

食欲素 A 对绵羊卵巢颗粒细胞 P-AMPK 与 P-ERK 信号通路的影响

王伟平¹,徐晓静¹,杜晨光²,马春燕¹,米 焱³,刘永志⁴

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院,内蒙古 呼和浩特 010018;2. 内蒙古农业大学 职业技术学院,内蒙古 包头 014109;
3. 内蒙古包头医学院附属医院,内蒙古 包头 014010;4. 内蒙古农牧业科学院,内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:为研究食欲素 A 对绵羊卵巢能量代谢及生长发育的调节作用,在体外培养黄体化颗粒细胞,用浓度为 0.05,0.10 $\mu\text{g/mL}$ 的食欲素 A 刺激细胞后,分别于 0,2,6,12,24 h 提取细胞总蛋白,采用 Western Blot 法对 P-AMPK 及 P-ERK 的表达量进行检测。结果显示,食欲素 A 刺激细胞 2 h,0.05,0.10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的 P-AMPK 表达量与对照组相比均极显著提高($P < 0.01$),食欲素 A 刺激细胞 6 h,0.05,0.10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组 P-AMPK 的表达量均达到最高值($P < 0.01$),且 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组表达量明显高于 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组;食欲素 A 刺激细胞 2 h,0.05,0.10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的 P-ERK 表达量与对照组相比均极显著提高($P < 0.01$),食欲素 A 刺激细胞 24 h,0.10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的 P-ERK 表达量极显著高于平台期(6~12 h)($P < 0.01$)并达到最高值。表明食欲素 A 通过 P-AMPK 和 P-ERK 途径参与黄体能量代谢及生长发育的调节,从而进一步参与生殖机能的调控。

关键词:食欲素 A;颗粒细胞;P-AMPK;P-ERK

中图分类号:S826 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)03-0136-04

doi:10.7668/hbxb.2015.03.024

Effect of Orexin A on the Expression of P-AMPK and P-ERK in Sheep Ovarian Granulosa Cells

WANG Wei-ping¹, XU Xiao-jing¹, DU Chen-guang², MA Chun-yan¹, MI Yan³, LIU Yong-zhi⁴

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. Vocational and Technical College, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014109, China; 3. The Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, China; 4. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: In order to investigate the effect of orexins A on the energy metabolism, growth and development of sheep ovary, the luteinising granulosa cells were isolated and cultured *in vitro*. The passage luteinising granulosa cells were treated with 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A, and the total proteins of the cells were extracted at 0, 2, 6, 12, 24 h treatment, respectively. The relative expression of P-AMPK and P-ERK were determined by Western Blot. The results showed that the expression of P-AMPK of the cells treated with 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A 2 h after treatment were significantly upregulated compared with that of control ($P < 0.01$), respectively. The expression of P-AMPK of the cells treated with 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A 6 h treatment reached the extreme value ($P < 0.01$), respectively, and expression of P-AMPK of the cells treated with 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A were significantly higher than that of the 0.05 $\mu\text{g/mL}$ treated group. The expression of P-ERK of the cells treated with 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A 2 h treatment were significantly upregulated compared with that of control ($P < 0.01$), respectively. The expression of P-ERK of the cells treated with 0.10 $\mu\text{g/mL}$ of orexins A 24 h treatment were significantly

收稿日期:2014-12-20

基金项目:内蒙古自然科学基金项目(2014MS0323);中国博士后科学基金项目(2013M541212);国家牧草产业技术体系项目(CARS-35-27)

作者简介:王伟平(1988-),男,内蒙古兴安盟科右中旗人,在读硕士,主要从事发育生物学研究。

通讯作者:徐晓静(1972-),女,黑龙江齐齐哈尔人,副教授,博士,主要从事动物组织胚胎学和发育生物学研究。

刘永志(1964-),男,内蒙古赤峰人,研究员,博士,主要从事草原生态研究。

higher than that of the plateau phase (6–12 h) and reached the extreme value ($P < 0.01$). It was indicated that the orexins A was involved in the regulation of reproductive function by regulating the energy metabolism, growth and development of sheep throughout the signaling pathway of P-AMPK and P-ERK.

