

FGF1 对牛卵巢颗粒细胞 *Spry* 基因表达的影响

江中良, 胡建宏, 史怀平, 王立强, 李青旺

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**研究体外培养牛卵巢颗粒细胞中 *Sprouty* 基因(*Spry*)的表达,探讨成纤维细胞生长因子 1 (FGF1)对 *Spry* 基因表达的影响。**【方法】**从屠宰场收集牛卵巢,剪下直径 2~5 mm 的卵泡,机械破碎卵泡后收集颗粒细胞进行体外培养,在培养的第 5 天用 FGF1 和 PD98059 处理培养的颗粒细胞,然后用 Trizol 提取细胞总 RNA,利用牛特异性引物进行实时定量 PCR 检测,用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算 *Spry* 基因的相对表达量。**【结果】**牛卵巢颗粒细胞可以表达 *Spry* 基因;*Spry* 基因的表达与 FGF1 呈现剂量依赖关系,*Spry2* 和 *Spry4* 的表达量随 FGF1 作用时间的延长呈现出先上升后下降的变化趋势;FGF1 信号通过 RTK/ERK 通道对 *Spry* 基因的表达产生刺激作用。**【结论】**在体外培养的牛卵巢颗粒细胞中,FGF1 信号通过 RTK/ERK 通道刺激牛 *Spry* 基因表达。

[关键词] FGF1;牛;卵巢颗粒细胞;信号通道;*Sprouty* 基因(*Spry*)

[中图分类号] S823.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0023-05

FGF1 induced *Sprouty* genes expression by RTK/ERK pathway in bovine ovarian granulosa cells

JIANG Zhong-liang, HU Jian-hong, SHI Huai-ping,

WANG Li-qiang, LI Qing-wang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The aim of the present experiments was to study the expression of *Sprouty* (*Spry*) genes in bovine ovarian granulosa cells, and the effects of fibroblast growth factor-1 (FGF1) signaling on *Spry* genes expression. **【Method】**Bovine ovaries were collected from a local abattoir, and follicles diameter between 2—5 mm were dissected to isolate granulosa cells by mechanical way, and the granulosa cells were cultured for 5 days *in vitro*. On day 5, granulosa cells were treated with FGF1 and PD98059, and total RNA was extracted from the cultured cells with Trizol. Real-time PCR was used to determine the expression of *Spry* genes using bovine specific primers and to calculate the relative expression of *Spry* genes with $\Delta\Delta Ct$. **【Result】**① *Spry* genes were expressed in bovine ovarian granulosa cells; ② Dose-dependent relationship was observed between the expression of *Spry* genes and FGF1 signaling. The expression of *Spry2* and *Spry4* increased significantly at first and then decreased with the treating of FGF1, and FGF1 signaling induced *Spry* genes expression in bovine ovarian granulosa cells by RTK/ERK pathway. **【Conclusion】**FGF1 induced the expression of *Spry* genes in bovine ovarian granulosa cells cultured *in vitro* by RTK/ERK pathway.

Key words: FGF1; bovine; ovarian granulosa cell; signaling pathway; *Sprouty* gene(*Spry*)

* [收稿日期] 2010-05-20

[基金项目] 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目(Z111020711);西北农林科技大学留学回国人员科研启动费项目(Z111020910);西北农林科技大学基本科研业务费专项(Z109021011)

[作者简介] 江中良(1973—),男,贵州遵义人,讲师,博士,主要从事动物生殖生理与繁殖技术研究。

E-mail:jiangzhongliang@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 李青旺(1955—),男,陕西米脂人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物生殖生理与繁殖技术研究。

E-mail:liqingwangysu@yahoo.com.cn

成纤维细胞生长因子(FGF)是一个包含有至少 22 个成员的多肽家族,几乎所有的有机体组织都可以表达 FGF,同时体外合成的 FGF 也在组织与器官发育、受伤治疗和肿瘤细胞发生等方面发挥着重要作用^[1]。另外,FGF 也对生殖过程有重要影响^[2]。FGF1 是 FGF 家族的成员之一,也称酸性成纤维细胞因子(Acid fibroblast growth factor),在各种不同的生理和病理过程都发挥着重要作用^[3]。

