

产舒恒,陈子璇,张戌园,等. FSH 和 LH 及其受体基因在梅山猪公猪 HPT 轴的表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):23-26.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.006

FSH 和 LH 及其受体基因在梅山猪公猪 HPT 轴的表达

产舒恒,陈子璇,张戌园,陈青,王宵燕

(扬州大学动物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:为了研究卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)及其受体在梅山猪公猪各组织中的表达特征以及在下丘脑-腺垂体-性腺轴(HPT轴)中的表达规律,采用荧光定量PCR(RT-PCR)方法对6头150日龄梅山猪公猪的生殖组织、脑组织及内脏组织中 *FSH β* 、*FSHR*、*LH β* 和 *LHR* 基因的表达情况进行分析。结果显示,*FSH β* 基因在梅山猪公猪的下丘脑和垂体中表达;*FSHR* 基因在梅山猪公猪的睾丸、附体、附尾和尿道球腺中表达;*LH β* 基因在梅山猪公猪的睾丸、附头、附体、垂体、大脑、小脑和海马中表达;*LHR* 基因在梅山猪公猪的睾丸和下丘脑中表达。采用荧光定量方法对各日龄(2、30、60、90及150日龄)梅山猪公猪下丘脑、垂体和睾丸中 FSH 和 LH 及其受体的表达进行研究。结果表明,*FSH β* 在下丘脑和垂体中的表达量随日龄的增加而增加;*FSHR* 在睾丸中的表达量在2、30、60日龄段中较稳定,90日龄时表达量开始降低,150日龄的表达量达到最低值;*LH β* 在垂体中的表达、*LHR* 在下丘脑中的表达和 *LHR* 在睾丸组织中的表达趋势都呈现起伏状态,30日龄时出现表达高峰,60日龄时表达量降低,90日龄时又达到表达高峰,以后降低;*LH β* 在睾丸中的表达量在2、30、60日龄段无显著差异($P < 0.05$),90日龄时达到表达最高峰,150日龄时表达量有所降低。

关键词:梅山猪公猪;FSH;LH;半定量;荧光定量

中图分类号: S828.8⁺12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0023-04

动物体内的促性腺激素包括垂体前叶分泌的卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)、胎盘分泌的孕马血清促性腺激素和绒毛膜促性腺激素以及垂体前叶和胎盘分泌的促乳素。其中,FSH、LH及其相关基因是动物生长发育过程中重要的生理功能基因。在雄性动物中,FSH促进睾丸足细胞合成和分泌雄激素,刺激生精上皮的发育和精子发生(在次级精母细胞及其以前的阶段,FSH起重要作用,此后由睾酮起主要作用)。LH刺激睾丸间质细胞合成和分泌睾酮,促进副性腺的发育和精子最后成熟^[1]。

FSH是一种糖蛋白激素,分子是由非共价键结合的 α 和 β 2个亚单位组成的异质二聚体。在同一物种中, α 亚基是一致的,而 β 亚基是特异性的^[2]。一般认为 α 亚基负责信号的转化作用, β 亚基是功能亚基^[3],参与受体的结合。现在认为, α 、 β 亚基均参加受体的结合与信号的转导作用。LH也是一种糖蛋白激素,它的分子结构与FSH的分子结构相似,由 α 和 β 2个亚单位组成, α 亚基为促性腺激素所共有, β 亚基具有激素和种间特异性,是激素的特异性亚基单位,能与靶器官受体结合。目前,对FSH- β 亚基和LH- β 亚基的研究较多,如赵要风等对猪FSH- β 亚基基因的研究表明,*FSH β* 基因在几个猪品种之间存在多态性,而且是作为一种促进卵泡发育和成熟的糖蛋白激素,高排卵数猪品种二花脸、梅山猪与