Key words: Orexin A; Granulosa cells; P-AMPK; P-ERK

食欲素 (Orexins) 又称下丘脑泌素 (Hypocretin)^[1], 作为一种重要的神经肽, 不仅具有调节食欲和平衡能量的作用, 还具有保持觉醒和参与内分泌调控等功能^[2–8]。研究表明, 食欲素和卵巢 E_2 之间存在着相互影响、相互制约的正、负反馈性调节关系, 二者共同完成对动物繁殖功能的调节^[9]。食欲素可通过下丘脑-垂体-性腺轴对卵巢发挥作用。卵巢是动物重要的生殖器官, 了解卵巢卵泡发育和激素分泌的分子调控机制, 对于畜牧生产具有重要意义。卵巢中的颗粒细胞对卵泡的形成和发育过程起支持作用, 并具有分泌激素维持卵巢功能的能力。在卵泡形成和发育过程中, 颗粒细胞在卵丘周围形成一个多层次的细胞网络, 与卵泡进行大量的物质交换以及密集的细胞间信号传导, 其最突出的功能就是分泌 E_2 。因此, 颗粒细胞在卵巢功能中具有重要作用^[10]。Anukulkitch 等研究表明, 在选育的瘦型和肥胖型绵羊个体上, 食欲素 A 的表达量与其肥胖指数高度负相关, 即在瘦型个体上表达量高而在肥胖型个体上表达量低^[11], 提示食欲素 A 具有控制能量支出的作用。单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 是一个主要的能量代谢效应器和代谢平衡调节因子。P-AMPK 可分解代谢通路, 增强氧化代谢和线粒体的生物合成, 从而维持能量平衡。细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 是丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一, ERK 被激活后成为 P-ERK, 其可介导信号由胞浆向胞核传递, 参与调节细胞的生长、发育、分化和凋亡等多种生理过程^[11]。本试验通过观察不同剂量的食欲素 A 对给药后不同时间绵羊卵巢颗粒细胞 P-AMPK 和 P-ERK 表达量的影响, 探讨食欲素 A 对雌性绵羊生殖功能潜在的调节作用。

1 材料和方法

1.1 绵羊卵巢的获取

卵巢取自呼和浩特市北亚肉联厂屠宰的健康绵羊, 放入含有双抗 (Gibco) 的 PBS 溶液中, 低温保存备用。

1.2 绵羊颗粒细胞培养

用加入双抗的 PBS 清洗卵巢, 倒入平皿内剪掉

卵巢上的脂肪后再用 PBS 清洗。无菌条件下将卵巢倒入装有 75% 酒精的容器中浸泡 3~5 min, PBS 清洗后, 选取无明显闭锁大卵泡 (直径 > 6 mm), 用 1 mL 注射器抽取卵泡液, 置于 15 mL 离心管中。将抽取的卵泡液反复吹打至细胞团块分散, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。用含 10% 胎牛血清 (TBD) 的 DMEM/F12 (Gibco) 溶液重悬细胞, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 重复 2 次。加入含 14% FBS 的 DMEM/F12 培养液并将细胞悬液转移至细胞培养瓶内, 于 37 °C、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱 (Thermo) 中进行颗粒细胞原代培养。原代细胞贴壁生长至 85%~90%, 移出培养基并用 PBS 清洗 1 次后加入 0.05% 胰酶, 37 °C 消化 5 min 后, 加入含 10% 血清的培养液终止消化, 1 000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 重复 2 次, 加入含 14% 血清的培养基重悬细胞后, 接种于 6 孔细胞培养板培养。

试验前将 FSH 和 LH 在含 14% 血清的培养基中配成 2.5 IU/mL, 混合 FSH、LH 和 E_2 (Estrogen, 1 μ g/mL), 6 孔培养板中每孔加入 2 mL, 置于培养箱中 24 h 后成为黄体化颗粒细胞。颗粒细胞黄体化后分别加入 0.05, 0.10 μ g/mL 的食欲素 A, 分别于给药后 0, 2, 6, 12, 24 h 提取细胞总蛋白。以不添加食欲素 A 的黄体化颗粒细胞作为对照。