FGF1 对靶器官产生的作用受不同因子的调节,这种调节表现为促进或抑制作用,Sprouty (Spry)蛋白就是其调节因子之一^[4]。Sprouty 蛋白是基因编码的蛋白家族,包含 4 个成员 (Spry1、Spry2、Spry3 和 Spry 4),对 FGF 和上皮生长因子(EGF)信号均起着不同的反馈调节作用。研究人员在果蝇、蟾蜍、大鼠、兔子和人体中先后发现了 *Spry* 基因的表达^[5-6],但该基因能否在牛卵巢上表达以及 FGF1 对其表达的调节机理目前还未见报道。为了研究 *Spry* 基因在牛卵巢颗粒细胞中的表达,以及 FGF1 的调节作用,本试验利用 FGF1 刺激体外培养的牛卵巢颗粒细胞并检测 *Spry* 基因的表达,旨在揭示 *Spry* 在牛卵巢颗粒细胞发育与分化过程中的作用机制,进而为牛卵泡发育的基础理论研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 卵巢的选择 从屠宰场收集黄体 and 卵泡明显的卵巢,在 30 ℃ 下用无菌的 PBS 运到实验室,然后用体积分数 75% 酒精冲洗 2 遍,再用 30 ℃ 的灭菌生理盐水冲洗以完全去除酒精。

1.1.2 颗粒细胞的培养 采用 Gutiérrez 等使用的方法并做适当的修改^[7-8]。将卵巢移到无菌操作台上,剪下其上直径 2~5 mm 的卵泡,剪破卵泡膜,用

106 μm (150 目)的无菌滤网过滤获取颗粒细胞,并用台盼蓝染色液测定颗粒细胞活力与密度,然后用 DMEM/F12 培养液(培养液含有碳酸氢钠 10 mmol/L、亚硝酸钠 4 ng/mL、牛血清白蛋白(BSA)1 g/L、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg/mL、非必需氨基酸 1.1 mmol/L、胰岛素 10 ng/mL、促卵泡激素(FSH)1 ng/mL)将颗粒细胞稀释至 1 × 10⁵ mL⁻¹。将稀释的颗粒细胞接种于 24 孔培养板中,每孔接种 1 mL 细胞悬液,在含有体积分数 5% CO₂ 和 95% 空气的 37 ℃ 培养箱中培养,分别在培养的第 2 和第 4 天更换 70% 的细胞液后继续培养。

1.2 引物的设计与合成

在 GenBank 上查出所检测基因的 cDNA 序列,采用 Primer Express 3.0 软件设计相应引物,并由上海 Invitrogen 公司进行合成。所设计的牛特异性引物及其序列见表 1。

1.3 FGF1 剂量对牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因表达的影响

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 在牛卵巢颗粒细胞培养的第 5 天,分别用不同剂量(0,1,10,50 ng/mL)的 FGF1(Cedarlane Laboratories,加拿大)处理牛卵巢颗粒细胞 2 h 后,用 Trizol 试剂盒提取其总 RNA,在 260 nm 的吸收波长范围内测量 RNA 浓度。用 1 μg DNase 处理总 RNA 后进行逆转录合成 cDNA,逆转录反应体系为 20 μL:其中 50 ng DNA 模板 1 μL,15 pmol/μL 上、下游引物各 0.5 μL,0.25 mol/L dNTP Mixture 0.4 μL,19.33 U RNAase inhibitor 1 μL,0.5 U/mL Taq DNA 聚合酶 0.35 μL,用灭菌双蒸水补足 20 μL;反应程序为:93 ℃ 预变性 5 min;93 ℃ 变性 30 s,复性 30 s,72 ℃ 延伸 35 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

表 1 Real-time PCR 所用的牛不同基因的特异性引物及其序列
Table 1 Bovine specific sequences of primers used for real-time PCR

