression by RMeHA treatment from 30min to 12h in AtT20 cells

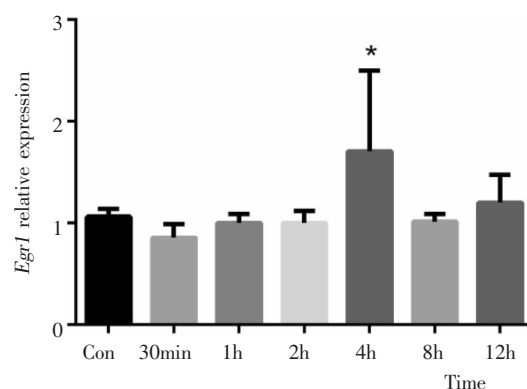


Figure 6 *Egr1* mRNA expression by RMeHA treatment from 30min to 12h in AtT20 cells

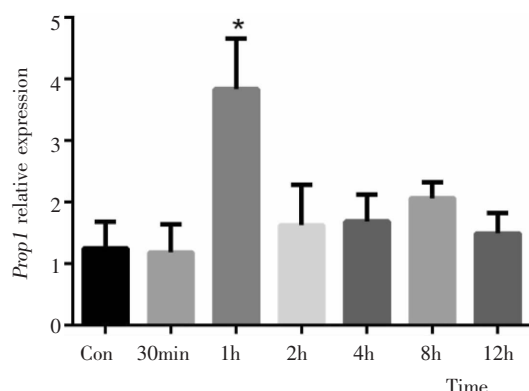


Figure 7 *Prop1* mRNA expression by RMeHA treatment from 30min to 12h in AtT20 cells

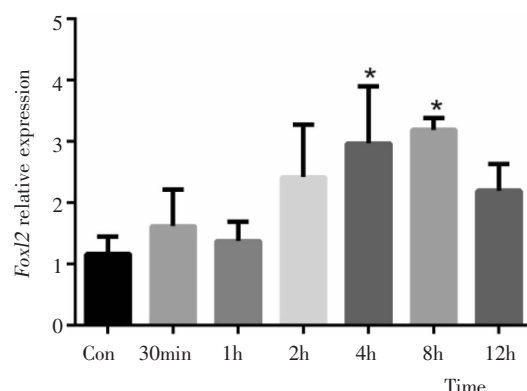
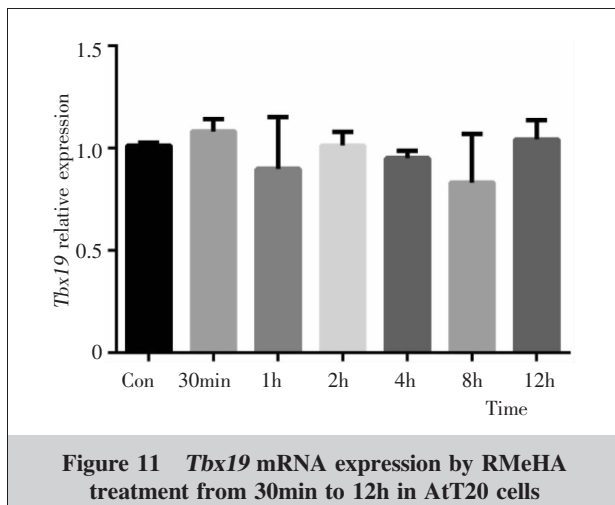
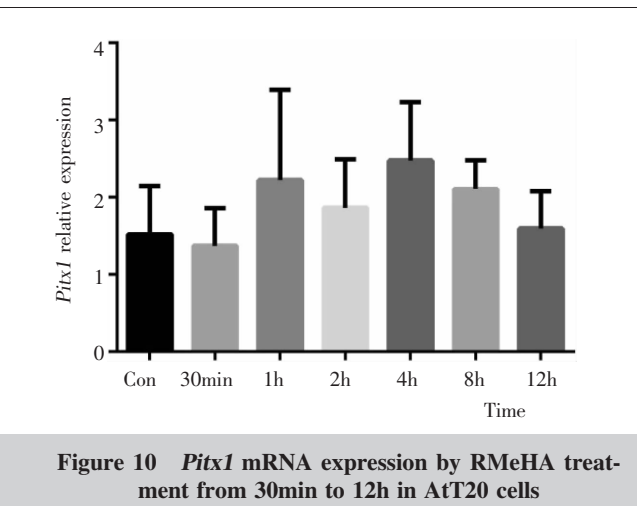
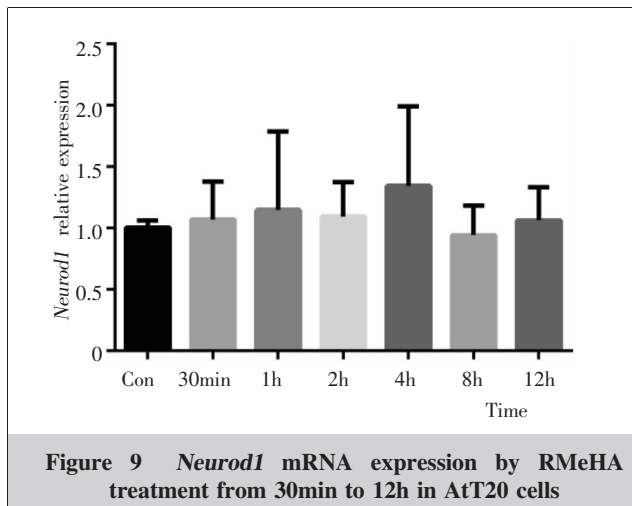