其他低排卵数品种表现出对应的差异^[3]。对于FSH和LH的作用,传统观点认为FSH、LH只对性腺有作用,但是近年来的研究发现,在性腺外的组织上也存在这2种激素受体,王亚男对京海黄鸡*FSH β* 和*FSHR*基因的表达规律的研究结果显示,*FSHR*基因在脾脏中的表达量仅次于性腺^[4],说明FSH、LH在性腺外组织中也可能起作用,李波等对母猪性腺外FSH受体和LH受体表达的研究也证明了这一点^[5]。关于FSH和LH在动物体中的发育性表达研究进展迅速,倪迎冬等研究了出雏至性成熟绍鸭卵巢*FSHR*和*LHR*表达的变化,结果显示卵巢*FSHR* mRNA水平呈先升后降趋势,*LHR* mRNA水平的变化,总体呈逐渐升高趋势^[6]。郝建明等论证了垂体前叶存在着LH、FSH、LH-FSH等3种促性腺激素细胞,为进一步探讨FSH、LH分泌及基因表达与调控,揭示生殖生理规律提供了新的资料和思路^[7]。近年来,基因工程重组FSH和LH的研究逐步发展,使人们可根据一些特殊需求改造天然FSH和LH的结构和功能,使之具有更高的活性、更稳定的结构,以满足畜牧生产和医学应用的需要。同时,也为其他糖蛋白激素基因工程制剂的研制生产提供借鉴^[8]。

本试验采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)方法和荧光定量(PCR)方法分析FSH和LH在梅山猪公猪脑组织、生殖组织和内脏组织中的表达特征及表达规律,确定FSH和LH在不同发育阶段中的表达量以及它们在细胞中的定位,这将有助于更好地了解它们在精子发生过程中的作用和对睾丸功能的调节。

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验动物梅山猪由江苏省苏太猪育种中心提供。取6头150日龄的梅山猪公猪睾丸、附睾头、附睾体、附睾尾、精囊

收稿日期:2016-08-19

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK20150440);扬州大学大学生科技创新基金(编号:x20160696、2015695)。

作者简介:产舒恒(1994—),男,安徽潜山人,硕士,主要从事动物遗传工程研究。E-mail:15380345581@163.com。

通信作者:王宵燕,博士,副教授,主要从事猪的遗传育种与繁殖方面的研究。E-mail:wxyan@yzu.edu.cn。

腺、前列腺、尿道球腺、大脑、小脑、下丘脑、垂体、海马、心、肝、脾、肺、胃及肌肉等组织用于表达谱分析。将 2 ($n=6$)、30 ($n=6$)、60 ($n=5$)、90 ($n=5$) 和 150 日龄 ($n=6$) 的梅山猪在屠宰后取下丘脑、垂体、右侧睾丸用于基因的发育性表达研究。

1.2 试剂与仪器

试剂:液氮、TRIzol[宝生物工程(大连)有限公司]、三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇、DEPC 水 (Fermentas)、超纯水、Oligo (dT)₁₈ (Fermentas)、5 × 反应缓冲液 (Fermentas)、Ribonuclease Inhibitor (Fermentas, 20 U/ μ L)、dNTP (Fermentas 10 mmol/L)、M - MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, 200 U/ μ L)、10 × buffer[宝生物工程(大连)有限公司]、4 × dNTP[宝生物工程(大连)有限公司, 2.5 mmol/L]、*Taq* 酶[宝生物工程(大连)有限公司, 5 U/ μ L]、引物(上海英维捷基生物工程有限公司)、琼脂糖 (MBI Fermentas)、5 × TAE 水、Marker (TaKaRa 公司)、荧光定量试剂盒。

试验器材:研钵、研磨棒、匀浆器、4 ℃ 离心机、指形管、紫

外分光光度仪、PCR 管、水浴锅、普通离心机、超净工作台、PCR 仪、烘箱、电泳仪和紫外成像仪、荧光定量 PCR 仪。

1.3 组织样品 RNA 的提取与反转录

1.3.1 样品 RNA 的提取与浓度测定 采用酚 - 三氯甲烷 - 异戊醇的方法提取组织 RNA。提取的 RNA 用一定量的 DNAase (RNAase free) 消化,测 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$,采用电泳法检测 RNA 纯度。严格定量后,取 5 μ g 组织总 RNA 利用反转录酶进行反转录合成 cDNA。

1.3.2 反转录与半定量检测目的基因的表达 取 RNA 样品 5 μ g,按照试剂盒的要求进行反转录,引物序列等信息见表 1。目标基因 PCR 体系 (25 μ L):超纯水 17.3 μ L; 10 × buffer 2.5 μ L; 4 × dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L; *rTaq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L;上游引物 (F 端) 1 μ L;下游引物 (R 端) 1 μ L;模板 DNA 1 μ L。目标基因 PCR 程序:预变性 94 ℃ 4 min;真变性 94 ℃ 30 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存,循环数为 35 次。琼脂糖电泳检测并拍照分析。