基因 Gene	上游引物(5'-3')Forward primer	下游引物(5'-3')Reverse primer
<i>H₂A</i>	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC
<i>Spry1</i>	AGAGAGAGATTACAGCTGCTGCTA	TCTTGCTTGGTGTGGTTCCAGGA
<i>Spry2</i>	CATGGGCGTCATGTCCCATAGT	GCCTGTTCACCCGGTCATAA
<i>Spry3</i>	TGCCAGCTCAATGTCCCATAGT	TTTCAGAGCACCGTCAGCCTTT
<i>Spry4</i>	ACAAGCACTTCTTGCTGTGCGA	ATGCAGGTGCCATAGTTGACCA

1.3.2 实时定量 PCR 选用 SYBR Green I (英国 Applied Biosystems 公司)为荧光指示剂,以合成的 cDNA 为模板,以 Histone (*H₂A*)为报告基因,用 BIORAD 实时定量 PCR 仪进行实时定量检测。实

时定量 PCR 反应体系为 25 μL:SYBR Green I 12.5 μL,200 nmol/L cDNA 模板链 1 μL,150 nmol/L 实时定量 PCR 上、下游引物各 1 μL,用灭菌的双蒸水补足 25 μL,轻微混匀后加入 PCR 反应管中,密封

后放入仪器检测。实时定量 PCR 反应程序为:93 ℃预处理 3 min;95 ℃变性 15 s,59 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环。每个样品重复 2 次,检测不同基因的表达,并用 $\Delta\Delta C_t$ 方法^[9] 计算基因的相对扩增效率。

1.4 FGF1 处理时间对 *Spry* 基因表达的影响

用适当剂量的 FGF1 对颗粒细胞处理不同时间(0(对照,CK),1,2,4,8 h)后,弃去细胞液,提取牛颗粒细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,实时定量 PCR 法检测 FGF1 对 *Spry* 基因表达的影响,具体操作同 1.3。

1.5 PD98059 对 *Spry* 基因表达的调节作用

FGF1 可以通过不同的信号通道对基因表达进行调节,为确定 FGF1 是否通过 RTK/ERK 通道对 *Spry* 基因表达产生影响,用 RTK/ERK 通道细胞信号抑制剂 PD98059(Cell signal, 美国)的 DMSO 溶液预处理牛卵巢颗粒细胞 2 h 后,再用 FGF1 处理 2 h,实时定量 PCR 法检测 PD98059 对 *Spry* 基因表达的影响,同时设立 FGF1、PD98059 和 DMSO 处理的牛卵巢颗粒细胞作为对照,具体操作同 1.3。试验重复 3 次。

1.6 统计分析

利用 JMP 软件(SAS 公司,美国)对试验数据进行统计与分析。对处于正态分布范围以外的数据进

行逻辑处理,利用 ANOVA 法检测不同处理对基因表达的影响,用 *F* 检验检测重复之间的变化,所有的数据均用“平均值±标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因的表达

将 PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,结果(图 1)表明,体外培养的牛卵巢颗粒细胞能够表达 4 种 *Spry* 基因,且以 *Spry4* 的表达最为明显。

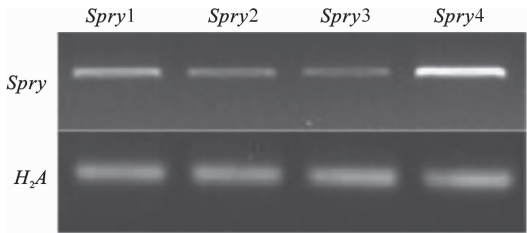


图 1 牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因的表达
Fig. 1 *Spry* genes expressed in bovine ovarian granulosa cells

2.2 FGF1 剂量对牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因表达的影响

由图 2 可知,*Spry* 基因的表达与 FGF1 的刺激呈现剂量依赖关系,但 10 和 50 ng/mL FGF1 剂量相比,二者 *Spry* 基因的相对表达量没有明显差别。

