

CPXM1 在蛋鸡卵泡中的表达及其对孕激素分泌的影响

赵园园¹, 孟金柱¹, 罗碧秀², 赵成刚^{1*}

(1. 铜仁学院, 贵州 铜仁 554300; 2. 遥山沟生态种养农民专业合作社, 贵州 铜仁 554300)

摘要:为确定蛋鸡 CPXM1 在卵泡颗粒细胞中的表达及其在卵泡中的定位, 同时研究 CPXM1 表达与 P₄ 分泌的关系。选取 5 只母鸡, 收集 SWF(小白卵泡)、LWF(大白卵泡)、SYF(小黄卵泡)和 LYF(大黄卵泡), 分别刮取颗粒细胞, 通过 QRT-PCR 检测 CPXM1 mRNA 在不同发育阶段卵泡颗粒细胞中的表达; 运用免疫组化定位 CPXM1 蛋白在 LWF 和 SYF 中的表达; 抽取卵泡液, 测定各发育阶段卵泡液中 P₄ 的浓度。结果发现, CPXM1 mRNA 在 LWF 中的含量显著高于其它卵泡 ($P < 0.05$); 蛋鸡卵泡膜细胞层、颗粒细胞层和卵丘细胞中均检测到 CPXM1 蛋白的表达, 且在 LWF 颗粒细胞层中的表达量明显高于其它细胞, 同时, 在 LWF 中的表达量也要高于 SYF; LYF 卵泡液中 P₄ 的浓度极显著地高于其它卵泡 ($P < 0.01$)。推测 CPXM1 可能在颗粒细胞中发挥抑制卵泡发育的功能。

关键词: 卵泡; 蛋鸡; CPXM1; 表达

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)05-0065-04

Expression of CPXM1 in Follicles of Laying Hens and Its Effect on Progesterone Secretion

ZHAO Yuanyuan¹, MENG Jinzhu¹, LUO Bixiu², ZHAO Chenggang^{1*}

(1. Tongren University, Tongren 554300; 2. Yaoshangou Ecological Farmers' professional cooperative, tongren 554300, China)

Abstract: To determine the expression and location of CPXM1 in follicular granulosa cells of laying hens and the relationship between CPXM1 expression and P₄ secretion, SWF, LWF, SYF and LYF of 5 hens were collected. Granulosa cells were scraped and the expression of CPXM1 mRNA in follicular granulosa cells at different stages of development was detected by QRT-PCR. Immunohistochemistry was used to locate the expression of CPXM1 peptide in follicles of LWF and SYF. The concentration of P₄ in follicular fluid at different stages of development were detected. As a result, the levels of CPXM1 mRNA in LWF was significantly higher than that in other follicles ($P < 0.05$). The expression of CPXM1 protein was detected in theca cells, granulosa cells and cumulus cells of follicle and the expression level in LWF granulosa cell layer was significantly higher than that in other cells of LWF and cells of SYF. The concentration of P₄ in LYF follicular fluid was significantly higher than that of other follicles ($P < 0.01$). In conclusion, CPXM1 may inhibit follicular development in granulosa cells.

Key words: Follicles; Laying hens; CPXM1; Expression

鸡蛋营养物质丰富且全面, 同时价格低廉, 是人们饮食中重要的动物蛋白来源。蛋鸡(*Gallus gallus*)

产蛋率的高低主要受卵泡发育状况的影响。性成熟期的家禽卵泡发育是连续的, 并且具有优先等级, 即连续产蛋的母鸡卵巢中存在许多处于不同发育阶段的卵泡, 按直径可分为等级前卵泡与等级卵泡, 其中, 等级前卵泡又可进一步细分为小白卵泡(直径 1 ~ 2 mm, SWF)、大白卵泡(直径 3 ~ 5 mm, LWF)、小黄卵泡(直径 6 ~ 8 mm, SYF)以及大黄卵泡(直径 9 ~ 12 mm, LYF); 等级卵泡按体积大小依次命名为 F1, F2, …, F5, F6, F7^[1-2]。为保证母鸡的产蛋序列, 每天最大的等级卵泡都会