表 1 检测目标基因表达情况所用引物序列等信息

基因	引物序列(5'→3')	PCR 产物长度 (bp)	循环数 (个)	退火温度 (℃)	引物序列的 GenBank 登录号
<i>FSHβ</i>	F:GCTGCAATAGCTGTGAGCTG;R:AGTCTGCATGGTGAGCACAG	218	35	60	NM_213875.1
<i>FSHR</i>	F:ATGTCCTTGCTCCTGGTGTC;R:GGTCCCCAAATCCAGAAAAT	213	35	60	NM_214386.1
<i>LHR</i>	F:GAAAGCACAGCAAGGAGACC;R:ACATGAGGAAACGAGGCACT	282	35	60	NM_214449.1
<i>LHβ</i>	F:CATCACCTTTACCACCAGCA;R:AAGAGGAGGCCTGGGAGTAG	281	35	60	NM_214080.1
<i>β-actin</i>	F:GCTGTATTCCCTCCATCCT;R:ACGGTTGGCCTTAGGGTTCA	248	35	55	AY550069

1.4 荧光定量

以 2、30、60、90 及 150 日龄梅山猪下丘脑、垂体和睾丸为模板研究 FSH 和 LH 发育性表达变化。20 μ L 反应体系: Mixture 10 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,DNA 样品 50 ng,加水至 20 μ L。样品在 96 孔板混匀后放入 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行反应,每个样本设 3 个重复。反应程序参照 SYBR Premix Ex *Taq*TM (TaKaRa) 说明书。

定量 PCR 的数据采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 分析。 C_t 值由 ABI7500 的软件自动分析。以 β -actin 为内参,150 日龄组作对照, $\Delta\Delta C_t = (C_{\text{目的基因}} - C_{\text{T管家基因}})_{1,30,60,90\text{ 日龄组}} - (C_{\text{目的基因}} - C_{\text{T管家基因}})_{150\text{ 日龄组}}$ 。2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示 2、30、60、90 日龄组目的基因的表达量相对于 150 日龄的变化倍数。

1.5 数据统计

应用 SPSS 13.0 统计软件中的单因素方差分析对 FSH、LH 及其受体在不同日龄的公猪 HPT 轴相关组织中的表达进行差异比较。

2 结果与分析

2.1 FSH 和 LH 及其受体在公猪脑组织、生殖组织和内脏组织中的表达特征

2.1.1 FSH 及其受体在公猪脑组织、生殖组织和内脏组织中的表达特征 由图 1 可见,*FSH β* 基因只在梅山猪公猪的下丘脑和垂体中表达,在垂体中表达丰度较高,在下丘脑中较低;*FSHR* 基因在梅山猪公猪的睾丸、在附体、附尾和尿道球腺中表达,在睾丸中表达丰度较低,在附体、附尾和尿道球腺中的表达丰度基本一致。

2.1.2 LH 及其受体在公猪脑组织、生殖组织和内脏组织中的表达特征 *LH β* 基因在梅山猪公猪的睾丸、附头、附体、垂体、大脑、小脑和海马中表达,在小脑中的表达丰度较低;*LHR* 基因在梅山猪公猪的睾丸和下丘脑中表达,表达丰度基本相同(图 2)。

2.2 FSH 和 LH 及其受体在不同日龄的公猪 HPT 轴相关组织中的表达

2.2.1 FSH 及其受体在下丘脑、垂体和睾丸中的相对表达量

由表 2 可知,FSH β 在下丘脑和垂体中的相对表达量在一定范围内随日龄的增加而增加,90 日龄表达量开始上升,150 日龄达到表达高峰,FSH β 在下丘脑中的表达量在前 4 个日龄段中无显著差异,150 日龄的表达量与前 4 个日龄段存在显著差异($P<0.05$),FSH β 在垂体中的表达量在 90 日龄时显著高于前 3 个日龄段,而 150 日龄的表达量与前 4 个日龄段有显著差异($P<0.05$);FSHR 在睾丸中的相对表达量在前 3 个日龄段中较稳定,90 日龄时表达量开始降低,150 日龄达到最低值,90 日龄、150 日龄与前 3 个日龄段相比存在显著差异($P<0.05$)。