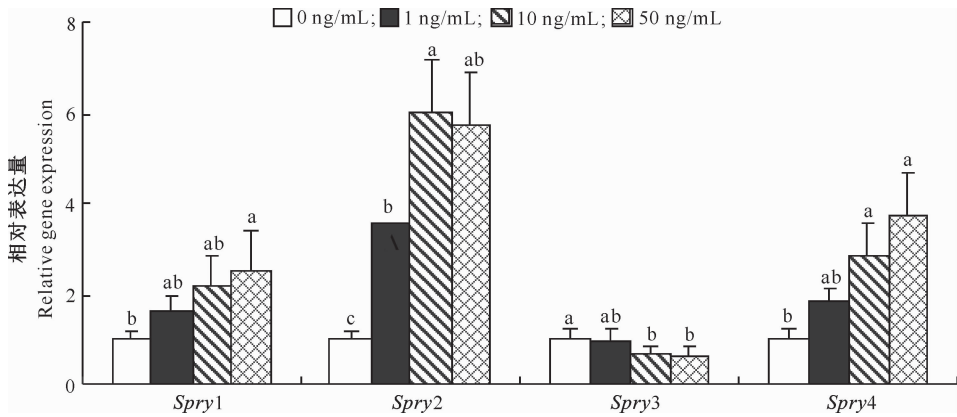


图 2 FGF1 添加剂量对牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因表达的影响
柱形图上标不同字母者表示差异显著($P<0.05$),下同

Fig. 2 Effects of FGF1 doses on the expression of *Spry* genes in bovine granulosa cells
Different letters on the bar mean significantly difference($P<0.05$). The same with the next figures

由图 2 可见,*Spry1* 的表达量在 FGF1 为 50 ng/mL 时最高,显著高于 0 ng/mL FGF1 组($P<0.05$);*Spry2* 的表达量随着 FGF1 剂量的升高而增加,1,10,50 ng/mL FGF1 组的表达量均显著高于 0

ng/mL FGF1 组,但 1 ng/mL FGF1 组的表达量显著低于 10 和 50 ng/mL FGF1 组($P<0.05$);*Spry3* 的表达量随 FGF1 剂量的上升而逐渐下降,其中 50 ng/mL FGF1 组的表达量显著低于 0 ng/mL FGF1

组($P<0.05$);在 FGF1 剂量为 10 和 50 ng/mL 时, *Spry4* 的表达量均比较高。综合以上结果,选择 10 ng/mL FGF1 用于后续试验。

2.3 FGF1 处理时间对 *Spry* 基因表达的影响

由图 3 可知, *Spry1* 基因的表达基本不受 FGF1 处理时间的影响; *Spry2* 对 FGF1 刺激非常敏感,在 FGF1 处理后的 2 h 内,其表达量显著升高

($P<0.05$),但在 FGF1 处理 4 和 8 h 时, *Spry2* 的表达量又有所下降,虽表达量高于对照组,但与对照组间已无明显差异; *Spry3* 的表达量随着 FGF1 刺激时间的延长而呈下降趋势,但这种下降趋势并不明显; *Spry4* 的表达量则在 FGF1 刺激 4 h 时与对照相比才有显著升高($P<0.05$)。

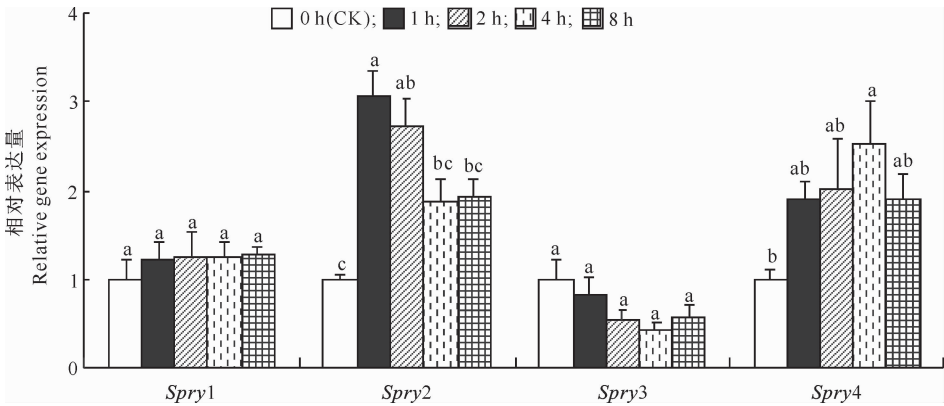


图 3 FGF1 处理时间对牛卵巢颗粒细胞 *Spry* 基因表达的影响

Fig. 3 Effects of time of FGF1 treatment on the expression of *Spry* genes in bovine granulosa cells