1.3 蛋白免疫印迹 (Western Blotting)

经食欲素 A 处理的细胞, 加入 100 μ L 细胞裂解液 (裂解液: PMSF = 99:1) 裂解 10 min, 然后进行超声处理, 使细胞充分破碎。用 4 °C 离心机 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 使每个样品的蛋白浓度保持在 1.2 μ g/mL, 试验中分别使用 5% 和 12% 的浓缩胶和分离胶。转膜完毕封闭 1 h。一抗孵育时抗体孵育盒及抗体稀释液均提前预冷, 直接置于 4 °C 脱色摇床中轻摇过夜孵育。充分洗膜。二抗室温孵育 1 h, 充分洗膜。使用 Odyessy (Li-Cor) 扫描仪器扫描, 抗体比例见表 1。

1.4 数据统计分析

使用统计学软件 GraphPad Prism 5 对试验数据进行单因子方差分析, 每组试验重复 3 次。置信水平在 95% ($P < 0.05$) 时, 认为差异显著, 置信水平在 99% ($P < 0.01$) 时, 认为差异极显著。

表 1 一抗及二抗比例

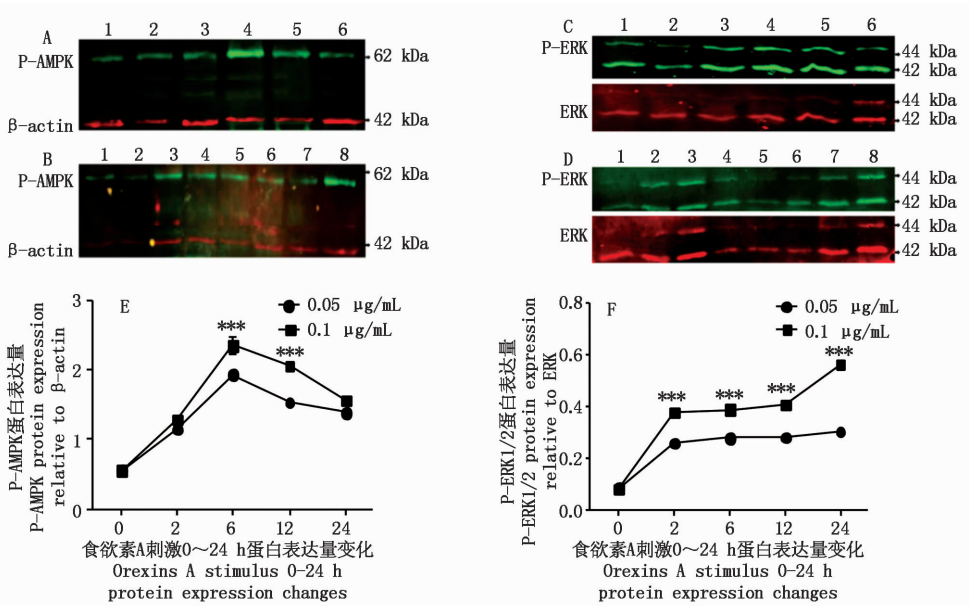
Tab.1 Proportion of primary antibody and second antibody

一抗 Primary antibody	抗体大小/kDa Molecular weight of antibody	种属 Species	二抗 Second antibody
P-AMPK (CST)	62	兔源	800CW 羊抗兔 IgG (绿)
P-ERK (CST)	44/42	兔源	稀释比例:1:25 000
β-actin (Abcam)	42	鼠源	680CW 羊抗鼠 IgG (红)
ERK (CST)	44/42	鼠源	稀释比例:1:25 000

2 结果与分析

蛋白免疫印迹试验结果表明,添加不同剂量的食欲素 A 后,绵羊卵巢颗粒细胞 P-AMPK 和 P-ERK 的蛋白相对表达量发生了明显的变化(图 1)。细胞添加食欲素 A 2 h 后,0.05,0.10 μg/mL 剂量组的 P-AMPK 表达量均极显著提高($P<0.01$)(图 1-E)。添加食欲素 A 6 h 后,0.05,0.10 μg/mL 剂量组的 P-AMPK 表达量均达到最高值($P<0.01$),且 0.10 μg/mL 剂量组表达量明显高于 0.05 μg/mL 剂量组