2.2.2 LH 及其受体在下丘脑、垂体和睾丸中的相对表达量

由表 3 可知,LH β 在垂体中的表达、LHR 在下丘脑中的表达和 LHR 在睾丸组织中的表达趋势相同,呈现波动起伏状态,30 日龄出现表达高峰,60 日龄表达量降低,90 日龄时再次达到表达高峰后又降低,并且 30、90 日龄的表达量与其余 3 个日龄段的表达量多数呈现显著差异($P<0.05$);LH β 在睾丸中的表达量在前 3 个日龄段无显著差异($P<0.05$),90 日龄时达到表达量最高峰,其表达量与其他 4 个日龄段呈现

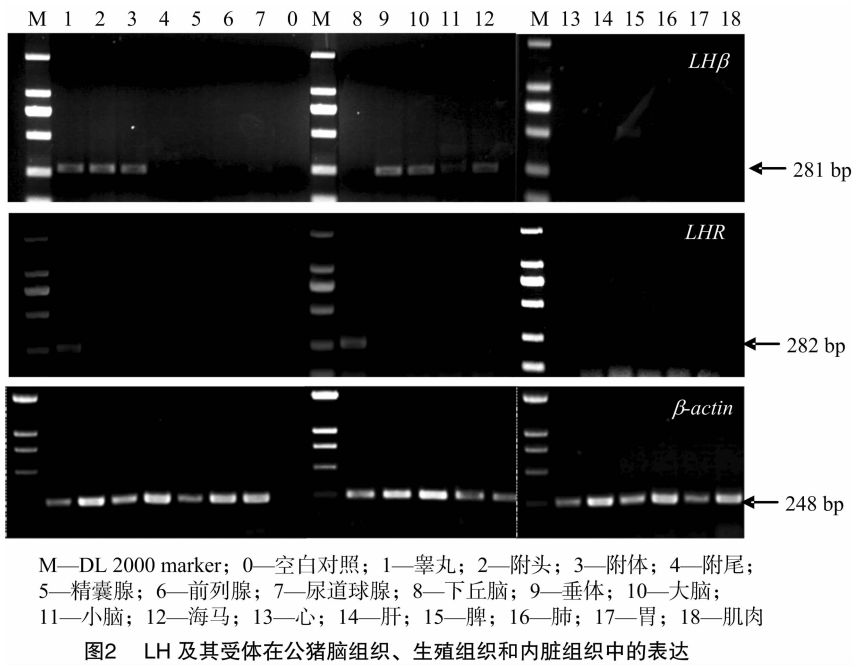
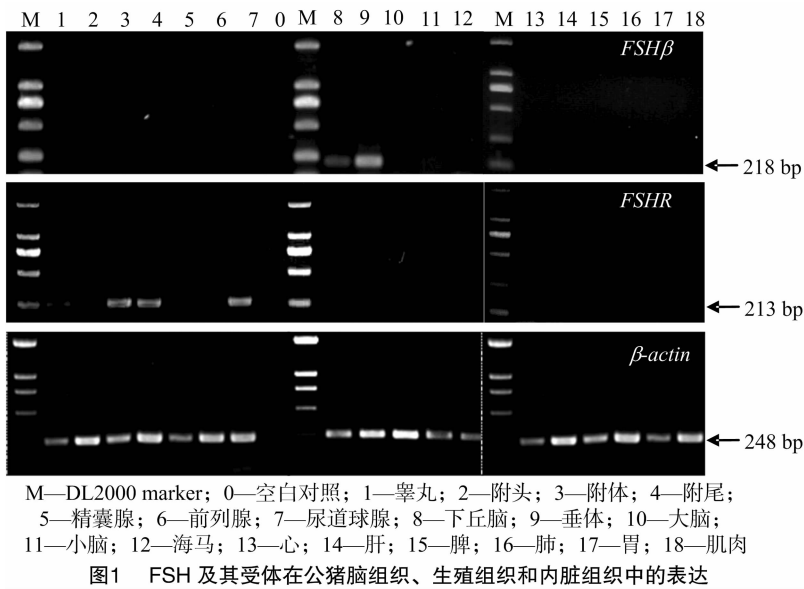


