

· 短篇论著 ·

离体培养的大鼠卵巢颗粒细胞和黄体细胞中松弛素样因子 mRNA 的表达及调节

Expression and regulation of relaxin-like factor mRNA in rat ovarian granulosa cells and lutein cells *in vitro*

张承玉¹, 赵薇², 程丹玲², 朱辉^{2*}, 金秀东¹

(1. 牡丹江医学院生理学教研室, 牡丹江 157011; 2. 哈尔滨医科大学生理学教研室, 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的: 观察松弛素样因子(relaxin-like factor, RLF)mRNA 在离体培养的大鼠卵巢颗粒细胞和黄体细胞中的表达, 初步探讨影响其表达调控的可能机制。方法: 离体培养来自健康 Wistar 大鼠卵巢的颗粒细胞和黄体细胞, 分别加入血小板活化因子(PAF)、促性腺激素(FSH 或 hCG)、腺苷酸环化酶激动剂(Forskolin)、蛋白激酶 C(PKC)激动剂佛波酯(PMA), 以培养液作为对照。采用 RT-PCR 方法观察各组 RLF mRNA 的表达, 每组设 5 个复孔。结果: 离体培养的大鼠卵巢颗粒细胞和黄体细胞均有 RLF mRNA 的表达, 颗粒细胞中加入 PAF、FSH、Forskolin、PMA 组 RLF mRNA 的表达均较对照组增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 黄体细胞中加入 PAF、Forskolin、PMA 组 RLF mRNA 的表达均较对照组增强($P < 0.05$), 但加入 hCG 组无明显变化。结论: 大鼠卵巢颗粒细胞和黄体细胞 RLF mRNA 的表达受 PAF 的正性调节, 蛋白激酶 A(PKA)和 PKC 信号通路的激活可能促进 RLF mRNA 的表达。

[关键词] 松弛素样因子; 颗粒细胞; 黄体细胞; 卵巢

[中图分类号] R 339.22 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0111-03

松弛素样因子(relaxin-like factor, RLF)是 1993 年在猪的睾丸克隆工程中发现的^[1], 是 insulin-like factor-3(INSL3)基因的产物^[2], 属于胰岛素-胰岛素样生长因子-松弛素(insulin-IGF-relaxin)家族。人类该基因定位在 19 号染色体 p13.2-12。雄性哺乳动物 RLF 主要由睾丸 Leydig 细胞产生, 雌性主要由卵巢的卵泡膜细胞和黄体细胞产生。目前对 RLF 的研究主要集中在反刍动物, 对啮齿动物研究较少, 国内还没有 RLF 的实验性报道。本实验观察了 RLF mRNA 在大鼠离体培养卵巢颗粒细胞和黄体细胞中的表达, 探讨影响其表达的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 25 d 龄健康雌性 Wistar 大鼠(60~70 g), 由哈尔滨医科大学第二临床医学院实验动物中心提供, 自然光照, 水食任取。

1.2 主要试剂 培养基干粉 DMEM/F12、小牛血清均为 Hyclone 公司产品, 胶原酶 II、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、腺苷酸环化酶激动剂(Forskolin)、蛋白激酶 C 激动剂佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)均为 Sigma 公司产品, 孕马血清(PMSG)为天津实验动物中心产品, 注射用人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)为宁波市激素制品厂产品, TRIzol RNA 提取试剂为 Gibco BRL 产品, TaKaRa 逆转录试剂盒由大连宝生物工程技术有限公司提供, 引物由上海捷信思公司提供。

1.3 颗粒细胞培养 大鼠颈部皮下注射 PMSG 50 IU/只, 促进卵泡发育, 48 h 后断髓处死, 取出卵巢, 用小号针头刺破卵泡, 释放颗粒细胞, 用 PBS 冲洗, 经滤网过滤, 1 100 r/min(r=

8.5 cm)离心 5 min, 弃上清, 向细胞沉淀中加入含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液, 充分混匀, 即得颗粒细胞悬液, 稀释至 5×10^5 /ml, 分装入 6 孔培养板。24 h 后加影响因素, 对照组加培养液, FSH 终浓度 1 μ g/ml, PAF 的终浓度 1 μ g/ml, Forskolin 的终浓度 100 ng/ml, PMA 的终浓度 100 ng/ml, 继续培养 24 h 后, 每孔加 TRIzol RNA 提取试剂 1 ml, 反复吹打底壁, 收集细胞于 -70°C 保存, 用于总 RNA 提取。

