



陈培勇,蔡玉,杨花,等. 神经营养因子受体 *Trkb* 对湖羊垂体细胞增殖及促性腺激素分泌的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):166-173.

CHEN Peiyong, CAI Yu, YANG Hua, et al. Effects of neurotrophic factor receptor *Trkb* on pituitary cell proliferation and gonadotropin secretion of Hu sheep[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 166-173.

神经营养因子受体 *Trkb* 对湖羊垂体细胞增殖及促性腺激素分泌的影响

陈培勇,蔡玉,杨花,徐辉,王锋,张艳丽*

(南京农业大学动物科技学院羊业科学研究所,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本研究旨在探究神经营养因子酪氨酸激酶 B 受体(*Trkb*)基因对湖羊垂体促性腺激素分泌的影响。[方法]利用 qPCR 方法对 *Trkb* 进行组织表达谱分析;构建 *Trkb* 过表达载体并转染至湖羊垂体细胞,利用 qPCR、Western blot、EdU 以及 ELISA 等技术检测过表达 *Trkb* 对垂体细胞增殖及促性腺激素分泌的影响。[结果]*Trkb* 在湖羊心、肝、脾、肺、肾以及下丘脑和垂体等各个组织中均有表达,但在垂体中表达水平显著高于其他组织($P<0.05$)。*Trkb* 在湖羊垂体组织不同发育阶段差异表达,其中在 6 月龄垂体组织中高表达($P<0.05$),在 5 日龄和 3 月龄表达水平较低。与对照组相比,过表达 *Trkb* 基因显著促进了垂体细胞增殖率($P<0.05$),增殖标记基因 *Pcna* 表达水平与 *Bcl2/Bax* 比值均显著提高($P<0.05$)。此外,过表达 *Trkb* 显著提高了促性腺激素相关基因 *Fsh β* 和 *Lh β* 的表达水平,促进了垂体细胞促卵泡素(FSH)分泌($P<0.05$)。[结论]过表达 *Trkb* 能够显著促进湖羊垂体细胞增殖,降低细胞凋亡水平从而显著提高促性腺激素的分泌水平。本研究初步验证 *Trkb* 基因在湖羊垂体细胞中功能,为深入研究 *Trkb* 调控垂体功能的分子机制提供了试验依据。

关键词:湖羊;垂体;酪氨酸激酶 B 受体(*Trkb*);细胞增殖;促性腺激素

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0166-08

Effects of neurotrophic factor receptor *Trkb* on pituitary cell proliferation and gonadotropin secretion of Hu sheep

CHEN Peiyong, CAI Yu, YANG Hua, XU Hui, WANG Feng, ZHANG Yanli*

(Institute of Sheep and Goat Science, College of Animal Science and Technology,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives]The study aimed to investigate the neurotrophic factor tyrosine kinase B receptor(*Trkb*) gene effects on the pituitary gonadotropin secretion of Hu sheep. [Methods]Tissue expression profiling of *Trkb* was performed using qPCR. The overexpression vector of *Trkb* was constructed and transfected into Hu sheep pituitary cells. The effects of overexpression of *Trkb* on pituitary cell proliferation and gonadotropin secretion were detected by qPCR, Western blot, EdU and ELISA. [Results]*Trkb* was expressed in the heart, liver, spleen, lung, kidney, hypothalamus, pituitary and other tissues of Hu sheep, but the expression level in the pituitary was significantly higher than that in other tissues($P<0.05$). *Trkb* was differentially expressed in pituitary tissues of Hu sheep at different developmental stages, and was highly expressed in pituitary tissues at 6 months of age($P<0.05$), and the expression level was lower at 5 days and 3 months of age. Compared with the control group, overexpression of *Trkb* gene significantly promoted pituitary cell proliferation rate($P<0.05$), and the expression levels of proliferation marker gene *Pcna* and *Bcl2/Bax* ratio significantly increased ($P<0.05$). In addition, overexpression of *Trkb* significantly increased the expression levels of gonadotropin-related genes *Fsh β* and *Lh β* , and significantly promoted the secretion levels of follicle stimulating hormone (FSH) in pituitary cells ($P<0.05$). [Conclusions]Overexpression of *Trkb* could significantly promote cell proliferation efficiency of pituitary cells, decrease the level of cell apoptosis, and thus significantly increase the secretion of gonadotropin in Hu sheep. This study preliminarily verified the function of *Trkb* in Hu sheep pituitary cells and provided a experimental basis for further study of the molecular mechanism of *Trkb* regulating pituitary function.

