

绵羊 *PRLH* 及其受体基因的克隆及在下丘脑-垂体-性腺轴中差异表达的研究

赵 强^{1,2}, 马友记^{1,2}, 李菁华^{1,2}

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省肉羊繁育生物技术工程实验室, 甘肃 民勤 733300)

摘要:为了探讨 *PRLH* 及其受体基因在绵羊性腺轴中的表达,以绵羊下丘脑-垂体-性腺轴系为研究对象,克隆了 *PRLH* 及其受体基因 *PRLHR*,构建了系统进化树,并利用 qRT-PCR 技术对 *PRLH* 及其受体基因在绵羊性腺轴中不同组织的表达差异做了研究。结果表明,绵羊 *PRLH* 和 *PRLHR* mRNA 核苷酸序列分别为 113,237 bp,*PRLH* 基因核苷酸序列与山羊、牛、人、小鼠的同源性分别为 96.8%,93.3%,80.3%,74.6%,*PRLHR* 基因与藏羚羊、山羊、牛、人和小鼠的同源性分别为 100%,99.3%,97.3%,90.4%,84.4%;*PRLH* 及其受体基因在绵羊的下丘脑、垂体、子宫和卵巢中均有一定的表达,且 *PRLH* 基因在下丘脑、垂体和卵巢中的表达要显著低于子宫 ($P < 0.05$);*PRLHR* 在子宫与垂体中的表达差异显著 ($P < 0.05$),其他差异不明显。说明下丘脑、垂体、子宫和卵巢是 *PRLH* 合成分泌和发挥作用的主要器官。

关键词:绵羊;*PRLH*;*PRLHR*;RT-PCR;差异表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)03-0020-05

doi:10.7668/hbxb.2015.03.004

Cloning of *ovine* Prolactin Releasing Hormone and Its Receptor Gene and Their Different Expression in the HPG Axis

ZHAO Qiang^{1,2}, MA You-ji^{1,2}, LI Jing-hua^{1,2}

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
2. Gansu Engineering Laboratory of Sheep Breeding Biotechnology, Minqin 733300, China)

Abstract:To explore the expression of *PRLH* and its receptor gene in sheep gonadal axis, we successfully cloned the *PRLH* and receptor gene in organizations at the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by used the sheep as experimental animal, got the phylogenetic tree. Also we used qRT-PCR technology to research different expression of *PRLH* and its receptor gene in different tissues at HPG axis. The results showed that sheep *PRLH* and *PRLHR* nucleotide sequences of mRNA were 113,237 bp. *PRLH* gene nucleotide sequence and goats, cattle, human, mouse homology were 96.8%,93.3%,80.3%,74.6%. *PRLHR* gene and the Tibetan antelope, goat, cattle, human and mouse homology were 100%,99.3%,97.3%,90.4%,84.4%. *PRLH* and its receptor gene in sheep hypothalamus, pituitary, uterine and ovary were expressed, and the expression of *PRLH* gene in hypothalamus, pituitary and ovary was significantly less than the uterine ($P < 0.05$). Expression of *PRLHR* in uterus and pituitary were significantly different ($P < 0.05$), no significant difference in other tissues ($P > 0.05$). So the hypothalamus, pituitary, ovary and uterus were the main organ for the synthesis of secretion.

Key words: Sheep; *PRLH*; *PRLHR*; RT-PCR; Differential expression

1998年,日本学者 Hinuma 等^[1]从牛下丘脑提取出一种新的 RF 肽,发现此肽能有效地促进大鼠垂体前叶细胞释放促乳素 (Prolactin, PRL),而对其

他垂体激素释放则没有影响,于是被命名为催乳素释放肽 (Prolactin releasing peptide, PrRP)。PrRP 受体属 G 蛋白偶联受体,在不同种属中命名不同,绵

收稿日期:2015-03-05

基金项目:甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2012-19);国家科技支撑计划项目(2011BAD19B02-2);三区人才专项计划项目(GSAU-SQ-2014-03)

作者简介:赵 强(1990-),男,甘肃秦州人,在读硕士,主要从事动物生产系统与工程研究。

通讯作者:马友记(1976-),男,山东汶上人,教授,博士,主要从事羊生产学教学科研工作。

羊中又称 PRLHR, 因此 PrRP 又称 PRLH。

许多研究都证明, 在哺乳动物的垂体、下丘脑和性腺等组织中均有 PPLH 及其受体基因的广泛表达。Fujii 等^[2] 以小鼠和人为研究对象的研究表明, PRLH 及其受体在中枢系统、垂体和其他组织中广泛存在。秦津等^[3] 研究表明, *PRLH* 在青年摩杂一代水牛下丘脑、垂体、性腺和其他组织中也广泛存在。在绵羊上, 对于 *PRLH* 及其受体基因表达的研究还相对不足, PRLH 确切的生理功能还有待于进一步的探讨和研究。

