

吕世琪, 马晓菲, 周荣艳, 等. 线粒体 *tRNA-Lys* (T7719G) 基因变异对绵羊卵巢颗粒细胞生理功能的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 1-5.

LYU S Q, MA X F, ZHOU R Y, et al. Effects of mitochondrial *tRNA-Lys* (T7719G) gene variations on the physiological function of granulosa cells in sheep [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 1-5.

线粒体 *tRNA-Lys* (T7719G) 基因变异对绵羊卵巢颗粒细胞生理功能的影响

吕世琪, 马晓菲, 周荣艳, 陈晓勇*

(河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071000)

摘要: 颗粒细胞是卵泡的重要组成部分, 可分泌多种卵泡发育所需的因子调控卵母细胞的生长、分化、成熟和闭锁。研究表明线粒体 *tRNA* 变异改变线粒体融合、分裂和自噬等生理功能。本试验对绵羊卵巢组织进行 PCR 扩增产物测序确定 *tRNA-Lys* 基因型, 使用流式细胞仪测定细胞凋亡情况, 采用 Western blot 技术检测颗粒细胞内线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 及分裂相关蛋白 Drp1、MFF 的蛋白表达水平。结果表明, 线粒体 *tRNA-Lys* 基因 7 719 位点存在 T→G 变异, 所以存在 G、T 两种基因型; G 基因型颗粒细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$), G 分裂相关蛋白 MFF 含量显著升高 ($P<0.05$)。综上, 线粒体 *tRNA-Lys* (T7719G) 基因变异对绵羊颗粒细胞凋亡有明显抑制作用, 显著提高分裂相关蛋白 MFF 表达量, 促进细胞分裂。

关键词: 线粒体基因组; 绵羊; 颗粒细胞; 生理功能

中图分类号: S813.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)03-0001-05

Effects of mitochondrial *tRNA-Lys* (T7719G) gene variations on the physiological function of granulosa cells in sheep

LYU Shiqi, MA Xiaofei, ZHOU Rongyan, CHEN Xiaoyong*

(College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: Granulosa cells are important components of the follicle, and they secrete a variety of factors required for follicular development to regulate oocyte growth, differentiation, maturation and atresia. Studies have shown that mitochondrial *tRNA* variants alter physiological functions such as mitochondrial fusion division and autophagy. In this study, genotypes were determined by sequencing PCR amplification products from ovarian tissues of sheep, and apoptosis was measured by flow cytometry. The results showed that there were two genotypes of mitochondrial *tRNA-Lys* gene, G and T. The apoptosis rate of the granulosa cells of genotype G was significantly lower ($P<0.05$). The content of division-related protein MFF was significantly higher ($P<0.05$), and mitochondrial fission was enhanced in genotype G samples. Taken together, mitochondrial *tRNA-Lys* (T7719G) significantly reduced the rate of apoptosis, increased the value of the division-related protein MFF, and promoted and increased cell division.

Keywords: mitochondrial DNA; sheep; granular cells; physiological function

颗粒细胞是卵泡的重要组成部分, 可分泌多种卵泡发育所需的因子调控卵母细胞的生长、分化、成熟和闭锁。颗粒细胞的存活与否、存活状况能够直接影响卵泡的发育过程和是否发生闭锁反应。绵羊一生中大约有 10^6 个卵泡, 而大部分的卵泡会在体内发生闭锁, 丧失排卵和激素释放功能^[1]。引起卵泡闭

锁的主要原因是颗粒细胞的凋亡^[2]。颗粒细胞凋亡涉及到内质网、死亡受体和线粒体三个途径, 但主要是由线粒体途径导致的, 半胱氨酸蛋白酶家族 (caspase 家族) 是线粒体凋亡途径的最后执行者, 在细胞中以非活性状态存在, 直到细胞凋亡被触发^[3]。线粒体会释放多种蛋白质, 比如细胞色素 C 从而诱导细胞凋亡, 这一途径会导致细胞损伤。研究表明, 在赤霉烯酮的作用下, 鸡原代颗粒细胞中的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被激活, 自噬水平升高, 促进细胞色素 C 的产生及释放, 进一步诱发细胞中线粒体为主导的细胞凋亡启动, 最终导致鸡颗粒细胞凋亡^[4]。

收稿日期: 2023-05-18; 修回日期: 2023-12-28

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2020204001)

第一作者: 吕世琪, 女, 硕士

* 通信作者: 陈晓勇, 研究员, 研究方向: 绵羊遗传育种与繁殖,

E-mail: chenxiaoyong-2000@163.com.

