

山羊有腔卵泡中 $TGF\beta_2$ 基因表达*

王保莉, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用 RT-PCR 技术对关中奶山羊不同大小的有腔卵泡的卵泡膜细胞、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体中转化生长因子 β ($TGF\beta$) 的基因表达进行了测定。结果表明, 在有腔卵泡的各个时期都有 $TGF\beta$ 基因表达; 在卵泡膜、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体中也检测到了该生长因子的 mRNA。推测 $TGF\beta$ 对关中奶山羊卵泡发育有一定的调节作用。

[关键词] 山羊; 有腔卵泡; $TGF\beta$; 基因表达

[中图分类号] S821.3⁺6; S827

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-001-04

哺乳动物卵泡发育过程除了受垂体促性腺激素调节外, 还受到生长因子和细胞因子的作用。这些因子, 特别是卵巢内存在的一些多肽生长因子, 可通过对垂体促性腺激素的调节或与卵巢内受体或靶细胞作用, 以自分泌或旁分泌方式参与卵母细胞的成熟分裂、颗粒细胞的增殖与分化、卵泡的募集以及优势卵泡的发育和排卵等过程。因此, 研究卵巢内因子对卵泡发育和卵母细胞成熟的调节作用, 已成为生殖生物学和发育生物学领域的研究热点。

转化生长因子- β ($TGF\beta$) 是一个多功能的生长因子家族, 它们参与调节哺乳动物的各种生理学活动^[1-4], $TGF\beta$ 是其中的一种。为了探讨 $TGF\beta$ 在卵泡发生和发育过程中的作用, 人们已经采用免疫组织化学、原位杂交技术和聚合酶链式反应技术证明在人类、小鼠和大鼠等一些哺乳动物的卵巢卵泡中表达 $TGF\beta$ ^[5-11], 但尚未见到有关山羊卵巢卵泡中 $TGF\beta$ 基因表达的报道。本研究采用 RT-PCR 技术, 对山羊卵巢卵泡 $TGF\beta$ mRNA 基因表达进行了测定, 探讨山羊有腔卵泡发育过程中 $TGF\beta$ 在卵泡中的表达规律, 为今后进一步研究山羊的早期分子发育调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

卵巢采集 山羊卵巢采自西安市屠宰场, 置于 22~28 的生理盐水中, 4 h 内运回实验室。将卵巢用生理盐水或 PBS 冲洗干净, 除去其表面结缔组织和脂肪组织, 生理盐水冲洗 2~3 遍后, 置于无菌吸水纸上吸去表面液体。分离卵泡时, 先将卵巢纵向切

成两半, 用眼科手术剪去除卵巢髓质部分。

卵泡剥离 将卵巢剪成小块, 移入 6~10 mm 的玻璃培养皿, 于解剖镜下用眼科手术器械剥离不同大小的有腔卵泡, 保留完整的卵泡壁, 按照卵泡的直径分别采集小 (< 1 mm, 1~2 mm)、中 (2~4 mm, 4~5 mm)、大 (5~6 mm, > 6 mm) 卵泡。将剥离的卵泡按大小分组, 液氮保存备用。

卵泡膜采集 将直径 3~4 mm 的卵泡, 于体视显微镜下, 用眼科异物针撕裂卵泡, 去除紧贴卵泡内膜的颗粒细胞, 保留卵泡膜。将卵泡膜用 DEPC 处理的水快速清洗 2 次, 离心去上清液, 液氮保存。

颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体的采集 将直径 3~4 mm 的卵泡于生理盐水中撕破, 分别快速采集颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体 (COCs), 离心去除上清液; 向收集的颗粒细胞或卵丘卵母细胞复合体中直接加入 1.0 mL Trizol, 提取 RNA。

1.2 方法

总 RNA 的提取 采用 Trizol 法 (上海 N SBC 和 Sangon) 提取总 RNA。

PCR 引物合成 PCR 引物由上海 Sangon 公司合成。 β Actin 负链引物: 5'-TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3', 正链引物: 5'-CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA-3' (扩增片段 243 bp)。 $TGF\beta$ 负链引物: 5'-TTC GAT CTT GGG CGT ATT TCC AAT-3'; 正链引物: 5'-AGA AAT GTG CAG GAT AAT TGC TGC-3' (扩增片段 273 bp)。

RT-PCR 将 RNA 模板 (含 5 μ g 总 RNA), 经 DEPC 处理的水, O ligo (dT)₁₅ (1 μ L) 混合液 16 μ L, 置于 70 水浴中变性 10 min 后, 立即放入冰浴中