本研究以绵羊为研究对象, 克隆分析 *PRLH* 及其受体基因, 同时利用 RT-PCR 技术研究 *PRLH* 及其受体基因在绵羊下丘脑、垂体、子宫和卵巢这 4 种组织中的表达情况, 从而为进一步探讨催乳素对繁殖影响的作用途径及调控机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物

本研究所用的组织取自兰州市小西湖忠华屠宰场。采集 5 只成年母羊的垂体、下丘脑、子宫、卵巢 4 种组织迅速放到液氮中冷冻, 然后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于组织表达分析。

1.2 主要试剂

DEPC、IPTG、x-gal、Amp、TransZol RNA 提取试剂、一步法反转录 cDNA 试剂盒、TransStart[®] Top Green qPCR Super Mix、Trans10 感受态细胞(购自北京全式金生物); 胶回收试剂盒, 质粒抽提试剂盒(购自北京天根生化); PMD-18T 载体(购自大连宝生物)。

1.3 试验方法

1.3.1 绵羊组织 mRNA 的提取 绵羊垂体、下丘脑、子宫和卵巢组织总 RNA 提取及反转录均按照购买的试剂盒步骤进行, 最后分装并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 总 RNA 浓度的测定 通过核酸蛋白微量测定仪检测纯度、浓度及 $A_{260/280}$ 。

1.3.3 cDNA 第一链的合成 反转录反应体系: 模板 RNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 、oligo (dT) $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times$ Reaction Mix $10\text{ }\mu\text{L}$ 、RT/RI Enzyme Mix $1\text{ }\mu\text{L}$ 、gDNA Remover $1\text{ }\mu\text{L}$ 、RNase-free Water $6\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序: 将 RNA 模板、引物与 RNase-free Water 混匀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后、冰浴 2 min、然后再加入其他反应组分, 之后在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

1.3.4 引物设计与合成 本研究所用引物是根据 NCBI GenBank 数据库中的 *Ovis areas PRLH* 和 *PRLHR* mRNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计

引物, 同时用 Oligo 6.0 软件对引物进行评价。引物序列信息如表 1, 由生工生物工程(上海)公司合成。

表 1 定量 PCR 引物序列及参数

Tab.1 Sequences and parameters of primers for Real-time RT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	产物长度/bp Products length
<i>PRLH</i>	F: ATCCCTCTCTCCACAAG	113
	R: GGTCTTCCAGGCTAACGTC	
<i>PRLHR</i>	F: GGTCAACCAGAGCTCAGAGG	238
	R: CAGGGCTAGTTACCGATGA	
<i>ACTB</i> (β -actin)	F: GGTTATGAGGCTGGGATGG	136
	R: ATGCTTGCTAAGGGCAGGAT	

1.3.5 梯度 PCR 摸索适宜退火温度 反应体系 ($20\text{ }\mu\text{L}$): 模板 cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 、上下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times$ Mix $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 ddH_2O $6\text{ }\mu\text{L}$ 。梯度 PCR 反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.6 qPCR 扩增目的基因 根据 TransStart Top Green qPCR Super Mix 试剂盒(表 1) 建议的反应体系及优化确定的反应条件, 进行内参基因和目的基因的相对定量分析。不同组织重复试验 4 种组织, 每种组织另设技术重复 4 次, 根据标准曲线以及熔解曲线 C 值计算定量结果。反应体系 ($10\text{ }\mu\text{L}$) 如下: SYBR Premix Ex Taq II ($2\times$) $10\text{ }\mu\text{L}$ 、上下游引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 、cDNA 溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 ddH_2O $8.2\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, 45 个循环; 最后计算分析得到熔解曲线。

1.3.7 PCR 产物克隆测序 基因片段克隆使用天根琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 PCR 产物进行回收, PCR 产物与 PMD-18T 载体 (TaKaRa) 的连接并进行转化, 培养 14 h 后用灭菌牙签从培养基上挑取一个蓝斑、数个白斑, 分别在含 IPTG、x-gal、Amp 的 2 个培养基平板上划线培养, 并做记号, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。第 2 天, 分别取几个饱满的白斑和一个蓝斑单菌落, 分别在含 Amp 的培养基中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床过夜培养。将鉴定为阳性质粒对应的菌落, 进行摇菌培养, 经 PCR 鉴定后, 取 1 mL 新鲜培养的菌液送上海生工(生物)进行序列测定。