1.4 黄体细胞培养 大鼠颈部皮下注射 PMSG 50 IU/只, 促进卵泡发育, 48 h 后颈部皮下注射 hCG 25 IU/只, 促进排卵, 6 d 后断髓处死, 取出卵巢, 去尽包膜, 用小剪刀剪成糊状, 加胶原酶 II 消化 30~50 min, 加入 PBS, 经滤网过滤, 1 100 r/min(r=8.5 cm)离心 5 min, 弃上清, 向细胞沉淀中加入含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液, 充分混匀, 即得黄体细胞悬液, 稀释至 5×10^5 /ml, 分装入 6 孔培养板。24 h 后加影响因素, 将 FSH 改为 hCG 终浓度 1 U/ml, 其余同颗粒细胞。

1.5 RT-PCR

1.5.1 RNA 的提取 应用 Gibco BRL 公司 TRIzol RNA 提取试剂, 分别提取培养的颗粒细胞和黄体细胞的总 RNA。通过紫外分光光度仪测定提取的 RNA 样品在波长 260 nm 和 280 nm 处的光密度(D), 使二者的比值保持在 1.80~1.985 之间, 符合蛋白污染容许容量(1.8~2.0), 根据 D_{280} 值计算出总 RNA 浓度。

[基金项目] 黑龙江省博士后启动基金(2003). Supported by Startup Fund for Postdoctoral Students of Heilongjiang Province(2003).

[作者简介] 张承玉, 硕士, 讲师. E-mail: zcy6668815@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: dzhuhui@yahoo.com.cn

1.5.2 逆转录 用 TaKaRa 的逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系:总反应体系为 20 μ l,其中含 2 \times RCR buffer 10 μ l;dNTPs(10 mmol/L) 4 μ l;Oligo dT primer 1.0 μ l ;Bast Reserve Transcriptase 1.0 μ l;Rnase Inhibitor 0.5 μ l;RNase Free Water 0.5 μ l;样品 RNA 2.0 μ g。反应条件:65 $^{\circ}$ C 1 min;30 $^{\circ}$ C 5 min;经 25 min 匀速升温至 65 $^{\circ}$ C,15 min;98 $^{\circ}$ C 5 min;5 $^{\circ}$ C 5 min。用 GAPDH 做内参照。RLF 上游引物为 5'-CAA CGA CAT CTC CTG CAC-3';下游引物为 5'-TTG ACA CAC ACC ACC TGA G-3',扩增片段为 239 bp。GAPDH 上游引物为 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3';下游引物为 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',扩增片段为 443 bp。引物均跨越内含子。

1.5.3 PCR 反应 总反应体系均为 20 μ l;其中含 10 \times PCR buffer 2.0 μ l;dNTP 1.6 μ l;primer 均为 0.5 μ l;Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l;逆转录所得的 cDNA 1.5 μ l;RNase Free water 13.7 μ l。RLF:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59.5 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。GAPDH:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59.5 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s;26 个循环。

1.5.4 结果分析 PCR 扩增用含溴化乙啶(EB)的 1.5%琼脂糖凝胶(1 \times TAE)电泳检测。用凝胶自动分析成像系统观察结果。利用 BIO-RAD 凝胶分析系统分析 RT-PCR 凝胶电泳图各条带的 DNA 含量。紫外观测仪下摄影,凝胶图像分析系统扫描各电泳带的灰度值,计算 RLF 与 GAPDH 灰度值的比值,即为培养的颗粒细胞和黄体细胞的 RLF mRNA 的表达水平。

1.6 统计学处理 实验重复 3 次,每组重复 6 个复孔。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件做单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠卵巢颗粒细胞中 RLF mRNA 的表达 如图 1 所示,离体培养的颗粒细胞有 RLF mRNA 表达,RLF mRNA 的表达强度在 FSH、PAF、Forscolin、PMA 刺激下较对照组增强,均有统计学意义(PAF 组和 PMA 组 $P < 0.05$;FSH 组和 Forscolin 组 $P < 0.01$)。

2.2 大鼠卵巢黄体细胞中 RLF mRNA 的表达 如图 2 所示,离体培养的黄体细胞有 RLF mRNA 表达,统计分析表明,RLF mRNA 的表达强度在 PAF、Forscolin、PMA 刺激下较对照组增强,均有统计学意义($P < 0.05$);hCG 组无明显变化。