* [收稿日期] 2001-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39830280)

[作者简介] 王保莉 (1960-), 女, 陕西西安人, 副教授, 博士。主要从事生物化学与分子生物学教学和研究。

冷却 5 min, 并在冰浴上加入 dNTP 混合液 2 μL , 5 \times RT 缓冲液 5 μL , RNasin 1 μL (40 $\mu\text{mol}/(\mu\text{L} \cdot \text{min})$) 和 M-MuLV 反转录酶 (Promega) 1 μL (200 $\mu\text{mol}/(\mu\text{L} \cdot \text{min})$), 总体积 25 μL 。混匀后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 立即置 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 以备作 PCR 反应用。取 10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 3 μL , dNTP 1 μL , 正负链引物各 1 μL , 反转录产物 1 μL , DEPC 处理水 22.5 μL , 加 20 μL 矿物油覆盖在液面上, 稍离心后, 置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL 。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。PCR 仪为 Gene AmpR PCR-System 2400 (美国 PE 公司)。

琼脂糖电泳 制备 20 g/L 的琼脂糖凝胶, 同时加入 EB (20 $\mu\text{g/mL}$) 至 1 $\mu\text{g/mL}$; 取 PCR 扩增产物 10 μL 与 6 \times 上样缓冲液, 混匀后, 点样, 电泳。在 GDS8000 凝胶成像分析系统 (英国 UVP) 中分析结果, 贮存电泳图谱。

2 结果与分析

2.1 有腔卵泡中 βActin 和 $\text{TGF}\beta$ 的基因表达

山羊有腔卵泡中 βActin 的基因表达 用 RT-PCR 技术检测了山羊不同发育时期的有腔卵泡中 βActin 的基因表达。反应产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查 (图 1)。不同发育大小的卵泡中都检测到了 βActin 的基因表达; 而且得到的 PCR 产物条带单一, 没有发现有基因组的污染。

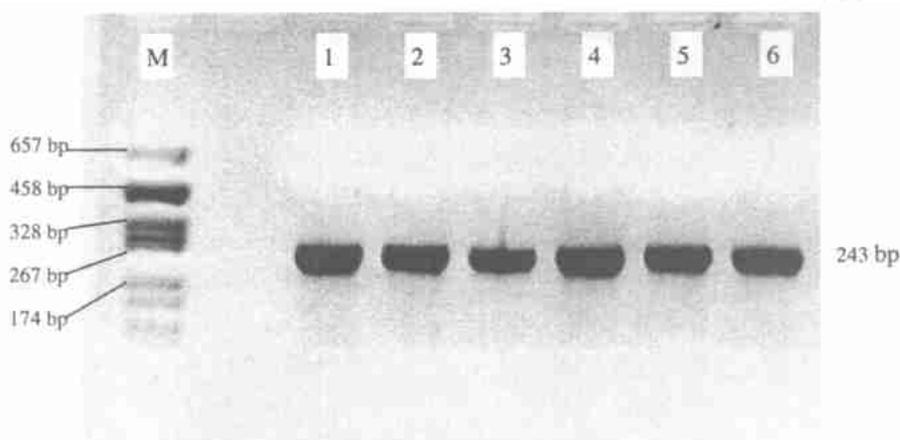


图 1 山羊不同大小有腔卵泡各发育时期的 βActin 扩增结果

1 < 1 mm; 2 1~2 mm; 3 2~4 mm; 4 4~5 mm; 5 5~6 mm; 6 > 6 mm; M. DNA 标样

Fig 1 Detection of βActin transcripts in RNA from goat antral follicles by RT-PCR