1.4 数据分析

采用相对定量解析方法, 选用组织中稳定表达的看家基因 β -actin 为内标基因进行标准化。所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计, 文中数据均为“平均数 \pm 标准误”, 并采用单因素方差分析进行表达量差异显著性检验以及用 LSD 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取检测

分别抽取 3 μL 绵羊垂体、下丘脑、子宫和卵巢组织提取的总 RNA 进行纯度和完整性的检测,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,结果见图 1-A,可知 28S RNA 和 18S RNA 均为较明亮、无拖尾的条带,说明样品总 RNA 是完整的,无降解,质量可靠,符合生物学试验要求,可用于后续研究。

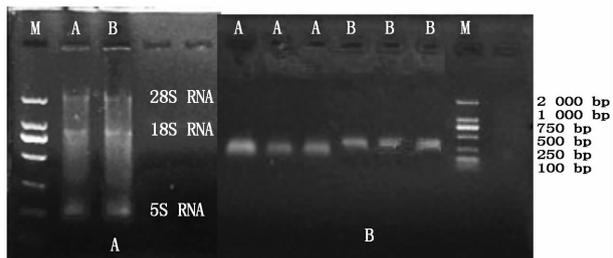


图 1 RNA 提取结果电泳检测 (A) 和 RT-PCR 的扩增电泳检测结果 (B)

Fig.1 Results of total RNA and RT-PCR production of *PRLH* and *PRLHR*

2.2 RT-PCR 的扩增

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1-B,在绵羊垂体、下丘脑、子宫和卵巢组织中均扩增出单一的特异条带,而且条带比较清晰明亮,与预期目的片段大小相吻合。内参基因的扩增结果较好,条带单一,亮度适中,说明 RNA 的提取以及 RT-PCR 过程均没有问题。

2.3 qPCR3 荧光定量 PCR 半定量结果 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)

试验组及对照组 SYBR Green I 荧光定量 PCR 溶解曲线所得的 *PRLR* 及内参基因 (*ACTB*) 扩增时的峰值单一,说明没有引物二聚体和非特异性条带形成。由扩增曲线可以看出扩增曲线间距非常均一,平行性较好,说明目的基因与内参基因扩增效率一致,符合以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量的条件。通过校正后的对照组和试验组各组织表达谱见图 2。在试验中,4 个组织 *PRLR* 的表达量均要小于内参基因的表达,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 最小的垂体为标准 1,得出数据如表 2。

表 2 *PRLH* 和 *PRLHR* 基因在下丘脑-垂体-性腺轴不同组织的表达量比较

Tab.2 Expression levels of *PRLH* and *PRLHR* mRNA in various tissues of HPGs

基因 Gene	垂体 Pituitary	下丘脑 Hypothalamus	子宫 Uterus	卵巢 Ovary
<i>PRLH</i>	2.669 3 ± 0.220a	1.000 0 ± 0.0a	6.191 0 ± 0.939b	2.948 3 ± 1.060 9a
<i>PRLHR</i>	1.801 1 ± 0.185b	1.360 2 ± 0.299ab	1.002 3 ± 0.002a	1.651 5 ± 0.127ab

注:不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: Different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$), the same letters are not different from each other ($P > 0.05$).