Keywords:Hu sheep; pituitary; tyrosine kinase B receptor(*Trkb*); cell proliferation; gonadotropin

酪氨酸激酶 B 受体(tyrosine kinase B receptor, *Trkb*)是神经营养因子家族的一种高亲和力和受体。*Trkb* 可以通过与其配体脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)结合,参与促进神经元的

收稿日期:2023-01-21

基金项目:国家自然科学基金项目(32072737);江苏现代农业(肉羊)产业体系项目(060/61KA210031)

*通信作者:张艳丽,教授,主要从事动物繁殖与胚胎工程研究, E-mail: zhangyanli@njau.edu.cn。

生长刺激、增殖和分化以及调节突触可塑性^[1-3]。研究表明,*Trkb* 及 *Bdnf* 除了在神经组织内表达外,在包括生殖系统在内的各种非神经组织中也有广泛表达,并发挥生理调控作用^[4-5]。研究发现,*Trkb* 在新生大鼠卵巢中原始卵泡中有表达,该结果提示 *Trkb* 可能参与卵泡生长或调节卵泡组装^[6]。*Trkb* 敲除小鼠的颗粒细胞增殖水平降低,卵泡组织明显丢失,并且伴随着大量的卵母细胞死亡^[7]。这些结果均表明 *Trkb* 对卵泡发生和排卵发生的重要性。值得注意的是,在卵巢功能早衰小鼠模型中激活 TRKB 信号能够逆转卵泡损失并恢复卵母细胞数量,提高卵巢功能早衰小鼠的生育能力^[8]。除此之外,激活 TRKB 信号能够使促性腺激素分泌恢复正常^[8]。研究发现,BDNF/TRKB 信号系统通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路 (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 调控牛颗粒细胞增殖和孕激素合成^[9]。此外,研究发现 BDNF/TRKB 信号系统表达于胎盘内合胞体滋养层和滋养细胞中,并通过增加胎盘滋养层细胞生长和存活促进胎盘发育,进而促进胎儿生长^[10-11]。*Trkb* 在雄性生殖中也发挥重要作用,前期有研究发现 *Trkb* 参与调控牛精子线粒体活性和精子凋亡,进而影响其生存能力^[12]。此外,*Trkb* 的基因多态性分析表明,该基因与绵羊产羔数相关^[13]。上述研究结果均表明,*Trkb* 在动物生殖调控中发挥重要作用。目前,关于 *Trkb* 功能研究大部分集中于卵巢颗粒细胞发育,在垂体内的调控功能尚不清楚。

垂体是哺乳动物体内重要的内分泌器官,能够通过响应下丘脑调控各种激素分泌调控应激、生长以及繁殖等各种生理功能,该器官在生殖轴调控中具有重要作用^[14-15]。垂体可以通过分泌促卵泡素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和促黄体素 (luteinizing hormone, LH) 2 种关键促性腺激素直接调控靶性腺发育和生殖活动^[16]。在雄性中,FSH 能够与睾丸支持细胞上相应受体结合从而影响精子发生,而 LH 通过刺激睾丸间质细胞促进雄激素分泌^[17-19]。在雌性中,FSH 通过刺激颗粒细胞促进卵子发生,而发情中期的 LH 峰可以触发排卵^[20-21]。最近研究表明,*Trkb* 参与调控绵羊外周血中促性腺激素浓度,推测 *Trkb* 可能调控绵羊垂体细胞状态从而影响促性腺激素分泌^[22],但尚未开展进一步的研究。

湖羊以高繁殖力著称,是国家级绵羊资源保护品种,具有繁殖力高、四季发情、生长发育快等多种优点^[23]。探究其垂体机能与调控机制对提高湖羊繁殖力有重要参考意义。据此,试验探究 *Trkb* 组织表达差异,以湖羊垂体细胞为研究对象,探究 *Trkb* 对垂体细胞增殖及促性腺激素分泌的影响,旨在为研究 *Trkb* 调控湖羊垂体分泌促性腺激素提供重要理论参考。

1 材料与方法

1.1 湖羊不同部位组织采集以及垂体细胞分离

于江苏省启东市瑞鹏牧业有限公司选取不同生长阶段的母羊:出生(1D)、5日龄(5D)、3月龄(3M)、6月龄(6M)和2岁龄(2Y)湖羊。分别选取不同生长阶段的湖羊3只,通过颈静脉放血方式处死后立即屠宰,采集心、肝、脾、肺、肾、下丘脑、垂体等组织存放于2 mL冻存管中,快速放入液氮中冻存,带回实验室,放在-80℃超低温冰箱中保存。此外,采集6M湖羊垂体并用预冷杜氏磷酸缓冲液(DPBS)冲洗3次后置于DMEM/F12(Gibico)培养液中用于垂体细胞分离。

采用 Zheng 等^[24]的方法分离垂体细胞。在超净台中用手术镊剥离垂体组织中薄膜和上皮组织,分别使用 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 IV 型胶原酶和 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰酶(含 EDTA)在 37℃ 条件下依次消化 15 min,以去除成纤维细胞并解离组织中垂体细胞。分离出的垂体原代细胞接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青、链霉素 $100\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 DMEM/F12 培养基中,置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。后续使用腺垂体标记蛋白(FSH 和 LH)对分离的垂体细胞进行鉴定。