1 < 1 mm; 2 1~2 mm; 3 2~4 mm; 4 4~5 mm; 5 5~6 mm; 6 > 6 mm; M. DNA marker

山羊有腔卵泡中 $\text{TGF}\beta$ 的基因表达 将不同发育时期的山羊有腔卵泡中 $\text{TGF}\beta$ RT-PCR 产物

分别取 10 μL 用于琼脂糖电泳, 结果如图 2 所示。不同发育时期的山羊卵泡都表达 $\text{TGF}\beta$ 基因。

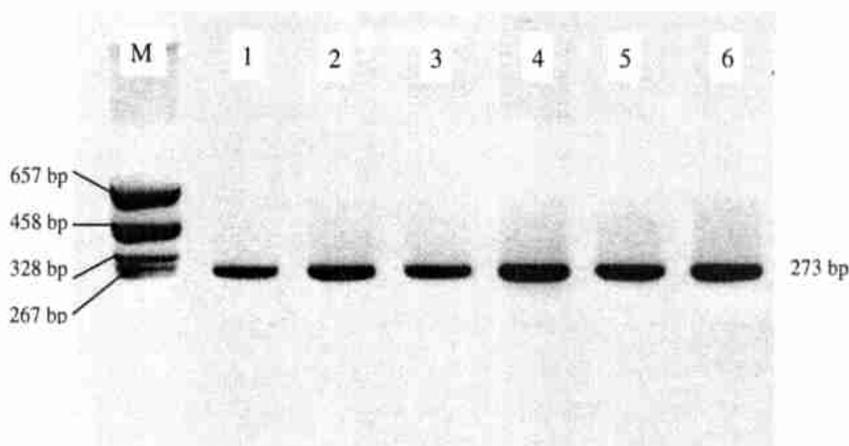


图 2 山羊不同大小有腔卵泡各发育时期的 $\text{TGF}\beta$ PCR 产物

1 < 1 mm; 2 1~2 mm; 3 2~4 mm; 4 4~5 mm; 5 5~6 mm; 6 > 6 mm; M. DNA 标样

Fig 2 Detection of $\text{TGF}\beta$ transcripts in RNA from goat antral follicles by RT-PCR

1 < 1 mm; 2 1~2 mm; 3 2~4 mm; 4 4~5 mm; 5 5~6 mm; 6 > 6 mm; M. DNA marker

2.2 卵泡膜 颗粒细胞和 COCs 中 TGF β 的基因表达

从直径为 3~4 mm 的山羊有腔卵泡中分别采集卵泡膜细胞、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体, 分别提取总 RNA 后, 经 RT-PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测 β Actin 和 TGF β 表达情况。电泳结果分别见

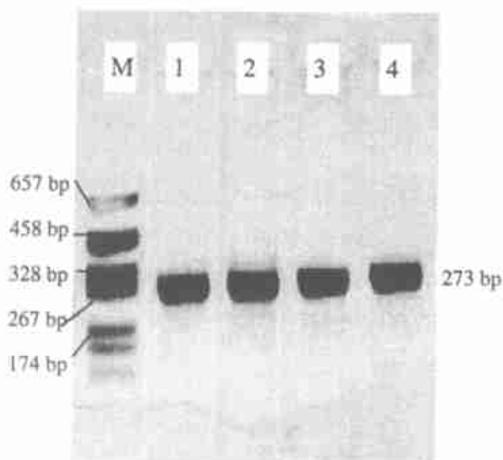


图3 山羊有腔卵泡、卵泡膜、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体中 TGF β PCR 产物

1. 有腔卵泡; 2. 卵泡膜; 3. 颗粒细胞;
4. 卵丘卵母细胞; M. DNA 标样

Fig 3 Detection of TGF β transcripts in RNA from goat follicular cells, theca cells, GCs and COCs by RT-PCR

1. Goat follicular cell; 2. Theca cells;
3. GCs; 4. COCs; M. DNA marker

图3和图4。由图3, 图4可见, 同一发育时期有腔卵泡(3~4 mm 直径)的卵泡膜、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体表达 TGF β 基因。在不同的细胞类型中都检测到了 β Actin 目的片段, 且在 300 bp 以上没有非特异性条带, 表明没有基因组DNA 的污染。

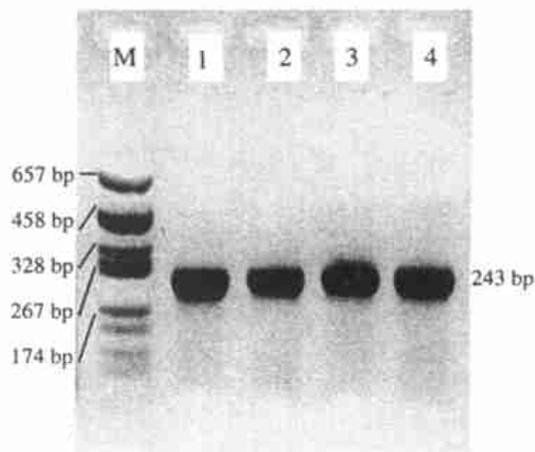


图4 山羊有腔卵泡、卵泡膜、颗粒细胞和卵丘卵母细胞复合体中 β Actin PCR 产物

1. 有腔卵泡; 2. 卵泡膜; 3. 颗粒细胞;
4. 卵丘卵母细胞; M. DNA 标样

Fig 4 Detection of β Actin transcripts in RNA from goat follicular cells, theca cells, GCs and COCs by RT-PCR