表 2 FSHβ 及其受体在下丘脑、垂体和睾丸中的相对表达量

基因组织	2 日龄	30 日龄	60 日龄	90 日龄	150 日龄
FSHβ 下丘脑	0.02 ± 0.01a	0.07 ± 0.01a	0.02 ± 0.01a	0.04 ± 0.01a	1.01 ± 0.22b
FSHβ 垂体	0.16 ± 0.02a	0.11 ± 0.03a	0.10 ± 0.01a	0.58 ± 0.11b	1.01 ± 0.52c
FSHR 睾丸	1.53 ± 0.99a	1.74 ± 0.72a	1.83 ± 0.88a	1.17 ± 0.58b	1.03 ± 0.29b

注:同一行含不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

表 3 LH 及其受体在垂体、下丘脑和睾丸中的相对表达量

基因组织	2 日龄	30 日龄	60 日龄	90 日龄	150 日龄
LHβ 垂体	0.16 ± 0.05a	1.30 ± 0.26b	0.11 ± 0.02a	2.53 ± 0.61c	1.00 ± 0.09b
LHR 下丘脑	0.18 ± 0.11a	0.98 ± 0.73b	0.09 ± 0.06a	1.14 ± 0.45b	1.06 ± 0.38b
LHβ 睾丸	0.04 ± 0.02a	0.25 ± 0.11a	0.51 ± 0.16a	1.96 ± 0.82c	1.13 ± 0.71b
LHR 睾丸	0.36 ± 0.24a	11.00 ± 0.97c	1.77 ± 0.16a	4.83 ± 0.33b	1.00 ± 0.04a

显著差异 ($P < 0.05$), 150 日龄时表达量有所降低。

3 讨论

3.1 FSH 和 LH 在公猪各个组织中的表达特征

一直以来,人们普遍认为 FSHR、LHR 仅存在于特异的性腺的靶器官和组织中,近年来研究发现,FSHR、LHR 可存在于性腺外组织^[9]。本试验结果显示,FSH β 、LH β 和 LHR 在脑组织中有表达,说明 FSH 和 LH 及其受体并不是特异性地表达在性腺组织中,根据本试验结果,笔者推测脑组织参与和调控性激素的合成和代谢过程,FSH、LH 也可能对脑组织的某些功能起调节作用。此外,FSH β 在下丘脑和垂体中均有表达,但在垂体中的表达量高于下丘脑中的,可能因为 FSH β 在垂体中的调节作用大于在下丘脑中的调节作用。精子细胞是在睾丸中生成,在附睾中发育成熟的^[10]。FSHR 在睾丸和附睾中均有表达,但在睾丸中的表达量比较低,说明 FSH 结合 FSHR 可能在精子发生和成熟方面都有调控作用,但其对精子发育具有主要调控作用;LH β 在睾丸和附睾中的表达量基本相同,则其可能在精子发生和发育过程中都发挥重要作用;LHR 只在睾丸中表达,那么它可能对精子发生过程起重要的调控作用。有研究表明,FSH 对雄性动物可刺激精子的发生,它能刺激曲细精管上皮和次级精母细胞的发育,在 LH 和雄激素的协同下使精子发育成熟。但是如果只增加 FSH 的量,虽能使睾丸增大、曲细精管上皮细胞分裂活动增加、精子细胞增多,但并无成熟精子形成^[11]。这一研究结果为本试验的推测提供了重要依据。

3.2 FSH 和 LH 在各日龄的下丘脑、垂体和睾丸中的表达规律

陈雪雁等研究 FSH 和 LH 在不同发育阶段(4、6、9 周)大鼠睾丸中的表达,结果显示在 mRNA 水平,在不同发育阶段中 FSH 的表达无明显差别,而 LH 只在 6 周和 9 周的大鼠中有表达^[12]。位兰等研究黄体生成素在不同日龄(1、30、90 日龄)雏鸵鸟睾丸内的分布发现,1 d 鸵鸟睾丸内有分布,但在 30 d 睾丸内未检测到;LH 在 90 d 鸵鸟睾丸内有分布,但其阳性表达较弱^[13]。Grzegorzewska 等在鸡胚发育的第 11 天和第 17 天的 FSH 和 LH 表达研究中发现,在不同性别中 FSH 和 LH 的表达具有明显差异^[14]。上述几项研究只选取了 2 个或 3 个发育阶段,而本试验选取了梅山猪生长过程的 5 个日龄段(2、30、60、90、150 日龄)。从试验结果来看,FSH β 在下丘脑和垂体中的表达量总体呈现上升的趋势,90 日龄的表达量迅速升高,150 日龄最高;LH β 在垂体中的表达、LHR 在下丘脑中的表达和 LHR 在睾丸组织中的表达趋势相同,呈现波动起伏状态,30 日龄出现第 1 次表达高峰,90 日龄时又达到第 2 次表达高峰,出现这种情况的原因可能与梅山猪公猪在 30 日龄开始精子发生过程和 60~90 日龄间到达初情期密切相关;FSHR 在睾丸中的表达量与 LH β 在睾丸中的表达量都呈现先升高后降低的趋势,不同的是在 FSHR 在 30 日龄时表达量最高,LH β 在 90 日龄时表达量最高,而 30 日龄是精原干细胞启动精子发生的时期,60~90 日龄是公猪的初情期启动阶段,这一试验结果证实公猪体内促性腺激素对精子发生和初