Figure 8 *Foxl2* mRNA expression by RMeHA treatment from 30min to 12h in AtT20 cells



动剂 R-(α)-甲基组胺 [R-(α)-MeHA] 能够促进 AtT20 细胞分泌 ACTH^[3,4]; 且 AtT20 细胞传代 2~4 天后细胞体积逐渐增大, 单个细胞呈梭状、岛状或枫叶状, 有的呈多角形或簇状接合, 部分体积较大的细胞开始融合, 细胞中央颗粒明显可见^[4]。本研究采用 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞, 发现 R-(α)-MeHA 对细胞 ACTH 分泌无明显作用, 并发现 AtT20 细胞是小圆球状细胞、在传代培养及用药干预过程中始终处于悬浮状态生长且容易聚集成团、没有出现贴壁生长特征, 我们对该细胞形态观察与美国菌种保藏中心 (ATCC) 官网 (<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-89.aspx#culturemethod>) 发布的 AtT-20 (ATCC® CCL-89™) 细胞形态完全一致。推测 AtT20 细胞的生长状态的差异可能是本研究结果与上述文献报道的差异关键所在, 也提示 AtT20 细胞体外培养可能与不同传代等实验因素有关。

本研究的结果提示, 0.02~12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 R-(α)-MeHA 对 AtT20 细胞作用是安全的; 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 R-(α)-MeHA 干预 AtT20 细胞 4h 后, 可轻度增强 *Pomc* 基因与蛋白表达, 推测可能与 *Pomc* 基因在垂体细胞中表达量最大有关, 尽管无统计学差异, 但是 R-(α)-MeHA 上调 *Pomc* 表达量达 20% 以上可能具有实际调控作用。值得注意的是, 垂体特异性转录因子 *Pou1f1* 能被 R-(α)-MeHA 调节, 尤其以 4h 作用后上调最明显; 同样, 垂体特异性转录因子祖蛋白 (*Prop1*)、*Egr1*、*Foxl2* 等转录因子也可被 R-(α)-MeHA 正向调节。有研究显示^[8-10], *Pou1f1* 是垂体前叶的转录因子, *Pou1f1* 突变会引起垂体前叶发育不良、生长激素和催乳素缺乏和不同程度的机能衰退症。 *Prop1*

Pomc 是由前阿片促黑素皮质素原 (Pre-proopiomelanocortin) 生成, 同时, β -促脂解素 (β -LPH)、 α -促黑激素 (α -MSH)、 β -促黑激素 (β -MSH)、 β -内啡肽 (β -END) 也由前阿片促黑素皮质素原生成。 *Pomc* 基因在腺垂体、中间叶及垂体外组织 (脑、性腺) 均有表达, 但在不同组织中表达调控有所不同。在腺垂体, *Pomc* 基因的表达主要受下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 和糖皮质激素的调控。而 *Pomc* 是 ACTH 及其相关肽的共同前体, 因此 *Pomc* 基因表达对调控垂体—肾上腺皮质轴功能的相对稳定性发挥关键作用^[6,7]。而体内一些活性物质通过调节垂体 *Pomc* 基因表达往往会影响到肾上腺皮质轴的功能, 同时调节 *Pomc* 的相关转录因子, 也可间接影响到肾上腺皮质轴的功能。