1. Goat follicular cell; 2. Theca cells;
3. GCs; 4. COCs; M. DNA marker

3 讨论

反转录-聚合酶链反应是以 mRNA 为模板, 以特异引物为扩增目的基因(cDNA)技术, 可用于检测转录水平上的表达。如果试验过程中污染了基因组DNA, 将影响结果的可靠性。本试验以 β 肌动蛋白(β Actin)作为内控样以检查和防止基因组DNA 的污染。在哺乳动物所有类型的细胞中都表达 β Actin。使用的 β Actin 引物对可扩增的基因片段跨越了啮齿类 β 肌动蛋白第1个内含子(含87碱基), 既可以检测 β 肌动蛋白 mRNA (cDNA) 的表达(为243 bp 的片段), 也可以检查是否有基因组DNA 的污染。如果有污染, 则会产生330 bp 的片段^[12]。从本试验结果可以看出, PCR 产物中没有300 bp 的条带, 表明所提取的总 RNA 中没有DNA 的污染, 确保了试验结果的可靠性。

已经有文献^[5, 9, 11]报道了哺乳动物卵泡中的 TGF β 的分布和表达。尽管采用的技术和方法不同, 但研究结果共同证实了 TGF β 作为卵巢内因子的存在。例如, Ghiglieri 等^[5]指出, 大鼠的卵泡膜/间质细胞和颗粒细胞中表达 TGF β ; May 等人^[9]的研究表明, 猪有腔卵泡发育时, 卵泡膜是 TGF β 的主要分泌源; Mulheron 等^[11]指出, 人颗粒细胞和卵丘细胞表达 TGF β mRNA。

本试验采用 RT-PCR 技术, 初次比较系统地研究了山羊有腔卵泡中 TGF β 在转录水平上的表达, 在不同发育大小的卵泡以及在中等大小的卵泡的 COCs, 颗粒细胞和卵泡膜细胞中都表达 TGF β 基因。这些结果表明, TGF β 可能作为卵巢内因子参与山羊卵泡的发育和成熟的调节过程。但该生长因子是通过怎样的方式调节山羊卵泡发育和成熟过程的, 还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, et al TGF-beta cooperates with TGF-alpha to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism [J]. *EMBO J*, 1999, 18(10): 2764- 2781.
- [2] Harris D L, Joyce N C. Transforming growth factor-beta suppresses proliferation of rabbit corneal endothelial cells in vitro [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(4): 327- 334.
- [3] Kim E S, Kim R S, Ren R F, et al Transforming growth factor-beta inhibits apoptosis induced by beta-amyloid peptide fragment 25- 35 in cultured neuronal cells[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 20, 62(2): 122- 130.
- [4] Roelen B A, Goumans M J, Zwijnen A, et al Identification of two distinct functions for TGF-beta in early mouse development [J]. *Differentiation*, 1998, 64(1): 19- 31.
- [5] Ghiglieri C, Khatchadourian C, Tabone E, et al Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta 2 in the mouse ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation[J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(8): 2115- 2119.
- [6] Levacher C, Gautier C, Saez J M, et al Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta2 in the fetal and neonatal rat ovary[J]. *Differentiation*, 1996, 61(1): 45- 51.
- [7] Teerds K J, Dorrington J H. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta1 and beta2 during follicular development in the adult rat ovary[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 84(1- 2): 7- 13.
- [8] Chegini N, Williams R S. Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74(5): 973- 980.
- [9] May J V, Stephenson L A, Turczynski C J, et al Transforming growth factor beta expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(2): 485- 496.
- [10] Mulherson G W, Bossert N L, Lapp J A, et al Human granulosa-luteal and cumulus cells express transforming growth factors-beta type 1 and type 2 mRNA [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74(2): 458- 460.
- [11] Mulherson G W, Danielpour D, Schomberg D W. Rat theca/interstitial cells express transforming growth factor-beta type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin in vitro[J]. *Endocrinology*, 1991, 129(1): 368- 374.
- [12] Watson A J, Hogan A, Hannel A, et al Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo [J]. *Mol Reprod Develop*, 1992, 31: 87- 95.

The gene expression of TGF β in goat antral follicles

WANG Bao-li, ZHANG Yong

(Institute of Bioengineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The gene expression of transforming growth factor β (TGF β) in goat antral follicles was determined by utilizing reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). In different size of goat ovarian follicles and in theca cells, granular cells (GCs) and cumulus-oocyte complexes (COCs), the expression of mRNA of TGF β can all be measured. These results indicate that TGF β may play an important role in goat ovarian follicle development and oocyte maturation.

Key words: goat; antral follicles; TGF β ; gene expression