3 讨论

卵巢是个复杂的内分泌器官,卵泡的发育、成熟、排卵,黄体的形成、退化和雌孕激素的周期性分泌,不仅受下丘脑-垂体-卵巢轴的调节,也和卵巢内一些局部调控因子的调节有关。RLF 是新近发现的主要由性腺产生的调控因子,其在哺乳动物生殖中的作用越来越受到关注。

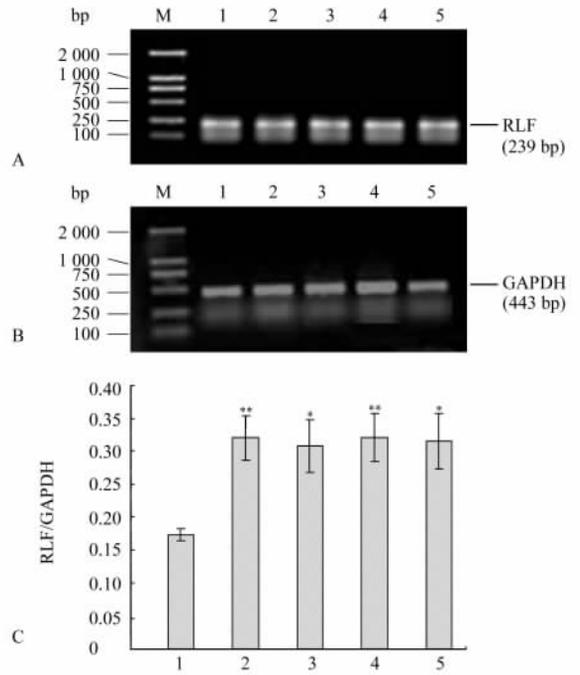


图 1 用 RT-PCR 方法检测 RLF mRNA 在大鼠离体培养卵巢颗粒细胞中的表达

A: RLF 电泳图; B: GAPDH 电泳图; C: 相对表达量。M: Marker DL2000;1:对照组;2:FSH 组;3:PAF 组;4:Forscolin 组;5:PMA 组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较; $n=6, \bar{x} \pm s$

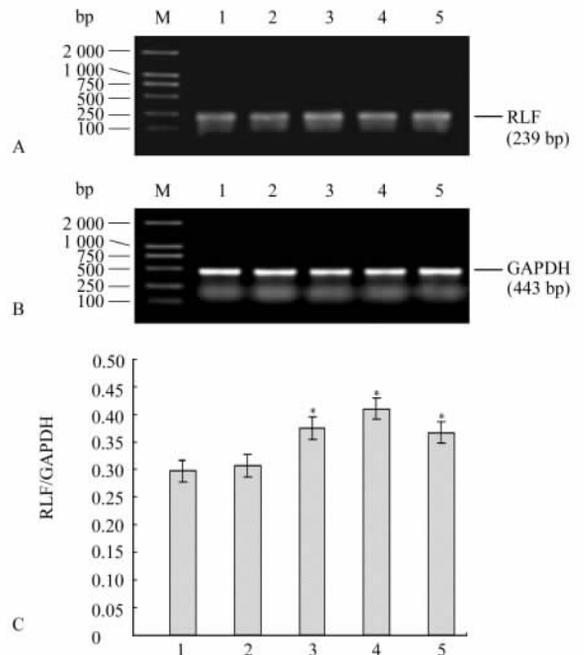


图 2 用 RT-PCR 方法检测 RLF mRNA 在大鼠离体培养卵巢黄体细胞中的表达

A: RLF 电泳图; B: GAPDH 电泳图; C: 相对表达量。M: Marker DL2000;1:对照组;2:hCG 组;3:PAF 组;4:Forscolin 组;5:PMA 组。* $P < 0.05$ 与对照组比较; $n=6, \bar{x} \pm s$

在雄性,RLF 主要是由睾丸 Leydig 细胞表达,通过 RT-PCR 技术可以观察到在其他组织也有转录,如前列腺^[3]。在雌性,RLF 显示更广泛的分布,卵巢是 RLF 的主要来源^[4-6],此外,在子宫基质和胎盘^[6]、甲状腺^[7]、乳腺^[8]等部位也观察到 RLF 的表达。已有报道^[9],敲除 RLF 基因将导致小鼠卵泡闭锁及黄体退化加快,动情周期也从正常的 6~7 d 延长为 14~20 d,并且发现其卵泡及黄体凋亡率更高。另有文献报道^[10],敲除该基因的雌性小鼠不孕,主要原因是影响了卵泡的发育和动情周期。有实验显示 RLF 的表达与优势卵泡的选择有关^[11]。上述研究均提示 RLF 与雌性生殖有密切关系。