1.2 构建过表达质粒

使用 *Trkb*-CDS 引物(表 1)进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳纯化回收目的产物。使用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 限制性核酸内切酶在 37℃ 条件下酶切 30 min,切胶后纯化。将纯化产物用 T₄DNA 连接酶连接至 pcDNA3.1(+)真核表达质粒,然后转入大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞,等待菌落长出。利用载体通用引物 T7-bgh 对菌液进行 PCR 扩增及测序,确保插入序列片段正确,然后进行质粒抽提并命名重组质粒为 pcDNA-*Trkb*。

1.3 总 RNA 提取、反转录及 qPCR

采用 Trizol 法(Invitrogen)提取湖羊各组织及垂体细胞的总 RNA,按照反转录试剂盒(Vazyme)说明书操作合成 cDNA。利用 NCBI 在线网站设计 *Trkb*、卵泡刺激素 β 亚基(follicle stimulating hormone subunit

beta, *Fshβ*)、促黄体素 β 亚基 (luteinizing hormone beta, *Lhβ*)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, *Pcna*)、B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B-cell CLL/lymphoma 2, *Bcl2*)、BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2 associated X, *Bax*) 以及肌动蛋白 (actin beta, *Actb*) 基因的引物 (表 1), 由擎科生物合成引物。以反转录的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 检测各目标基因相对表达量。荧光定量检测体系为 20 μL: SYBR Green Master 10 μL, 上、下游引物各 0.6 μL, cDNA 1 μL, 补充 ddH₂O 至 20 μL。根据荧光定量试剂盒说明书 (全式金) 设置反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 10 min。试验结果利用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算各目的基因相对表达量。

表 1 qPCR 相应目的基因的引物序列

Table 1 qPCR primer sequence of corresponding target gene

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物大小/bp Product size
<i>Trkb-CDS</i>	ATGTCGCTCTGGACCAGGTG/CTACCTAGAATATCCAGGTAGACTGGA	2 514
<i>Actb</i>	CGCAAGTACTCCGTGTGGAT/TAACGCAGCTAACAGTCCGC	146
<i>Trkb</i>	GTTACAGCACATCAAGCGACACAAC/GGCATCCTTCAGCGTCTTCACAG	144
<i>Fshβ</i>	GCTATTGCTACACCCGGGAC/AGTGGCTACTGGGTACGTGT	152
<i>Lhβ</i>	GCGTGGACCAATGGTCTCTTTC/ACAGGCCAAGGGTTGGTTCTG	107
<i>Bax</i>	TGGGTGAGTGGCTGAAGAGC/AACTCCCATGGCCCCCAAT	228
<i>Bcl2</i>	CCTTTCGTTGCTCGTGCTC/ACCTCCTCCGTGATGTGGTAT	273
<i>Pcna</i>	CCTTGGTGCAGCTAACCCCTT/GCCAAGGTGTCCGCATTATC	163

1.4 垂体细胞转染试验

当 6 孔板中细胞密度处于 50%~70% 时, 对照组转染空载质粒 pcDNA-3.1, 试验组转染 *Trkb* 质粒: 取 2.5 μL 空载质粒 pcDNA-3.1 和 pcDNA-*Trkb* 质粒, 分别与 5 μL P3000 混合于 125 μL Opti-MEM 中构成组分 1; 另取 6.5 μL Lipofectamine 3000 转染试剂混合于 125 μL Opti-MEM 中构成组分 2, 静置 5 min 后将 2 组分混匀并静置 10 min。弃去 6 孔板中原有培养液, 用 DPBS 润洗 1 次细胞后, 添加上述混合液, 最后用含有 10% 胎牛血清的培养液补至 2 mL。处理 48 h 后收集细胞总 RNA、细胞蛋白及上清液分别用于后续 qPCR、蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测。

1.5 ELISA 检测促性腺激素含量

根据绵羊 FSH、LH 相应的 ELISA 检测试剂盒说明书 (卡迈舒) 检测转染 48 h 后对照组和试验组细胞上清液中 FSH 和 LH 含量。

1.6 Western blot 检测

按照细胞蛋白说明书用 RIPA 蛋白裂解液提取垂体细胞蛋白, 用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (Beyotime) 测定蛋白浓度。蛋白原液与蛋白变性试剂混合, 在 70 °C 下煮沸 10 min 以变性。变性后蛋白在 160 V 条件下电泳 42 min, 在 120 V 条件下转膜 55 min, 用 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉室温封闭 2.5 h。在 4 °C 条件下孵育一抗过夜 (TRKB 抗体购自 Abcolonal; FSH 抗体购自 Abcam, LH 和 PCNA 抗体购自 Affinity; BAX、BCL2 和 ACTB 抗体购自 Proteintech)。次日, TBST 洗涤蛋白条带 5 次, 每次 7 min。使用 HRP 标记山羊抗兔 IgG (Proteintech) 室温孵育 2 h。最后用 ECL 显影液拍照, 使用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.7 EdU 检测转染后垂体细胞增殖