收稿日期: 2019-07-16

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字 [2018]348); 铜仁市科技计划项目(铜市科研[2017]39 号、铜市科研[2016]18 号-1); 铜仁学院博士启动基金项目(trxyDH1601)

作者简介: 赵园园(1987-), 女, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 赵成刚, 男, 教授, E-mail: 308681484@qq.com

排卵,同时有1个等级前卵泡被筛选出来进入等级卵泡,继而发育成熟、排卵。只有少数卵泡能发育成熟并排卵,称为优势卵泡,大多数卵泡则在发育过程中闭锁。小黄卵泡(直径6~8 mm)是卵泡能否优势化的关键选择点^[3]。

鸡的卵泡由卵母细胞和周围的体细胞及非细胞物质组成,其中,周围细胞层自内向外依次是卵黄膜、颗粒细胞层、基膜、膜细胞层、结缔组织,在卵母细胞发育、成熟过程中发挥营养供给、保护、支持等作用^[4]。卵泡颗粒细胞在原始卵泡的启动和卵泡的选择等过程中发挥重要作用。一方面,颗粒细胞能诱导原始卵泡启动及卵泡选择^[5-9];另一方面,颗粒细胞能分泌孕激素,调节等级卵泡的生长和排卵^[10]。

颗粒细胞的分化和增殖受到一系列因子的调控,如FSHR(促卵泡素受体)、IGFs(胰岛素样生长因子)、EGFs(表皮生长因子)等^[11-14]。李鹏飞等研究发现,CPXMI(carboxypeptidase X, Member 1)在牛从属卵泡中的表达水平显著高于优势卵泡,可能在卵泡优势化过程中起负调控作用^[15]。在小鼠的研究中发现,CPXMI通过加工神经内分泌肽调控细胞生长和发育^[16],此外,CPXMI在小鼠的破骨细胞形成过程中起了重要的调节作用^[17]。CPXMI的表达受表观遗传调控,可以抑制乳腺癌细胞的增殖^[18]。在克罗恩氏病患者的肠粘膜中,CPXMI的表达量显著高于正常人,暗示其作为检测克罗恩氏病的生物标记可能性^[19]。目前关于CPXMI在鸡卵泡中的研究尚未见报道,为深入了解CPXMI在蛋鸡卵泡发育过程中的作用,本研究采集蛋鸡卵巢上处于不同发育阶段卵泡,通过测定卵泡液中的激素含量、检测CPXMI mRNA和蛋白的表达,推测CPXMI可能的功能,为阐明卵泡发育机理提供基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

本研究所用蛋鸡由贵州省铜仁市遥山沟生态种养农民专业合作社提供。选取5只62周龄健康母鸡,屠宰,选取卵巢上直径为3~5 mm的LWF(大白卵泡)和直径为6~8 mm的小黄卵泡(SYF),放入PBS中,用于后续免疫组化实验;剪取小白卵泡(直径1~2 mm,SWF)、大白卵泡(直径3~5 mm,LWF)、小黄卵泡(直径6~8 mm,SYF)以及大黄卵泡(直径9~12 mm,LYF),分别用1 mL注射器抽取卵泡液,-20℃保存,用于测定

孕激素含量,剩余部分用于总RNA的提取。

1.2 卵泡总RNA提取与QRT-PCR检测

将抽掉卵泡液的小白卵泡、大白卵泡、小黄卵泡以及大黄卵泡用生理盐水冲洗干净,投入液氮中冷冻,研磨,用Trizol法提取总RNA,并用EasyScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal)(北京全式金)反转录第一条链cDNA,反转录条件为:42℃孵育15 min,85℃加热15 s灭活。将反转录的cDNA稀释至100 ng/μL,备用。