(图 1-E)。给药后 12~24 h,0.05,0.10 μg/mL 剂量组的 P-AMPK 表达量逐渐降低至给药后 2 h 的表达水平(图 1-E)。添加食欲素 A 2 h 后,0.05,0.10 μg/mL 剂量组的 P-ERK 表达量均极显著提高($P<0.01$),且 0.10 μg/mL 剂量组明显高于 0.05 μg/mL 剂量组(图 1-F)。给药后 6~24 h,0.05 μg/mL 剂量组的 P-ERK 表达量极基本达到平台期,而给药后 24 h 0.10 μg/mL 剂量组的 P-ERK 表达量极显著高于平台期(给药后 6~12 h)($P<0.01$)且达到最高值(图 1-F)。



A, C: 1 为空白对照; A: 2~6. 对照组空白处理 0, 2, 6, 12, 24 h 的 P-AMPK 和 β-actin 表达情况; B: 1~4. 0.05 μg/mL 剂量组给药 2, 6, 12, 24 h 的 P-AMPK 和 β-actin 表达情况; 5~8. 0.10 μg/mL 剂量组给药 2, 6, 12, 24 h 的 P-AMPK 和 β-actin 表达情况; C: 2~6. 对照组空白处理 0, 2, 6, 12, 24 h 的 P-ERK 和 ERK 表达情况; D: 1~4. 0.05 μg/mL 剂量组给药 2, 6, 12, 24 h 的 P-ERK 和 ERK 表达情况; 5~8. 0.10 μg/mL 剂量组给药 2, 6, 12, 24 h 的 P-ERK 和 ERK 表达情况; E. P-AMPK 在颗粒细胞中的表达量变化趋势; F. P-ERK 在颗粒细胞中的表达量变化趋势。***. 表示与对照组相比差异极显著。

A and C: 1 for CK; A: 2~6. Expression of P-AMPK and β-actin in control group; B: 1~4. Expression of P-AMPK and β-actin at 2, 6, 12, 24 h treatment by 0.05 μg/mL of orexin A; 5~8. Expression of P-AMPK and β-actin at 2, 6, 12, 24 h treatment by 0.10 μg/mL of orexin A; C: 2~6. Expression of P-ERK and ERK in control group; D: 1~4. Expression of P-ERK and ERK at 2, 6, 12, 24 h treatment by 0.05 μg/mL of orexin A; 5~8. Expression of P-ERK and ERK at 2, 6, 12, 24 h treatment by 0.10 μg/mL of orexin A; E. The trend of expression of P-AMPK treatment by orexin A; F. The trend of expression of P-ERK treatment by orexin A. ***. Means extremely significant difference compared with control group ($P<0.01$).

图 1 食欲素 A 刺激卵巢颗粒细胞对蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of orexin A stimulation ovion luteinized granulosa cells for protein expression

3 讨论

研究表明, Orexins 在下丘脑、垂体、卵巢、睾丸及附睾均有分布^[9]。Orexins 在下丘脑和垂体的分布提示其可能直接在垂体水平调节 LH、FSH 和

PRL 的分泌和释放, 参与调节生殖活动, 或通过影响 GnRH/LH 系统来调节生殖功能。Orexins 可能在下丘脑-垂体-性腺轴各级水平直接参与生殖活动的调节。此外, 也有研究表明, 向动情前期去卵巢母猪的侧脑室注射 E₂ 后, Orexin A 在下丘脑、中脑、延

髓、丘脑、嗅结节和大脑皮质的含量降低,这表明下丘脑的 Orexins 和卵巢 E₂之间存在着相互影响、相互制约的正、负反馈性调节的关系,二者共同完成对动物繁殖功能的调节。