线粒体是为细胞生存提供能量的动态细胞器。线粒体的融合和分裂在正常情况下保持动态平衡^[5]。Drp1 和 Mfn2 作为线粒体融合和分裂必需蛋白质,已有研究表明,Drp1 下调或 Mfn2 上调均会抑制线粒体通透性转化膜的开放,导致线粒体膜电位降低,甚至细胞坏死及凋亡^[6]。线粒体为细胞正常功能运转提供能量供应,其功能下降直接导致卵巢颗粒细胞功能降低,进而降低卵母细胞质量,引起卵巢储备功能减退^[7]。研究表明 mtDNA 突变、缺失或功能障碍可对卵母细胞成熟、受精及胚胎发育过程造成不良影响^[8-9]。

本团队前期研究发现线粒体基因组 *tRNA-Lys* 7 719 位点存在 T→G 变异 (T7719G),该变异与绵羊产羔数相关^[10],颗粒细胞与卵泡关系密切,且对于卵泡的生长发育非常重要,*tRNA-Lys* (T7719G) 变异是否影响颗粒细胞生理功能未见报道。为此,本试验以该基因变异对绵羊颗粒细胞生理功能的影响开展研究,为线粒体基因变异与颗粒细胞功能相关研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及样品采集

绵羊卵巢材料来源于河北省保定市唐县屠宰场。屠宰后取卵巢组织用温生理盐水冲洗后,置于含有 1% 双抗和 37 °C 生理盐水的保温壶中,在 4 h 内送至实验室。

1.1.2 主要试剂与耗材

组织基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;Annexin V-FITC 双染细胞凋亡检测试剂盒,江苏凯基生物技术股份有限公司;2×*Taq* PCR Master Mix,北京博迈德基因技术有限公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司;线粒体分离试剂盒,AngleGene 公司;BCA 蛋白定量试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 引物设计

参考 NCBI 中 GenBank 绵羊线粒体基因组序列 (AF010406.1),利用 Primer Premier 6 设计覆盖绵羊线粒体 *tRNA-Lys* 序列引物,该引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。上游引物序列为:5'-CTACGGTCAATGCTCAGAA-3';下游引物序列为:5'-GTTGTGCTAGAAGTTGTGTT-3'。引物扩增产物大小为 290 bp。

1.2 试验方法

1.2.1 卵巢组织提取 DNA

按照组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行

DNA 提取,通过紫外分光光度计测定 DNA 样品在 260 nm、280 nm 处的 OD 值,计算 DNA 含量和 OD_{260}/OD_{280} 的比值,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 PCR 测序鉴定基因型

以绵羊卵巢组织为模板 DNA,PCR 扩增反应体系 (25 μL): Mix 10 μL,上游引物 0.4 μL,下游引物 0.4 μL,ddH₂O 13.2 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,电泳电压设为 100 V,电流 100 mA,时间 30 min,观察胶带亮度及长度。将 PCR 产物进行测序,分析鉴定基因型。测序结果通过 DNAMAN 软件对其数据进行拼接,运用 Oligo 7 Primer Analysis Software 将试验绵羊序列与绵羊线粒体基因组标准序列 (GenBank: AF010406.1) 比对分析。

1.2.3 颗粒细胞的分离培养

选取 G、T 基因型母羊,采集双侧卵巢并使用生理盐水、75% 酒精清洗,放于含有 1% 双抗和 37 °C 生理盐水的保温壶中,在 4 h 内送至实验室。取出卵巢,用生理盐水清洗数次直至液体清澈,洗净后剪去系膜,75% 酒精冲洗 1 次,再放入盛有生理盐水的烧杯中,反复清洗 3 次;用镊子夹取刀片,在细胞培养基中把卵巢的适当大小卵泡进行切割;将上述液体全部移入 15 mL 无菌离心管中,离心机参数设置为 2 000 r/min,定时离心 5 min,弃上清液,加入 2 mL PBS 吹打悬浮,2 000 r/min 定时离心 5 min,弃上清液,重复 2~3 次,加入 10% 胎牛血清、1% 双抗和 DMEM 细胞培养基,吹打悬浮细胞,在 37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后观察细胞贴壁情况。