使用 EdU 细胞增殖试剂盒 (Beyotime) 检测垂体细胞增殖率。将垂体细胞接种于 24 孔板中, 待细胞密度达到 50%~60% 进行转染, 对照组加入空载体, 试验组加入 *Trkb* 过表达质粒。在转染 24 h 后用 EdU 工作液孵育 2 h, 然后按照 EdU 试剂盒说明书进行操作, 最后在激光共聚焦显微镜下拍照, 使用 ImageJ 软件统计并分析细胞增殖情况。

1.8 细胞免疫荧光 (IF) 检测

将垂体细胞平铺至 24 孔培养板中, 待细胞密度达到 70%~80% 时用 4% 多聚甲醛 (PFA) 在室温条件下固定 10 min, 再用 DPBS 洗涤 3 次; 用 Triton X-100 通透 15 min, DPBS 清洗 3 次后用 3 g·L⁻¹ 胎牛血清在室温条件下固定 90 min, 分别孵育 TRKB 和 FSH 一抗过夜; 次日用 DPBS 洗涤 3 次后在避光条件下孵育兔二抗 1 h, 使用共聚焦显微镜拍照。

1.9 数据处理与统计分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行独立样本 *t* 测验和 Duncan's 多重检验, 每个试验至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 8 绘图。数据以平均值±标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。

2 结果与分析

2.1 *Trkb* 在湖羊组织中的差异表达分析

组织表达分析结果表明, *Trkb* mRNA 在湖羊心脏、肝、脾、肺、肾、下丘脑、垂体等组织中均有表达, 在垂体中具有较高的表达水平, 且显著高于其他组织 ($P < 0.05$, 图 1-A)。此外, *Trkb* 基因在垂体组织不同发育阶段差异表达, 其中在 6M 的垂体组织中高表达, 在 5D 和 3M 的垂体组织中表达水平较低 ($P < 0.05$, 图 1-B)。

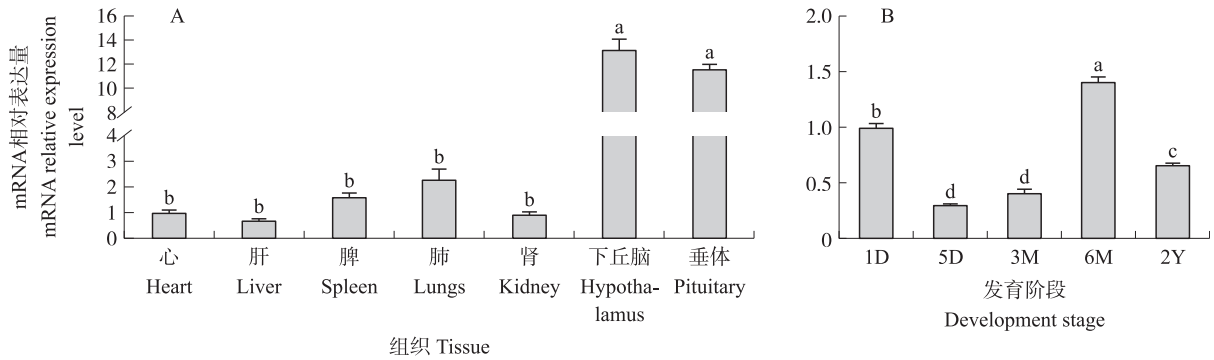


图 1 *Trkb* 在湖羊不同组织 (A) 及不同发育阶段垂体 (B) 中的表达水平

Fig. 1 Expression levels of *Trkb* in different tissues (A) and pituitary at different developmental stages (B) of Hu sheep

1) 1D: 1 日龄 1-day-old; 5D: 5 日龄 5-day-old; 3M: 3 月龄 3-month-old; 6M: 6 月龄 6-month-old; 2Y: 2 周岁 2-year-old.
2) 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$) .

2.2 垂体细胞鉴定和 TRKB 表达

将分离得到的湖羊原代垂体细胞培养于培养皿中, 在显微镜下观察发现细胞形态呈梭形 (图 2-A)。利用细胞免疫荧光技术对体外分离的湖羊原代垂体细胞进行鉴定, 结果显示垂体标记蛋白 FSH 在大多数