脑中食欲素神经元主要分布于下丘脑,参与摄食、能量代谢和睡眠-觉醒等生理功能的调节。之前的研究主要集中在其对摄食和睡眠-觉醒的调节方面,近年来研究发现,食欲素对生殖功能也具有重要的调节作用。食欲素结合食欲素受体后才能发挥作用,Silveyra 等^[12]通过实时定量 PCR 方法在大鼠卵巢内检测到 Orexin A 和 Orexin B 的表达,这说明食欲素可通过食欲素受体作用于卵巢来调节生殖功能。在哺乳动物卵巢中,卵泡的生长发育及分化需要颗粒细胞和卵母细胞特异性基因的协同表达,这一程序的执行依赖于卵母细胞与颗粒细胞之间的局部信号交换以及促性腺激素的调控。哺乳动物卵巢能否产生可用的卵母细胞,主要取决于促性腺激素对卵泡发育、颗粒细胞成熟、排卵及黄体化的调节作用。

机体为保持稳态,会通过多种渠道来维持能量平衡。本试验中,0.05,0.10 μg/mL 剂量组的 P-AMPK 表达量均在给药后 2 h 开始迅速上升,并于给药后 6 h 达到最高值。通过负反馈调节,P-AMPK 的表达量在给药后 12 h 开始逐渐下降,到 24 h 基本降低至给药后 2 h 的表达水平。试验结果表明,0.10 μg/mL 剂量组上调 P-AMPK 表达的作用更为明显。调节细胞生长发育及凋亡的基因 P-ERK 的表达量在给药后 0~2 h 迅速上升,经过 2~12 h 的平台期后,0.10 μg/mL 剂量组在给药后 24 h 的 P-ERK 表达量进一步提高。以上结果表明,食欲素 A 刺激颗粒细胞后,P-AMPK 及 P-ERK 的表达量均上调,且 0.10 μg/mL 剂量组给药后不同时间的 P-AMPK 及 P-ERK 表达量均明显高于 0.05 μg/mL 剂量组,表明食欲素 A 对卵巢颗粒细胞 P-AMPK 及 P-ERK 的表达具有明显的时间及剂量效应。本试验结果提示,食欲素 A 对卵巢颗粒细胞能量代谢及生长发育等具有积极地调控作用,这为进一步研究食欲素对生殖机能的调节机理奠定了基础。

参考文献：

[1] 王俊波,王培军,凌树才,等. 大鼠发情周期下丘脑中

食欲素及其受体的变化[J]. 解剖学报,2007,38(2): 243 - 245.

[2] 伍鸿鹰,汤长发,贺洪,等. 食欲素和食欲素受体与运动[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,39(11): 7966 - 7969.

[3] Putula J, Turunen P M, Jäntti M H, *et al.* Agonist ligand discrimination by the two orxin receptors depends on the expression system [J]. *Neuroscience Letters*, 2011, 494(1): 57 - 60.

[4] Tsujino N, Sakurai T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system [J]. *Pharmacological Reviews*, 2009, 61(2): 162 - 176.

[5] Okumura T, Nozu T. Role of brain orexin in the pathophysiology of functional gastrointestinal disorders [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 26(suppl): 61 - 66.

[6] Smith R J, See R E, Aston-Jones G. Orexin/hypocretin signaling at the orexin 1 receptor regulates cue-elicited cocaine-seeking [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2009, 30(3): 493 - 503.

[7] Aston-Jones G, Smith R J, Sartor G C, *et al.* Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: a role in reward-seeking and addiction [J]. *Brain Research*, 2010(1314): 74 - 90.

[8] Molik E, Zieba D A, Misztal T, *et al.* The role of orxin A in the control of prolactin and growth hormone secretions in sheep-*in vitro* study [J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2008, 59(Suppl): 91 - 100.

[9] 苏娟,姚远,杨桂红,等. Orxin B 在猪下丘脑-垂体-性腺轴的分布及对生殖调节的体外研究[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(11): 1460 - 1466.

[10] 蒋天晔,窦环,赵光锋. microRNA 调控卵巢颗粒细胞的作用及机制研究进展[J]. 临床检验杂志,2012,30(5): 364 - 366.

[11] 龚艳华,张春梅,李国生,等. p-ERK 在膀胱癌中的表达及意义[J]. 当代医学,2012,18(30): 16 - 17.

[12] Silveyra P, Lux-lantos V, Libertun C. Both orxin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous: effects of orxin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007, 293(4): 977 - 985.