1.2.4 颗粒细胞凋亡检测

使用 Annexin V-FITC 双染细胞凋亡检测试剂盒进行检测,反应结束后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 颗粒细胞分裂和融合相关蛋白表达水平检测

使用线粒体分离试剂盒进行线粒体分离,参考 BCA 蛋白定量试剂盒中的说明书,对所制取的蛋白进行定量测量。使用参考文献 [11] 中的 Western blot 方法检测颗粒细胞内线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 和分裂相关蛋白 Drp1、MFF 的表达水平。其中一抗、二抗杂交稀释信息如表 1、2 所示。采用 BandScan 5.0 软件分析。

1.3 数据统计分析

利用 GraphPad Prism 软件进行方差分析,结果以“平均数±标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表1 融合分裂相关蛋白表达水平检测一抗信息

一抗名称	品牌 (货号)	稀释度	分子量/kDa
Drp1	Abcam (ab184247)	1 : 1 000	83
MFF	Abcam (ab241597)	1 : 1 000	38
Mfn1	Abcam (ab221661)	1 : 1 000	84
Mfn2	Abcam (ab124773)	1 : 1 000	86
β-actin	Abcam (ab8226)	1 : 1 000	43

表2 融合分裂相关蛋白表达水平检测二抗信息

二抗名称	品牌 (货号)	稀释度
羊抗鼠 IgG (H+L)	Thermo Pierce (31160)	1 : 5 000
羊抗兔 IgG (H+L)	Thermo Pierce (31210)	1 : 5 000