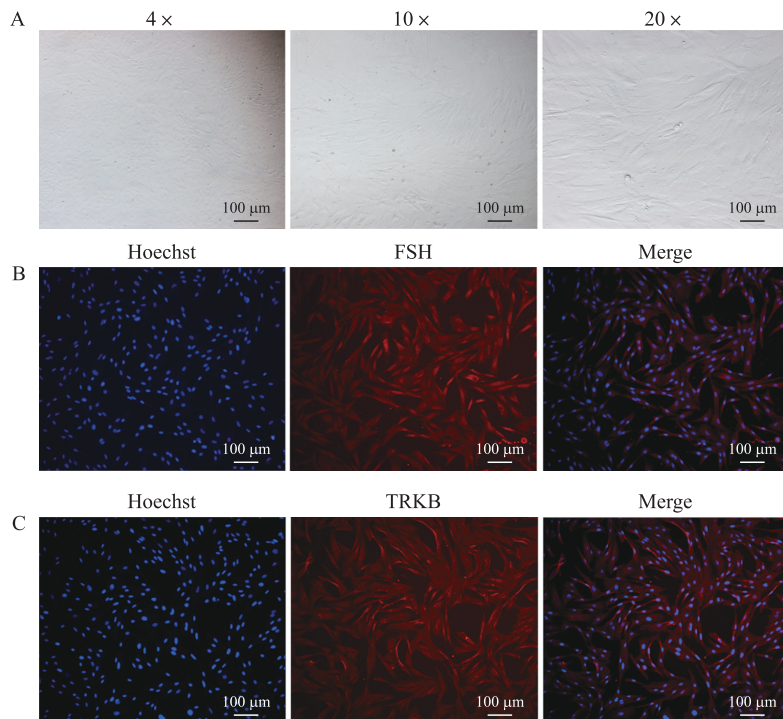


图 2 免疫荧光鉴定湖羊垂体细胞及 TRKB 表达定位

Fig. 2 Identification of pituitary cells by immunofluorescence stain and TRKB expression location of Hu sheep

A. 显微镜下垂体细胞形态 Morphology of Hu sheep pituitary cells under microscope; B. FSH 荧光染色 FSH fluorescence staining; C. TRKB 荧光染色 TRKB fluorescence staining.

4×、10×和 20×分别代表 4 倍、10 倍和 20 倍物镜倍数; Hoechst 表示细胞核染色 (蓝色)。4×、10× 和 20× represent 4, 10 and 20 objective multiples, respectively; Hoechst means staining the nucleus with blue.

细胞中均有表达(图2-B)。目的蛋白TRKB在垂体细胞中也有表达,并主要表达在细胞质中(图2-C)。

2.3 *Trkb* 过表达载体构建及过表达效率验证

如图3所示:对湖羊 *Trkb* 基因构建的过表达质粒(pcDNA3.1-*Trkb*)进行鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果表明该质粒序列大小为2526 bp(图3-A)。对质粒进行测序,结果与GenBank中绵羊 *Trkb* 基因CDS序列相一致(图3-B)。上述结果说明成功构建了湖羊 *Trkb* 基因的过表达载体 pcDNA-*Trkb*。

对湖羊垂体细胞进行 *Trkb* 过表达质粒转染试验,在转染48 h后检测 *Trkb* 的 mRNA 和蛋白表达情况。图3-C、D结果表明:与对照组相比,转染 *Trkb* 过表达质粒后,垂体细胞中 *Trkb* 的 mRNA 和蛋白水平表达量均显著提高($P<0.05$)。