2.4 PD98059 对 *Spry* 基因表达的调节作用

由图 4 可知,经过 PD98059 处理的颗粒细胞, FGF1 信号在 RTK/ERK 通道的传递受到抑制。与对照组(CK)和 FGF1 刺激组相比, *Spry1* 的表达量由于受到 PD98059 的影响而显著降低($P<0.05$),同时,在 PD98059 的作用下,即使 FGF1 刺激也不能促使 *Spry1* 表达增强。在没有 PD98059 的条件下, *Spry2* 基因受 FGF1 的作用其表达量显著上升,但在 PD98059 的作用下, *Spry2* 的表达量显著低于

对照组($P<0.05$),而在 FGF1 与 PD98059 的共同作用下, *Spry2* 的表达量与对照组差异不显著。 *Spry3* 的表达不受 PD98059 和 FGF1 的影响。与 *Spry1* 相同, *Spry4* 的表达量也受 PD98059 的抑制而显著降低,在 PD98059 作用下, FGF1 信号不能刺激 *Spry4* 的表达。上述结果表明, FGF1 通过 RTK/ERK 途径抑制了 *Spry1*、*Spry2* 和 *Spry4* 的表达;但 *Spry2* 的表达可能还与其他通道有关,关于其具体的表达通道还需进一步研究。

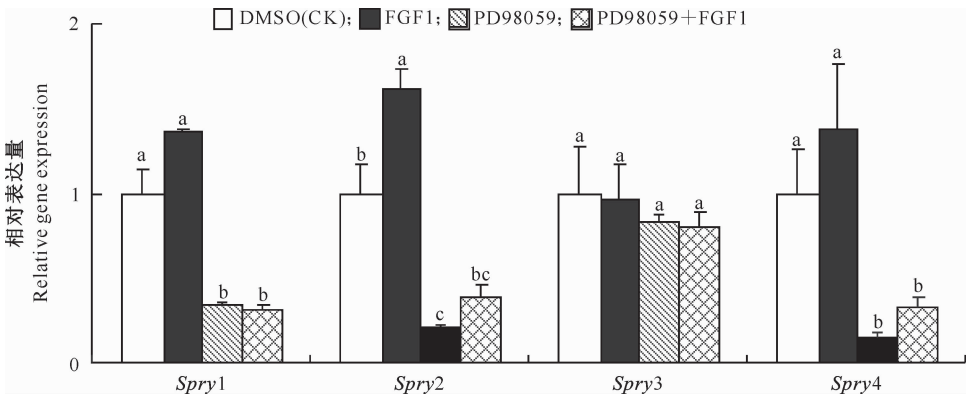


图 4 细胞信号抑制剂 PD98059 对牛卵巢颗粒细胞 *Spry* 基因表达的影响

Fig. 4 Effects of cellular signaling inhibitor PD98059 on the expression of *Spry* genes in bovine granulosa cells

3 讨 论

FGF1 可以通过与细胞膜上的受体结合后传递

其信号,而达到调节细胞增殖、分化以及损伤修复等目的, RTK/ERK 通道是 FGF1 信号对靶细胞进行调节的重要途径之一^[10]。但 FGF1 信号也受到细

胞内不同因子的反馈性调节而被放大或缩小。在果蝇、蟾蜍、大鼠、兔子和人体中的研究表明,FGF1 能够诱导 *Spry* 基因的表达并对其信号起到反馈性抑制作用^[5-6]。本试验结果显示,FGF1 信号能够刺激牛卵巢颗粒细胞中 *Spry* 基因的表达。