本实验用 RT-PCR 方法发现 RLF mRNA 不仅表达于大鼠卵巢黄体细胞,也在卵泡颗粒细胞中表达。为进一步研究影响 RLF mRNA 在大鼠卵泡颗粒细胞和黄体细胞表达的可能机制,我们选择了促性腺激素(FSH 和 hCG)、PAF 和两条经典的细胞信号转导通路的激活剂,来观察这些因素对大鼠卵泡颗粒细胞和黄体细胞 RLF mRNA 表达的影响,探讨其可能的机制。

FSH 是下丘脑分泌的促性腺激素,初级卵泡发育晚期,颗粒细胞上出现 FSH 受体,到次级卵泡期 FSH 受体进一步增加,颗粒细胞培养液中加入 FSH 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,结果显示 FSH 组 RLF mRNA 的表达增强,提示 FSH 促进卵泡发育可能部分是由于 FSH 促进了 RLF 增多的结果。向黄体细胞培养液中加入 hCG 1 U/ml,结果显示 hCG 组 RLF mRNA 的表达无明显变化,提示已分化成熟的黄体细胞 RLF 的表达是非促性腺激素依赖型的。PAF 与生殖关系密切,参与排卵、受精、着床、胚胎发育、分娩等生殖过程。有实验^[12]显示 PAF 参与排卵和黄体形成,本实验结果证明 PAF 组 RLF mRNA 的表达较对照组增强,说明颗粒细胞和黄体细胞 RLF mRNA 的表达受该细胞因子的正性调节,PAF 参与排卵和黄体形成可能与促进 RLF mRNA 的表达有关。Forskolin 是蛋白激酶 A(PKA)的激动剂,PMA 是 PKC 的激动剂,本实验结果显示此两组 RLF mRNA 的表达均比对照组增强,说明 PKA 和 PKC 通路的激活可能促进 RLF mRNA 的表达。

[参考文献]

[1] Adham I M, Burkhardt E, Banahmed M, et al. Cloning of a

cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells[J]. J Biol Chem,1993,268:26668-26672.

- [2] Burkhardt E, Adham I M, Brosig B, et al. Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (INSL3)[J]. Genomics,1994,20:13-19.
- [3] Klonisch T, Muller-Huesmann H, Riedel M, et al. INSL3 in the benign hyperplastic and neoplastic human prostate gland [J]. Int J Oncol,2005,27:307-315.
- [4] Nichols N, Binta H, Fields P A, et al. Immunohistochemical localization of relaxin-like factor/insulin-like peptide-3 in the bovine corpus luteum[J]. Ann N Y Acad Sci,2005,1041:506-509.
- [5] Hombach-Klonisch S, Seeger S, Tscheudschilsuren G, et al. Cellular localization of human relaxin-like factor in the cyclic endometrium and placenta[J]. Mol Hum Reprod,2001,7:349-356.
- [6] Zarreh-Hoshyari-Khah M R, Einspanier A, Ivell R, et al. Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*)[J]. Biol Reprod,1999,60:445-453.
- [7] Hombach-Klonisch S, Hoang-Vu C, Kehlen A, et al. INSL-3 is expressed in human hyperplastic and neoplastic thyrocytes [J]. Int J Oncol,2003,22:993-1001.
- [8] Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, et al. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland[J]. Cancer,2000,89:2161-2168.
- [9] Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for INSL3 [J]. Nat Genet,1999,22:295-299.
- [10] Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, et al. Targeted disruption of the INSL3 gene causes bilateral cryptorchidism[J]. Mol Endocrinol,1999,13:681-691.
- [11] Irving-Rodgers H F, Bathgate R A D, Ivell R, et al. Dynamic changes in the expression of relaxin-like factor (INSL3), cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450, and β -hydroxysteroid dehydrogenase in bovine ovarian follicles during growth and atresia[J]. Biol Reprod, 2002,66:934-943.
- [12] Tsafiri A, Reich R. Molecular aspects of mammalian ovulation [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes,1999,107:1-11.

[收稿日期] 2006-05-27

[修回日期] 2006-10-10

[本文编辑] 孙岩