NCBI在线设计鸡CPXMI的引物,参考序列登录号:XM_015301329.2,以GAPDH为内参基因,由上海生工生物有限公司合成。引物序列如表1所示。

表1 供试引物序列

基因名称	引物(5'→3')	产物大小(bp)
CPXMI	F: CTGTGCCACTACGACGACTT	156
	R: GGAGACGTGGGGAATTTGT	
GAPDH	F: CTGCCAGAACATCATCCCA	143
	R: CGGCAGGTCAGGTCAACAAC	

荧光定量PCR检测蛋鸡不同发育阶段卵泡中CPXMI mRNA的表达量,使用TransStart® Tip Green qPCR SuperMix(北京全式金),按说明书建立20 μL的反应体系:2×Transstart Tip Green qPCR super mix 10 μL,上、下游引物各0.4 μL,模板cDNA 4 μL(100 ng/μL),RNA-free H₂O 5.2 μL。反应程序:94℃预变性2 min;94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,40个循环。所用仪器为Roche LightCycler 480(瑞士),表达量以2^{-ΔΔCT}表示。

1.3 免疫组织化学技术

对采集的LWF和SYF放入4%的多聚甲醛中固定24 h,流水冲洗24 h,将经梯度酒精(浓度递增)脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,切片、摊片、多聚赖氨酸处理过的载玻片捞片、烤片。将处理好的切片再透明、脱蜡,抗原修复、封闭,在湿盒中4℃过夜孵育CPXMI抗体(华大基因定制,免源,1:200稀释),以兔血清为对照,孵育完成后,在37℃烘箱中复温30 min,PBS冲洗3次,室温孵育Mouse Anti-Rabbit IgG(武汉博士德,1:100稀释)1 h,DAB显色5 min,苏木精复染60 s,脱水、透明,中性树胶封片,显微镜(Leica,德国)观察,采集照片。

1.4 激素含量测定

本研究中测定孕激素(P₄)所用ELISA试剂盒

购自上海蓝基生物科技有限公司,按说明分别测定蛋鸡SWF、LWF、SYF、LYF中卵泡液内 P_4 的含量,用酶标仪读取光密度(OD, optical density)值,用标准品建立标准曲线,分别算出各OD值对应的 P_4 浓度,每个样品做5次重复。

1.5 数据分析

本试验的 P_4 浓度、CPXM1 mRNA表达量数据通过SPSS 17.0进行分析,结果以Mean \pm SD表示。

2 结果与分析

2.1 蛋鸡不同发育阶段卵泡中CPXM1 mRNA的表达分析

运用QRT-PCR技术对不同发育阶段卵泡中的CPXM1 mRNA表达量进行检测,结果发现,LWF中的表达量最高,为 1.73 ± 0.51 ,显著高于其它卵泡(SWF: 0.57 ± 0.41 、SYF: 0.62 ± 0.25 、LYF: 0.62 ± 0.58),且在其它卵泡中的表达量差异不显著(图1)。