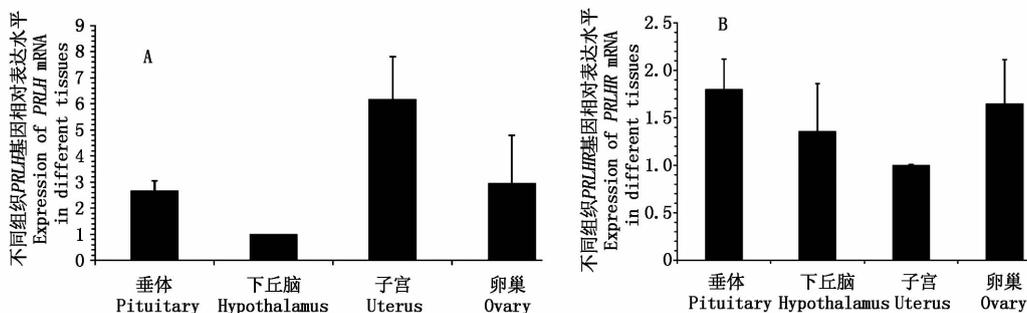


图 2 垂体、下丘脑、子宫和卵巢中 *PRLH* (A) 和 *PRLHR* (B) mRNA 的表达

Fig.2 Expression of *PRLH* (A) and *PRLHR* (B) mRNA in hypothalamus, pituitary, uterus and ovary

```

1 ATCCCTCCTC CTCCACAAGC GACCTTCCCT CCAGTCCTAA TAAAAGCAGC TGGCTTGTT C
61 ACACGTGTCT GCATGGCGAC AGAGCGCACG GGACGTTAGC CTGGAAGGAC CCT
PRLH(113 bp)

1 GGTCAACCAG AGCTCAGAGG CGGTGGTGGG CAATGGGTCG GCGGCTGGTC CAGGCGCTCA
61 GGCCATCACG CCGTTCAGG GCCTGCAGCT GGTGCATCAG CTGAAGGGGC TGATTGTGCT
121 GCTCTACAGC GTCGTGGTGG TCGTGGGGCT TGTGGGCAAC TGCCTGCTGG TGCTGGTGAT
181 TGCACGGGGT CGTCGGCTGC ACAACGTGAC CAACTTTCTC ATCGGTAACC TAGCCCTG
PRLHR(238 bp)
    
```

图 3 *PRLH* 和 *PRLHR* 序列信息

Fig.3 Sequence information of *PRLH* and *PRLHR*

2.4 序列测定和分析

通过克隆和测序获得了绵羊 *PRLH* 和 *PRLHR* mRNA 113,237 bp 的核苷酸序列(图 3),通过 DNAMAN 核苷酸同源性比对发现,绵羊 *PRLH* 基因核苷

酸序列与山羊、牛、人、小鼠的同源性分别为 96.8%, 93.3%, 80.3%, 74.6%。绵羊 *PRLHR* 基因核苷酸序列与藏羚羊、山羊、牛、人和小鼠的同源性分别为 100%, 99.3%, 97.3%, 90.4%, 84.4% (表 3)。

表 3 *PRLH* 和 *PRLHR* 基因序列核苷酸同源性比对结果

Tab. 3 Nucleotide homology comparison results of *PRLH* and *PRLHR*

<i>PRLH</i>	同源性/% Homology	<i>PRLHR</i>	同源性/% Homology
人 <i>Homo sapiens</i> (NM-014893)	80.3	人 <i>Homo sapiens</i> (NM-004248.2)	90.4
牛 <i>Bos tauns</i> (NM-174790.1)	93.3	牛 <i>Bos tauns</i> (NM-001030300.1)	97.3
小鼠 <i>Mus musculus</i> (NM-001101647.1)	74.6	小鼠 <i>Mus musculus</i> (NM-201615.2)	84.4
山羊 <i>Capra hicus</i> (JN-005876.1)	96.8	山羊 <i>Capra hicus</i> (XM-005698531.1)	99.3
		藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i> (XM-005954021.1)	100.0

2.5 分子进化树分析

用 DNAMAN 和 MEGA6.0 构建分子进化树见图 4,对于 *PRLH* 基因山羊与绵羊的亲缘关系最近,

而对于 *PRLHR* 基因绵羊与藏羚羊和山羊聚为一类,这与哺乳动物的进化程度一致。

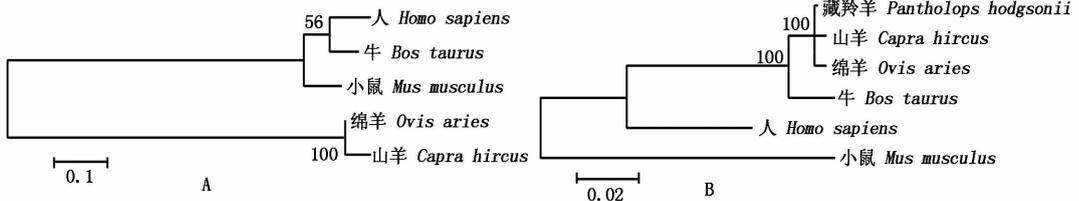


图 4 *PRLH* (A) 和 *PRLHR* (B) 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of ovine *PRLH* and *PRLHR* genes