在本试验中,*Spry1*、*Spry2* 和 *Spry4* 的表达随 FGF1 剂量的升高而增强,但 *Spry3* 的表达与 FGF1 的剂量呈负相关关系,这可能是由于 *Spry3* 的结构与其他 *Spry* 基因结构不同造成的^[11]。对 *Spry* 基因功能的研究表明,*Spry* 基因对 FGF1 信号具有反馈调节作用^[12]。本试验结果表明,在相同剂量的 FGF1 作用下,*Spry1* 和 *Spry3* 的表达不受 FGF1 处理时间的影响,而 *Spry2* 和 *Spry4* 的表达量随 FGF1 处理时间的延长呈现出先上升后下降的变化趋势,表明 FGF1 在刺激 *Spry* 基因表达的同时,其主要信号途径 RTK/ERK 通道也受到了 *Spry* 的反馈性抑制,导致 FGF1 信号被阻断或信号强度减弱,因此 *Spry* 的表达也相应降低。为了验证这个观点,本研究利用 RTK/ERK 通道抑制剂 PD98059 进行了相关试验,结果显示,除 *Spry3* 的表达不受 PD98059 的影响外,*Spry1* 和 *Spry4* 的表达量均显著下降,这个结果很好地支持了上述观点;尽管 *Spry2* 的表达也受到了抑制,但 PD98059 并未完全抑制 FGF1 对 *Spry2* 的刺激作用,其表达量与对照组没有明显差异,表明 *Spry2* 的表达可能还受其他通道的影响,因为 FGF1 信号除经过 RTK/ERK 通道起作用外,还与 PLC、cAMP 等通道相关^[13-16],其具体机理还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer [J]. Endocrine-Related Cancer, 2004, 11(4): 709-724.
- [2] Cotton L M, O'Bryan M K, Hinton B T. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction [J]. Endocrine Reviews, 2008, 29(2): 193-216.
- [3] Miller D L, Ortega S, Bashayan O. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(6): 2260-2268.
- [4] Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development [J]. Developmental Biology, 2005, 287(1): 390-402.
- [5] Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, et al. Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the drosophila airways [J]. Cell, 1998, 92(1): 253-263.
- [6] Zhang S, Lin Y, Itäranta P, et al. Expression of sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis [J]. Mechanisms of Development, 2001, 109(2): 367-370.
- [7] Gutiérrez C, Campbell B, Webb R. Development of a longterm bovine granulosa cell culture system; Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics [J]. Biology of Reproduction, 1997, 56(3): 608-616.
- [8] Silva J, Price C. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro* [J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(6): 186-191.
- [9] Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): 45.
- [10] Wang Y, Janicki P, Koster I, et al. Xenopus paraxial protocadherin regulates morphogenesis by antagonizing sprouty [J]. Genes Dev, 2008, 22(7): 878-883.
- [11] Sivak J M, Petersen L F, Amaya E. FGF signal interpretation is directed by sprouty and sprd proteins during mesoderm formation [J]. Developmental Cell, 2005, 8(6): 689-701.
- [12] Edwin F, Patel T B. A novel role of sprouty 2 in regulating cellular apoptosis [J]. The Journal of biological Chemistry, 2008, 283(6): 3181-3190.
- [13] Murakami M, Elfenbein A, Simons M, et al. Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis [J]. Cardiovascular Research, 2008, 78(2): 223-231.
- [14] Kuang Z, Yao S, Xu Y, et al. SPRY domain-containing SOCS box protein 2: crystal structure and residues critical for protein binding [J]. J Mol Biol, 2009, 386(3): 662-674.
- [15] Rehman S, Postma W, Tytgat T, et al. A secreted SPRY domain-containing protein (SPRYSEC) from the plant-parasitic nematode *globodera rostochiensis* interacts with a CC-NB-LRR protein from a susceptible tomato [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2009, 22(3): 330-340.
- [16] Kwabi-Addo B, Wang J, Erdem H, et al. The expression of sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer [J]. Cancer Research, 2004, 64(6): 4728-4735.