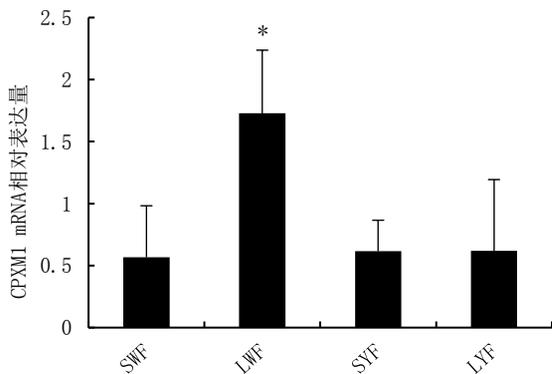


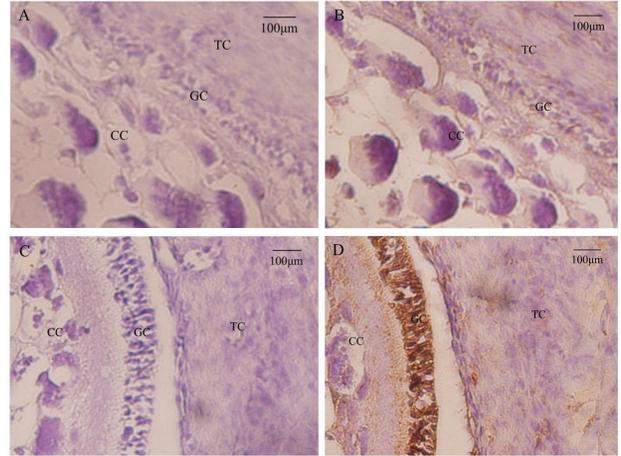
图1 CPXM1 mRNA在蛋鸡不同发育阶段的卵泡中的表达

2.2 蛋鸡不同发育阶段卵泡中CPXM1蛋白的表达分析

利用免疫组织化学技术对蛋鸡不同发育阶段卵泡中CPXM1蛋白进行表达定位,结果显示,CPXM1蛋白在蛋鸡卵泡的膜细胞(TC)、颗粒细胞(GC)、卵丘细胞(CC)中均有表达,且在LWF中的表达高于SYF,尤其是在LWF的颗粒细胞层表达量明显更有优势(图2)。

2.3 蛋鸡不同发育阶段卵泡液中孕激素含量分析

通过ELISA测定不同大小卵泡的卵泡液中孕激素含量,结果显示,随着卵泡发育,孕激素含量逐渐升高,但SWF、LWF和SYF中的孕激素含量升高不明显,而LYF卵泡液中的孕激素含量最高,并且极显著高于其它卵泡($P<0.01$)(图3)。



A: SYF 阴性对照组, B: SYF 试验组, C: LWF 阴性对照组, D: LWF 试验组。CC: 卵丘细胞, GC: 颗粒细胞, TC: 膜细胞

图2 CPXM1蛋白在蛋鸡LWF和SYF中的表达

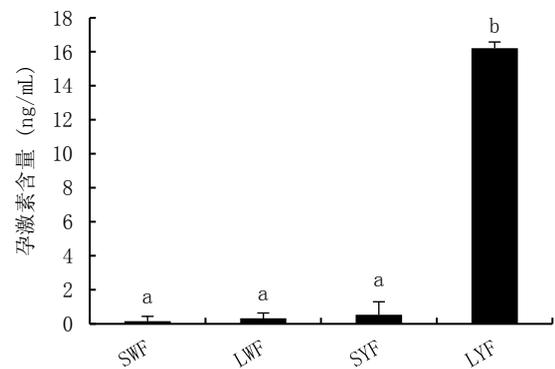


图3 蛋鸡不同发育阶段卵泡中孕激素(P_4)的含量

3 结论与讨论

卵泡发育主要受下丘脑-垂体-性腺轴系统产生的GnRH、FSH、LH、雌激素、孕激素的调控^[20]。鸡卵泡内的雌激素主要由膜细胞(内膜层)产生,具有促进卵泡生长、成熟的作用,同时,还能促进性腺激素受体的合成。孕激素由鸡的颗粒细胞合成、分泌,具有促进LH分泌,诱发排卵的作用,但等级前卵泡合成孕激素的量很少,而等级卵泡合成能力强^[21]。本研究发现孕激素在大黄卵泡中的表达量较高,可能是随着卵泡发育,孕激素合成增加导致的。

CPXM1编码金属羧基蛋白酶,虽然有研究表明CPXM1调控小鼠破骨细胞生成^[17],且可作为人类乳腺癌和克罗恩氏病的潜在生物标记^[18-19]。但对其功能的报道仍然较少。高通量测序结果显示,CPXM1在牛优势卵泡中表达量显著小于从属卵泡^[15]。本研究得出相似的结果,即CPXM1 mRNA在LWF中的表达量最高,且显著地高于其他阶段卵泡。同时CPXM1蛋白在LWF中的表达