3 讨论

研究表明,*PRLH* 在促进垂体分泌 PRL 过程中起着非常重要的促进作用。许多学者都对其在小鼠和牛上的表达规律进行研究。Kataoka 等^[4]应用原位杂交技术对 PrRP 在鼠脑中的表达进行了定量研究,结果表明在延髓孤束核表达最多,占脑全部 PrRP mRNA 的 75%,延髓的腹外侧网状核中度表达,下丘脑的背内侧核和腹内侧核的表达量只占总量的 5% 左右。Roland 等^[5]应用原位杂交技术发现 PrRP 在鼠下丘脑的背内侧,脑干内孤束核的内侧部分和腹外侧网状核中高表达。Curlewis 等^[6]报道,在绵羊的下丘脑边缘区域有强的 PrRP mRNA 信号表达,而 PrRP mRNA 在延髓中的表达水平最高,下丘脑的表达水平次之,在甲状腺、气管、肾上腺、睾丸、子宫和卵巢等中广泛存在。本研究表明,*PRLH* 基因在绵羊的下丘脑、垂体、子宫和卵巢这 4 种组织中均有表达,且有差异性表达。而子宫的表达量要显著高于其他 3 种组织,说明子宫是绵羊 *PRLH* 主要的合成组织,其他 3 种组织也有一定的合成分泌作用,这与之前的研究结果是有差异的,可能与采样的部位、季节、保存方法等因素有很大的关系,其具体的原因还有待进一步的探究。

Ibata 等^[7]研究表明,PrRP-R mRNA 在小鼠上表达丰度较高的部位是垂体,特别是垂体前叶表达量最高,PrRP-R mRNA 与 PrRP mRNA 在组织中的分布有显著差别。PrRP-R mRNA 在外周组织中也有表达,有研究表明,肾上腺、睾丸和附睾中不同程度都有 PrRP-R mRNA 的表达^[8-9]。Fujii、Roland 和 Ibata^[2,5,7]通过原位杂交和 RT-PCR 技术研究 PrRP-R 即 GPR10 的分布,结果表明,在垂体前叶、丘脑网状部、室周核、孤束核、背内侧核都有大量的表达,而其在下丘脑室旁核、视前区中部、下丘脑腹外侧、胃和肾上腺中有少量的表达。本研究结果显示,*PRLHR* 基因在绵羊的下丘脑、垂体、子宫和卵巢这 4 种组织中均有表达,呈差异表达。卵巢的表达量要显著高于子宫,而其他组织则没有差异,这与先前的报道结果是一致的。同时 Kalliomäki 等^[10]研究表明,PrRP 受体 mRNA 在垂体中表达水平最高,在中枢神经系统、肾上腺和股骨中表达水平中等,在卵巢、子宫、皮肤和肾脏等组织中表达水平较低。

已有研究表明,*PRLH* 及其受体基因在小鼠和牛的不同组织均有一定的表达,但是这方面的研究在绵羊上相对滞后。本研究成功克隆分析了 *PRLH* 及其受体基因,并通过 qRT-PCR 研究 *PRLH* 及其受

体 mRNA 在下丘脑垂体性腺轴上组织中的差异表达,为其进一步的研究做好铺垫。

参考文献:

- [1] Hinuma S, Habata Y, Fujii R, *et al.* A prolactin-releasing peptide in the brain[J]. *Nature*, 1998, 393(6682): 272 - 276.
- [2] Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, *et al.* Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor [J]. *Regulatory Peptides*, 1999, 83(1): 1 - 10.
- [3] 秦津, 谢莹雪, 王秋华, 等. 催乳素释放肽在青年摩杂一代水牛下丘脑-垂体-卵巢轴的免疫组化定位[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(18): 11093 - 11096.
- [4] Kataoka Y, Iijima N, Yano T, *et al.* Gonadal regulation of PrRP mRNA expression in the nucleus tractus solitarius and ventral and lateral reticular nuclei of the rat[J]. *Molecular Brain Research*, 2001, 87(1): 42 - 47.
- [5] Roland B L, Sutton S W, Wilson S J, *et al.* Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5736 - 5745.
- [6] Curlewis J D, Kusters D H, Barclay J L, *et al.* Prolactin-releasing peptide in the ewe: cDNA cloning, mRNA distribution and effects on prolactin secretion *in vitro* and *in vivo* [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2002, 174(1): 45 - 53.
- [7] Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, *et al.* Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain[J]. *Neuroscience Research*, 2000, 38(3): 223 - 230.
- [8] Takahashi K, Totsune K, Murakami O, *et al.* Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas [J]. *Peptides*, 2002, 23(6): 1135 - 1140.
- [9] Nieminen M L, Brandt A, Pietilä P, *et al.* Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat [J]. *Peptides*, 2000, 21(11): 1695 - 1701.
- [10] Kalliomäki M L, Pertovaara A, Brandt A, *et al.* Prolactin-releasing peptide affects pain, allodynia and autonomic reflexes through medullary mechanisms [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 46(3): 412 - 424.