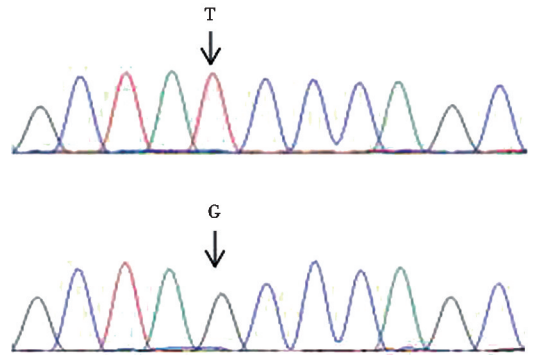


图1 *tRNA-Lys* 基因变异位点测序峰图

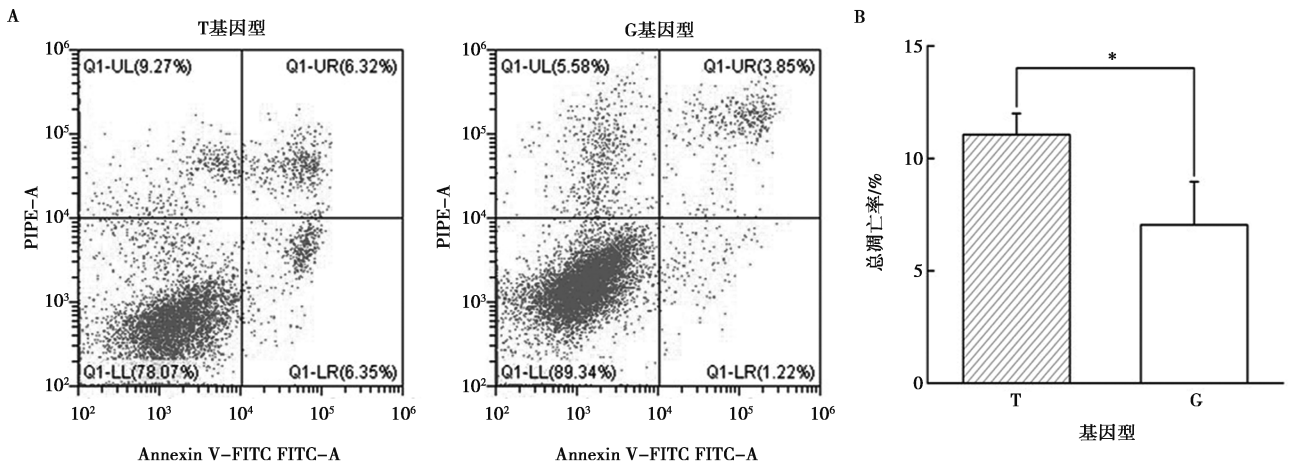
2 结果

2.1 PCR 扩增产物的测序

PCR 扩增产物的测序表明线粒体 *tRNA-Lys* 基因编码区 7 719 位点存在 T→G 变异 (图 1)。

2.2 卵泡颗粒细胞凋亡

将相同处理后的不同基因型的颗粒细胞在相同条件下培养后, 检测凋亡情况, 结果表明: G 基因型凋亡率和 T 基因型凋亡率相比显著降低 ($P < 0.05$), G 基因型细胞凋亡率为 T 基因型的 60% (图 2)。可见线粒体 *tRNA-Lys* (T7719G) 变异对卵泡颗粒细胞具有明显抑制凋亡的作用。



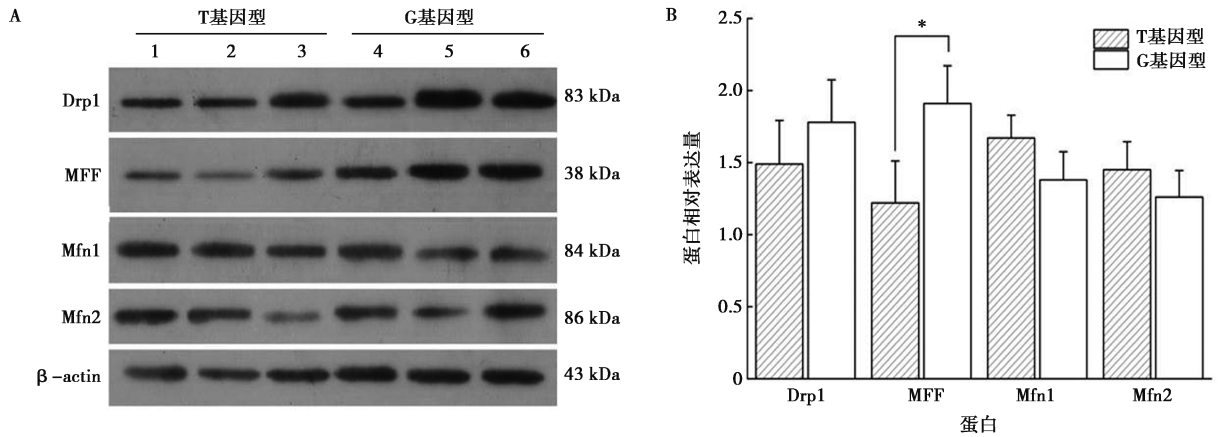
A. 不同基因型使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况; B. 不同基因型颗粒细胞总凋亡率。* 表示 $P < 0.05$, 下同。

图2 线粒体 *tRNA-Lys* 变异对颗粒细胞凋亡的影响

2.3 线粒体融合分裂相关蛋白表达量

鉴定绵羊基因型, 提取不同基因型颗粒细胞总蛋白, 用 Western blot 方法检测融合分裂相关蛋白相对表达量。结果表明 (图 3), 不同基因型颗粒细胞

Drp1、Mfn1、Mfn2 相对表达量差异均不显著 ($P > 0.05$), G 基因型细胞 MFF 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。