量明显多于SYF中,而SYF所处的阶段正是卵泡优势化与否的关键节点,推测CPXM1可能在卵泡优势化过程中发挥抑制作用。

通过免疫组化检测到LWF和SYF中CPXM1蛋白的表达,结果显示,CPXM1蛋白在LWF和SYF的膜细胞、颗粒细胞和卵丘细胞中都表达,并且在LWF颗粒细胞层的表达明显多于其它细胞层和SYF中的表达。颗粒细胞正是鸡合成孕激素的部位,因此,笔者推测CPXM1通过抑制孕激素合成来抑制卵泡发育。

综上所述,蛋鸡卵泡中CPXM1主要在颗粒细胞中表达,且表达量与孕激素含量呈现相反的趋势,暗示CPXM1可能通过抑制颗粒细胞合成孕激素进而抑制卵泡发育。

参考文献:

- [1] Onagbesan O, Bruggeman V, Decuypere E. Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: A review [J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 111(2-4): 121-140.
- [2] 林金杏. 局部性促生长因子对鸡卵泡发育的调控及其机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [3] Johnson A L, Woods D C. Dynamics of avian ovarian follicle development: Cellular mechanisms of granulosa cell differentiation [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2009, 163(1-2): 12-17.
- [4] Perry M M, Gilbert A B, Evans A J. Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase [J]. *Journal of Anatomy*, 1978, 125(3): 481-497.
- [5] Schmidt D. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance [J]. *Development (Cambridge)*, 2004, 131(4): 933-942.
- [6] Yang S, Wang S, Luo A, et al. Expression patterns and regulatory functions of microRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(5): 126.
- [7] Liu K, Zhang H, Risal S, et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice [J]. *Current Biology*, 2014, 24(21): 2501-2508.
- [8] Edson M A, Nagaraja A K, Matzuk M M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation [J]. *Endocrine reviews*, 2009, 30(6): 624-712.
- [9] Johnson A L. Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation [J]. *Poultry Science*, 2015, 94(4): 781-785.
- [10] 李碧春, 秦洁. 雌禽生殖生理研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2006(1): 36-39.
- [11] Woods D C, Haugen M J, Johnson A L. Actions of Epidermal Growth Factor Receptor/Mitogen-Activated Protein Kinase and Protein Kinase C Signaling in Granulosa Cells from Gallus gallus Are Dependent upon Stage of Differentiation [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(1): 61-70.
- [12] Johnson A L, Haugen M J, Woods D C. Role for Inhibitor of Differentiation/Deoxyribonucleic Acid-Binding (Id) Proteins in Granulosa Cell Differentiation [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(6): 3187-3195.
- [13] Silva J R, Figueiredo J R, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis [J]. *Theriogenology*, 2009, 71(8): 1193-1208.
- [14] Hernandez A, Bahr J. Role of FSH and epidermal growth factor (EGF) in the initiation of steroidogenesis in granulosa cells associated with follicular selection in chicken ovaries [J]. *Reproduction*, 2003, 125(5): 683-691.
- [15] 李鹏飞, 孟金柱, 景灵婕, 等. 转录组测序筛选牛卵泡发育相关基因及其表达差异分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(15): 187-195.
- [16] Lei Y, Xin X, Morgan D, et al. Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metalloproteinase gene family with highest similarity to CPX-2 [J]. *DNA and Cell Biology*, 1999, 18(2): 175-185.
- [17] Chang E J, Kwak H B, Kim H, et al. Elucidation of CPX-1 involvement in RANKL-induced osteoclastogenesis by a proteomics approach [J]. *FEBS Lett*, 2004, 564(1-2): 166-170.
- [18] Uehiro N, Sato F, Pu F, et al. Circulating cell-free DNA-based epigenetic assay can detect early breast cancer [J]. *Breast Cancer Research*, 2016, 18(1): 129-142.
- [19] Hong S N, Joung J G, Bae J S, et al. RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls [J]. *Inflammatory bowel diseases*, 2017, 23(7): 1098-1108.
- [20] 陈玉霞. 蛋鸡不同发育阶段卵巢与卵泡中ER α 和ER β 的表达和分布研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2015.
- [21] 王静. FOXL2对鸡卵泡颗粒细胞分化的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.

(责任编辑:王丝语)