有研究表明组胺作为体内有功能活性的物质, 它可调节垂体 ACTH 的分泌, 比如, 组胺 H3 受体激

在垂体发育早期很重要, *Prop1* 突变会引起垂体多种激素合成与分泌量减弱^[11,12]。 *Egr1* 是促性腺激素细胞 *Lhb* 启动激活所需的转录因子、也是雌性生育必需的因子^[13,14]。 *Foxl2* 转录因子表达于卵巢、眼和垂体, 并影响与调控垂体早期发育过程, 且 *Foxl2* 与其他转录因子一起作用可影响垂体腺瘤的生长^[15,16]。这些转录因子参与垂体重要的生理功能。本研究发发现体内有功能活性的物质 R-(α)-甲基组胺具有促进 AtT20 垂体瘤细胞 *Pomc* 及部分转录因子表达作用, 从而间接影响垂体相关促靶腺激素的分泌, 其具体调控机制需要深入探索。

参考文献:

- [1] Herman JP, Jullien N, Guillen S, et al. Research resource: a genome-wide study identifies potential new target genes for POU1F1[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(8): 1455–1463.
- [2] Osamura RY, Egashira N, Kajiya H, et al. Pathology, pathogenesis and therapy of growth hormone(GH)-producing pituitary adenomas: technical advances in histochemistry and their contribution[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2009, 42(4): 95–104.
- [3] Xie JJ, Luo XX, Zhao DH. Histamine H3 receptors regulate ACTH release by AtT-20 cells[J]. *Journal of the Forth Military Medical University*, 2001, 22(7): 584–586. [谢建军, 罗晓星, 赵德化. 组胺 H3 受体对垂体瘤 AtT-20 细胞分泌 ACTH 的调节作用[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(7): 584–586.]
- [4] Meng J, Xie JJ, Yang TH, et al. H4 receptor-mediated stimulation of histamine on AtT-20 cells to release ACTH [J]. *Journal of the Forth Military Medical University*, 2006, 27(10): 905–907. [孟嘉, 谢建军, 杨铁虹, 等. H4 受体介导组胺刺激 AtT-20 细胞分泌 ACTH [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(10): 905–907.]
- [5] Liu XM, Fang ZQ, Pan ZQ, et al. Analysis of high-expressive genes in pituitary of H22 tumour mice with different symptoms and signs[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2009, 19(5): 290–294. [刘小美, 方肇勤, 潘志强, 等. 不同证候 H22 荷瘤小鼠垂体高表达基因分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(5): 290–294.]
- [6] Luo WJ, Chen YM, Liu XH, et al. Effect of cold stress on ACTH secretion and POMC gene expression in rat primary cultures of anterior pituitary cells and the role of zinc[J]. *Journal of the Forth Military Medical University*, 2004, 25(2): 114–117. [骆文静, 陈耀明, 刘秀红, 等. 冷应激对大鼠垂体前叶离体细胞 ACTH 分泌和 POMC 基因表达的影响及锌的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(2): 114–117.]
- [7] Wei P, Wang YZ. The research reviews of POMC gene expression and regulation inside and outside of the pituitary [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Endocrine*, 2001, 21(1): 39–41. [魏平, 汪寅章. 垂体内外 POMC 基因表达调控研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(1): 39–41.]
- [8] Odle AK, Allensworth-James ML, Akhter N, et al. A sex-dependent, tropic role for leptin in the somatotrope as a regulator of POU1F1 and POU1F1-dependent hormones[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(10): 3958–3971.
- [9] Birla S, Khadgawat R, Jyotsna VP, et al. Identification of novel PROP1 and POU1F1 mutations in patients with combined pituitary hormone deficiency[J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(12): 822–827.
- [10] Lee NC, Tsai WY, Peng SF, et al. Congenital hypopituitarism due to POU1F1 gene mutation[J]. *J Formos Med Assoc*, 2011, 110(1): 58–61.
- [11] Davis SW, Keisler JL, Pérez-Millán MI, et al. All hormone-producing cell types of the pituitary intermediate and anterior lobes derive from Prop1-expressing progenitors [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(4): 1385–1396.
- [12] Ward RD, Raetzman LT, Suh H, et al. Role of PROP1 in pituitary gland growth[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(3): 698–710.
- [13] Gajewska A, Herman AP, Wolińska-Witort E, et al. In vivo oestrogenic modulation of *Egr1* and *Pitx1* gene expression in female rat pituitary gland[J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(3): 355–366.
- [14] Man PS, Wells T, Carter DA. Cellular distribution of *Egr1* transcription in the male rat pituitary gland [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(2): 271–280.
- [15] Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, et al. FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(11): 2796–2805.
- [16] Chesnokova V, Zonis S, Wawrowsky K, et al. Clusterin and FOXL2 act concordantly to regulate pituitary gonadotroph adenoma growth[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(12): 2092–2103.