A. 聚丙烯酰胺凝胶电泳; B. 定量分析。

图3 线粒体 *tRNA-Lys* 变异对颗粒细胞分裂和融合相关蛋白表达水平变化

3 讨论

细胞凋亡是经过严格调控的一种细胞程序性死亡方式,其过程涉及一系列生化反应。线粒体凋亡途径被认为是细胞死亡的主要模式,在细胞发育过程中扮演着重要的角色。在各种凋亡信号的刺激下,细胞内活性氧(ROS)水平升高,导致线粒体膜电位降低,膜通透性增加,细胞色素C从线粒体中释放出来形成凋亡体复合物。随后激活caspase家族中介导凋亡的caspase-9,活化的caspase-9进一步切割并激活凋亡执行蛋白caspase-3,进而促进线粒体的凋亡^[12]。线粒体功能障碍会导致ROS增加,形成恶性循环。高水平的ROS可以损伤细胞内的DNA、蛋白质和脂质等分子,导致细胞死亡。因此,线粒体的功能维持对于细胞生存至关重要。颗粒细胞在卵泡发育和成熟过程中扮演着重要角色,其在调节和选择原始卵泡池中的卵子与维持正常的卵泡闭锁机制中发挥重要作用^[13]。在卵泡发育的过程中,颗粒细胞数量会逐渐增加,并对卵母细胞发挥着重要的调节作用。当颗粒细胞受到外界或内部信号的刺激,或者受到自身功能异常的影响时,会发生凋亡现象,从而对卵母细胞产生负面影响,导致卵泡闭锁。因此,颗粒细胞凋亡不仅是卵泡发育和成熟过程中的正常调节机制,也可能是卵泡闭锁的重要原因之一^[14]。本试验研究比较了不同基因型颗粒细胞的凋亡率,结果表明G基因型变异对卵泡颗粒细胞有明显抑制凋亡作用,线粒体*tRNA-Lys*(T7719G)基因变异可以促进细胞增殖。

线粒体不断进行分裂和融合,在分裂和分化过程中,环境变化的适应程度对细胞的生存及生长非常重要。当线粒体受到损伤时,会通过一系列蛋白质的产生、组合,进而形成自噬体,此后与溶酶体进行结

合,最终移除受损线粒体^[15]。线粒体形态学的变化是线粒体功能损伤的表现,并与多种疾病相关^[16]。Drp1参与两种功能和机械上完全不同的裂变,一种是外周分裂,使受损的物质脱落成更小的线粒体,从而进行线粒体的自噬,当线粒体自噬机制产生障碍,将导致线粒体系统功能下降或线粒体数量冗余,进而对细胞稳态产生影响并导致生物体发生相关疾病;另一种是中间区分裂,导致线粒体增殖^[17]。位于线粒体内膜的MFF作为Drp1的受体,控制中间区分裂,在分裂过程中将Drp1聚集到线粒体,从而影响线粒体分裂^[18]。对MFF下游蛋白Drp1的检测结果显示,不同基因型样本间差异不显著,可能是因为Drp1不存在实质性蛋白表达的增加。

人们对自噬进行大量研究,并将其视为非选择性降解蛋白质及细胞器的重要细胞途径之一。除非选择性的自噬细胞途径之外,选择性的自噬活动在清除特定的细胞器方面也发挥了十分重要的作用,如细胞线粒体自噬、内质网自噬、核糖体自噬、溶酶体自噬等^[19]。线粒体自噬的发生,是对线粒体功能障碍或损伤进行高度保守降解与清除的过程,同样是线粒体应激反应与稳态调控的一个重要机制^[20]。当线粒体自噬机制受阻,可导致线粒体功能降低或线粒体冗余从而影响细胞稳态,引起相关疾病^[21-22]。目前认为线粒体的融合和分裂在线粒体自噬过程中发挥着重要作用。已有研究指出MFF的激活与线粒体分裂密切相关,是其重要调节机制^[23]。本试验发现融合相关蛋白Mfn1和Mfn2表达量在G、T基因型样本间无显著差异,而分裂因子MFF蛋白量在G基因型样本中显著增高,MFF蛋白量的降低可能是由基因自身蛋白表达缺陷造成的,也可能是因为T基因型变异导致线粒体内膜损伤,MFF代谢发生异常。肖敏^[24]研

究发现 MFF 的表达上调导致线粒体裂变增加, 分裂加剧可以产生细胞生长和细胞增殖所必需的细胞器, 同时通过线粒体自噬促进受损线粒体的消除。然而, 如果线粒体自噬机制受阻, 线粒体的功能会受到影响, 可能会导致相关疾病的发生。研究发现冠心病相关的线粒体 *tRNA-Thr* 变异 (G15927A) 会引起细胞线粒体自噬增加和分裂障碍, 线粒体分裂因子 MFF 在变异的细胞中均有显著降低^[25]。

4 结论

线粒体 *tRNA-Lys* (T7719G) 变异对绵羊卵泡颗粒细胞有明显抑制凋亡作用, 显著提高分裂相关蛋白 MFF 表达水平, 促进细胞分裂。

参考文献:

[1] AGUIAR F L N, GASTAL G D A, ALVES K A, et al. Supportive techniques to investigate *in vitro* culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: a review [J]. *Theriogenology*, 2020, 156: 296-309.