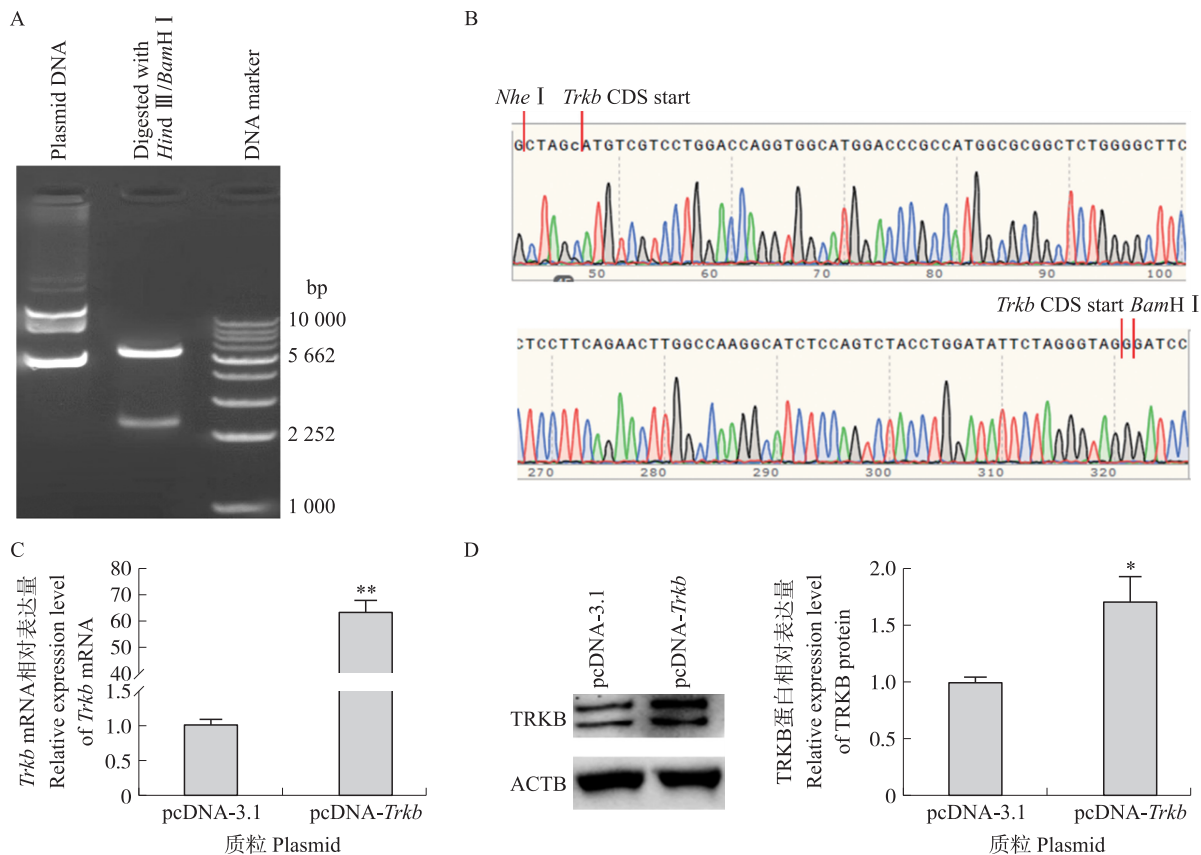


图3 pcDNA-*Trkb* 载体构建与过表达效率验证

Fig. 3 Construction of pcDNA-*Trkb* vector and verification of overexpression efficiency

A. 限制性内切酶消化 pcDNA-*Trkb* 后的电泳图谱 Electrophoretic map of pcDNA-*Trkb* after digestion by restriction endonuclease; B. *Bam*HI, *Nhe*I, *Trkb* CDS 启动子和终止子区域的序列 Sequence at *Bam*HI, *Nhe*I, *Trkb* CDS start and stop region; C、D. 转染 pcDNA-*Trkb* 质粒后 *Trkb* mRNA 和 TRKB 蛋白水平的表达 Expression of *Trkb* mRNA and TRKB protein level after transfection of pcDNA-*Trkb* plasmid. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same as follows.

2.4 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞增殖的影响

如图4所示:与对照组相比,过表达 *Trkb* 极显著提高了垂体细胞中 *Pcna* mRNA 的表达水平($P<0.01$,图4-A)。Western blot 检测结果表明,过表达 *Trkb* 极显著提高垂体细胞中 PCNA 蛋白表达量($P<0.01$,图4-B、C)。EdU 试验结果表明,过表达 *Trkb* 基因极显著提高了垂体细胞 EdU 阳性率($P<0.01$,图4-D、E)。上述结果表明,过表达 *Trkb* 可促进垂体细胞增殖。

2.5 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞凋亡的影响

如图5所示:与对照相比,过表达 *Trkb* 显著增加了 *Bcl2* 在转录水平的表达量($P<0.01$),并且显著提高了 *Bcl2*/*Bax* 比值($P<0.01$,图5-A)。在蛋白水平上,Western blot 试验结果表明,过表达 *Trkb* 极显著提高了 BCL2 的蛋白相对表达含量($P<0.01$,图5-B)。过表达 *Trkb* 组细胞中 BCL2/BAX 蛋白相对表达水平的比值极显著高于对照组($P<0.01$)。上述结果表明过表达 *Trkb* 可抑制垂体细胞凋亡。

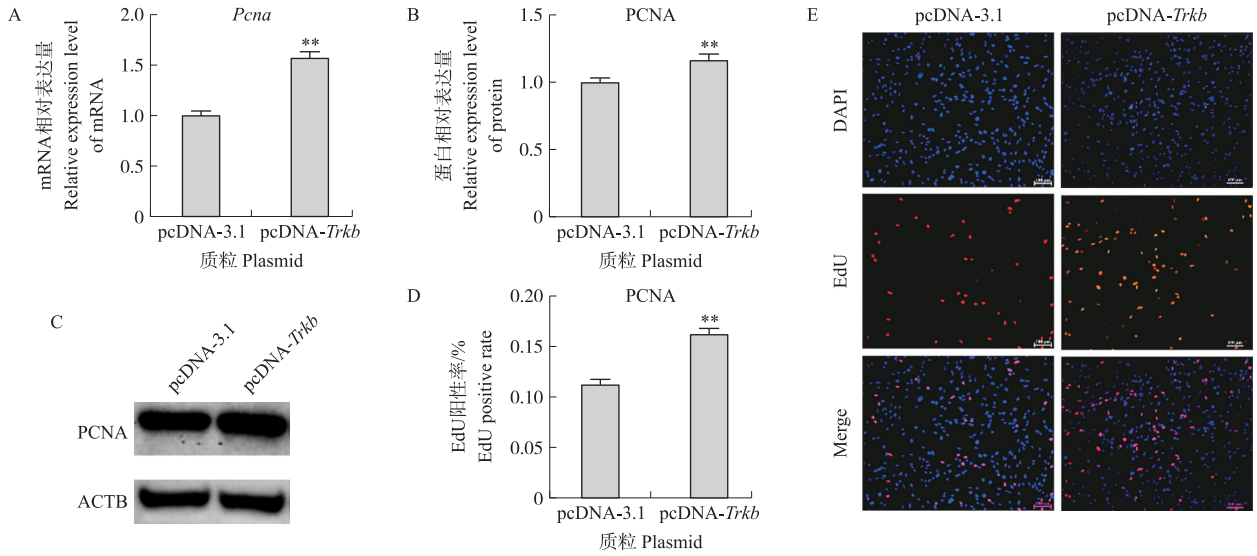


图 4 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of overexpression of *Trkb* on proliferation of Hu sheep pituitary cell