情期的启动具有调控作用。

4 结论

4.1 FSH 和 LH 在公猪各个组织中的表达特征

FSH β 基因在梅山猪公猪的下丘脑和垂体中表达,FSHR 基因在梅山猪公猪的睾丸、附体、附尾和尿道球腺中表达,LH β 基因在梅山猪公猪的睾丸、附头、附体、垂体、大脑、小脑和海马中表达,LHR 基因在梅山猪公猪的睾丸和下丘脑中表达。

4.2 FSH 和 LH 在各日龄的下丘脑、垂体和睾丸中的表达规律

FSH β 在下丘脑和垂体中的表达总体呈现上升的趋势,LH β 在垂体中的表达、LHR 在下丘脑中的表达和 LHR 在睾丸组织中的表达趋势相同,呈现波动起伏状态,30 日龄出现第 1 次表达高峰,90 日龄时又达到第 2 次表达高峰,FSHR 在睾丸中的表达与 LH β 在睾丸中的表达都呈现先升高后降低的趋势。

参考文献:

- [1] 朱士恩. 家畜繁殖学[M]. 北京:中国农业出版社,2009:39-42.
- [2] 荷德明,李文鑫. 人绒毛膜促性腺激素 α 、 β 亚基 cDNA 的筛选与序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1999(6):899-902.
- [3] 赵要风,李 宁,陈永福. 猪 FSH β 亚基基因 RFLPs 研究初报[J]. 畜牧兽医学报,1998,29(1):23-26.
- [4] 王亚男. 京海黄鸡 FSH β 和 FSHR 基因的遗传效应及其表达规律研究[D]. 扬州:扬州大学,2015.
- [5] 李 波,梁鸿雁,周 虚,等. 性腺外 FSH 受体和 LH 受体表达研究进展[J]. 中国兽医学报,2009,29(6):816-820.
- [6] 倪迎冬,赵茹茜,王亚菊,等. 出雏至性成熟绍鸭卵巢 FSH-R 与 LH-R mRNA 表达的变化[J]. 南京农业大学学报,2004,27(2):64-67.
- [7] 郝建明,刘 平,张 平,等. 黄体生成素和卵泡刺激素在大鼠垂体前叶的细胞共定位研究[J]. 解剖学报,1997,28(1):53-58.
- [8] 葛红山,丁家桐,周银松,等. 基因工程重组 FSH 的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2002,34(6):38-41.
- [9] 张 哲,郑清莲. 卵泡刺激素受体及黄体生成素受体在大鼠肾脏组织中的表达[J]. 中医杂志,2009(增刊1):240-241.
- [10] 周红明,张 彤,刘以训. 促黄体生成素受体(LHR)在大鼠附睾中的表达[J]. 科学通报,1996,41(17):1608-1610.
- [11] 任春明,字向东,张重庆,等. 卵泡刺激素(FSH)的研究进展[J]. 畜禽业,2006(20):10-13.
- [12] 陈雪雁,李劲松,陈克铨,等. FSH 和 LH 在不同发育阶段大鼠睾丸中的表达[J]. 解剖科学进展,1997(3):70-70.
- [13] 位 兰,彭克美,罗来强. 黄体生成素和褪黑素受体在不同日龄雏鸵鸟睾丸内的分布研究[J]. 经济动物学报,2011,15(1):25-28.
- [14] Grzegorzewska A K, Sechman A, Paczoska - Eliasiewicz H E, et al. The expression of pituitary FSH β and LH β mRNA and gonadal FSH and LH receptor mRNA in the chicken embryo[J]. Reproductive Biology, 2009,9(3):253-269.