[2] 郗红燕, 张杨, 赵小萱, 等. 卵巢早衰病理机制最新研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21 (12): 103-106.

[3] 张颖, 李先强, 李亚娜, 等. 颗粒细胞凋亡影响家禽卵泡闭锁的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (12): 4725-4733.

[4] ZHU Y, WANG H, WANG J, et al. Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chicken granulosa cells by PI3K-AKT-mTOR and MAPK signaling pathways [J]. *Toxins*, 2021, 13 (3): 199.

[5] LESNEFSKY E J, CHEN Q, TANDLER B, et al. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57 (1): 535-565.

[6] TAN X, CHEN Y F, ZOU S Y, et al. ALDH2 attenuates ischemia and reperfusion injury through regulation of mitochondrial fusion and fission by PI3K/AKT/mTOR pathway in diabetic cardiomyopathy [J]. *Free Radical Bio Med*, 2022, 195: 219-230.

[7] WANG Y, ZHAO J, LIU X, et al. Identification of SNPs and copy number variations in mitochondrial genes related to the reproductive capacity of the cultured Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica*) [J]. *Anim Reprod Sci*, 2019, 205: 78-87.

[8] KYUNGA K, SHLOMIT K, ANDREA J, et al. The role of mitochondria in oocyte and early embryo health [J]. *OBM Genetics*, 2019, 3 (1): 1-29.

[9] 曹亚男, 郝建秀, 张雯珂, 等. 线粒体 DNA 与早期胚胎发育的研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2016, 35 (4): 313-316.

[10] CHEN X Y, WANG D, XIANG H, et al. Mitochondrial DNA T7719G in *tRNA-Lys* gene affects litter size in Small-tailed Han sheep [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8 (3): 568-573.

[11] 韩红叶. CTSB 基因对绵羊卵巢颗粒细胞功能的影响 [D]. 保定: 河北农业大学, 2021.

[12] DE POL A, VACCINA F, FORABOSCO A, et al. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12 (10): 2235-2241.

[13] GONG Y, LUO S, FAN P, et al. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome [J]. *J Endocrinol Reprod*, 2020, 18 (1): 121.

[14] BUDIHARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-290.

[15] 丁铁群, 李喜功, 潘文明, 等. 脊髓损伤中线粒体自噬的作用及进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (35): 5727-5733.

[16] 殷玉, 许志亮, 刘刚. 线粒体自噬在纤维化疾病中作用的研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2022, 36 (1): 102-105.

[17] JAVIER P, CARLOS J G, MARIAN L, et al. c-MYC triggers lipid remodelling during early somatic cell reprogramming to pluripotency. [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17 (6): 2245-2261.

[18] CHU K, ZHANG Z H, CHU Y, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates lipopolysaccharide-induced pyroptosis in human periodontal ligament cells via inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission [J]. *Arch Oral Biol*, 2023, 147: 105632.

[19] GOLDSMITH J, HOLZBAUR F L E. Proteomic profiling shows mitochondrial nucleoids are autophagy cargo in neurons: implications for neuron maintenance and neurodegenerative disease [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (8): 2003-2005.

[20] KLEELE T, REY T, WINTER J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis [J]. *Nature*, 2021, 593 (7859): 435-439.

[21] 郑小惠, 刘坤, 辛航阔, 等. 线粒体自噬在神经退行性疾病中调控的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50 (2): 490-499.

[22] 程文静, 李鹏, 陈文婕, 等. 针刺对抑郁大鼠海马 PINK1-Parkin 信号通路介导线粒体自噬表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38 (1): 361-366.

[23] SHENG J, LI H, DAI Q, et al. NR4A1 promotes diabetic nephropathy by activating MFF-mediated mitochondrial fission and suppressing Parkin-mediated mitophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48 (4): 1675-1693.

[24] 肖敏. 线粒体裂变因子 MFF 在糖尿病肾病足细胞损伤中的作用 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.

[25] 贾子冬. 冠心病相关线粒体 *tRNA-Thr* 15927G>A 变异致病机制的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.