A. 增殖标记基因 *Pcn* mRNA 相对表达量 Relative expression level of proliferative marker gene *Pcn*; B、C. Western blot 检测增殖标记蛋白 PCNA 的表达量 Relative expression level of proliferation marker protein PCNA detected by Western blot; D、E. EdU 检测垂体细胞增殖效率 (蓝色是细胞核,红色是 EdU 阳性细胞,标尺为 100 μm) EdU is used to detect the proliferative efficiency of pituitary cells(The blue is the nucleus and the red is EdU-positive cells. The scale is 100 μm).

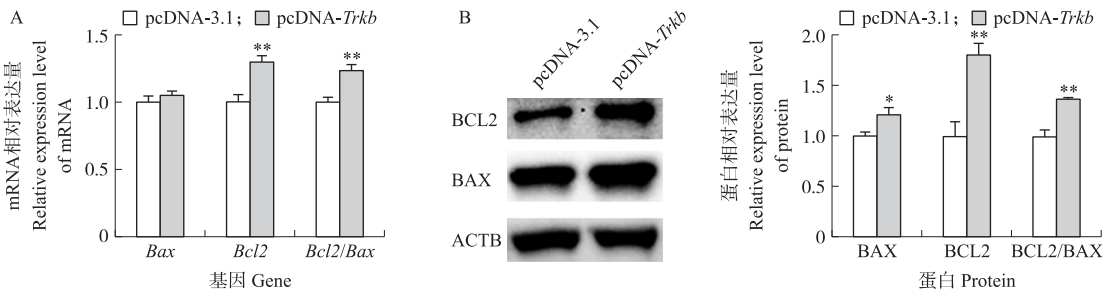


图 5 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of overexpression of *Trkb* on cell apoptosis of Hu sheep pituitary cell

A. 细胞凋亡相关基因 *Bax* 与 *Bcl2* 相对表达水平 Relative expression levels of apoptosis-related gene *Bax* and *Bcl2*; B. Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 BAX 与 BCL2 表达 Expression of apoptosis related protein BAX and BCL2 detected by Western blot.

2.6 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞促性腺激素分泌的影响

由图 6-A 可见:与对照组相比,转染 *Trkb* 过表达质粒极显著提高了 *Fsh β* 和 *Lh β* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。ELISA 检测结果表明,过表达 *Trkb* 后培养液中 FSH 含量极显著提高 ($P < 0.01$),促进垂体细胞

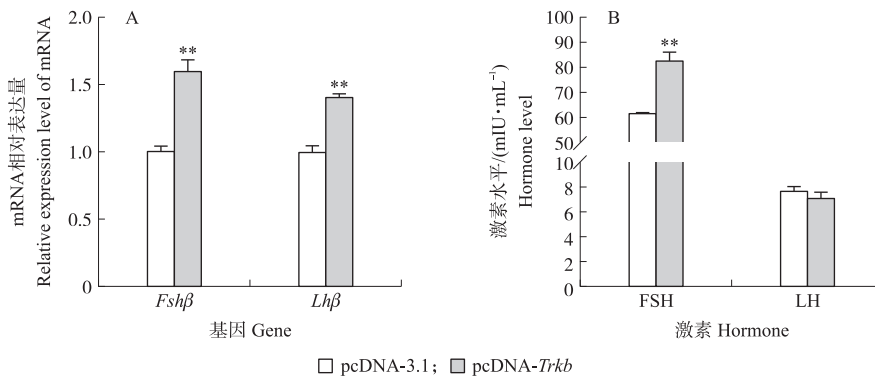


图 6 过表达 *Trkb* 对湖羊垂体细胞促性腺激素分泌的影响

Fig. 6 Effect of overexpression of *Trkb* on gonadotropin secretion of Hu sheep pituitary cells

A. 促性腺激素相关基因 *Fsh β* 和 *Lh β* 相对表达量 Relative expression levels of gonadotropin-related genes *Fsh β* and *Lh β* ; B. ELISA 检测促性腺激素 FSH 和 LH 分泌水平 The secretion levels of gonadotropin FSH and LH detected by ELISA.

分泌 FSH,但是对垂体细胞分泌 LH 没有显著影响(图 6-B)。上述结果表明过表达 *Trkb* 可刺激湖羊垂体细胞促性腺激素 FSH 的分泌。

3 讨论

湖羊是我国著名的高繁殖率绵羊品种,是研究繁殖育种与肉羊多胎机制的理想对象。垂体作为下丘脑-垂体-性腺轴的中枢器官,能够感受下丘脑状态调控各种激素分泌并作用于下游靶腺,从而发挥调控机体生长、繁殖以及新陈代谢等生理功能^[14]。因此,发掘湖羊垂体功能调控基因,探索湖羊垂体功能调控机制具有重要作用。目前,湖羊垂体功能基因的相关研究多集中于 BMP 家族及 TGF β 信号通路。本课题组前期测序结果表明,*Trkb* 基因在高繁殖力湖羊垂体中高度表达。本研究发现 *Trkb* 基因在湖羊不同组织中差异表达,在湖羊各组织中均有表达并且在垂体中高表达。此外,*Trkb* 在不同日龄阶段的湖羊垂体中差异表达。这些结果提示,*Trkb* 基因在湖羊垂体功能调控中发挥重要作用。因此,本试验以 *Trkb* 基因为研究对象,探究其潜在的调控功能,为探索湖羊垂体功能的调控机制提供理论支撑。

研究表明,*Trkb* 能够与上游特异性配体结合并磷酸化胞内酪氨酸残基,进而激活下游信号通路,改变基因表达,最终影响细胞增殖、分化等生理功能^[25]。前期在牛颗粒细胞中的研究表明,*Trkb* 能够介导 BDNF 激活下游 PI3K/AKT 通路,促进牛颗粒细胞增殖和细胞活性^[9]。此外,有研究表明 *Trkb* 能够与其高亲和力配体 BDNF 结合激活 ERK 通路促进子宫内膜 Ishikawa 细胞增殖^[26]。另有研究报道,*Trkb* 抑制剂 K252 能够阻断 BDNF 促进着床前胚胎由二细胞向囊胚阶段发育进程,降低细胞增殖,促进凋亡^[27]。此外,研究发现激活 BDNF/TRKB 信号系统能够引起 MAPK 和 PI3K 信号级联,抑制内质网应激,从而诱导猪子宫内膜上皮细胞的增殖,抑制其凋亡^[28]。上述研究结果均表明 *Trkb* 能够作为细胞信号通路关键环节调控生殖细胞增殖。本试验中,在湖羊垂体细胞中过表达 *Trkb* 基因后,湖羊垂体细胞增殖能力显著提高,并且细胞增殖标记基因 *Pcna* 在转录和蛋白水平表达量上调。此外,我们观察到过表达 *Trkb* 在转录和蛋白水平提高了 BCL2 蛋白表达水平以及 BCL2/BAX 比值,表明 *Trkb* 对湖羊垂体细胞具有抗凋亡的作用。

过表达 *Trkb* 对垂体细胞增殖的积极影响可能影响垂体细胞促性腺激素分泌水平,本研究进一步检测了过表达 *Trkb* 对促性腺激素分泌的影响。FSH 和 LH 是由垂体前叶分泌的促性腺激素,能够直接作用于下游靶腺来影响类固醇激素分泌,在哺乳动物的生殖发育中起着至关重要的作用。对牛卵丘-卵母细胞复合物的研究表明,FSH 能够促进 COC 中合成孕激素和雌激素。FSH 在促性腺激素中的浓度比例可能会影响机体性器官发育^[29]。此外,当 FSH 含量比例高于 LH 时,会导致卵巢发育受限^[30]。调节促性腺激素分泌的网络机制是十分复杂的。一方面,垂体接收下丘脑分泌的促性腺激素释放激素的刺激,调控 FSH 和 LH 分泌并作用于下游靶腺;另一方面,性腺分泌的性激素又负反馈作用于垂体,进而影响 FSH 和 LH 分泌。此外,某些营养因子和非编码 RNA 也能作用于垂体调控促性腺激素分泌。在绵羊垂体的研究表明,连续 3 d 脑室注射 BDNF 能够显著提高绵羊外周血中 FSH 浓度,这表明 BDNF/TRKB 可能参与调控绵羊垂体促性腺激素的合成与释放^[22]。本试验中,体外过表达 *Trkb* 提高了垂体细胞中促性腺激素相关基因表达,这与上述研究结果相似。ELISA 结果显示过表达 *Trkb* 显著提高 FSH 分泌水平,这进一步证实 *Trkb* 密切参与促性腺激素合成与分泌。

综上,本研究以湖羊垂体细胞为研究对象,通过体外过表达 *Trkb*,初步验证 *Trkb* 可通过影响细胞增殖和凋亡来调节湖羊垂体细胞促性腺激素的分泌,这为深入探究 *Trkb* 调控垂体功能的分子机制提供了理论基础。

致谢:江苏省羊业科学研究所的全体师生在本试验样品采集、技术支持以及论文写作等方面给予指导与帮助,以致谢意。

参考文献 References:

- [1] Peiris T S, Machaalani R, Waters K A. Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the piglet brainstem and effects of intermittent hypercapnic hypoxia[J]. *Brain Research*, 2004, 1029(1): 11-23.
- [2] Binder D K, Scharfman H E. Brain-derived neurotrophic factor[J]. *Growth Factors*, 2004, 22(3): 123-131.
- [3] Sonoyama T, Stadler L K J, Zhu M Y, et al. Human BDNF/TrkB variants impair hippocampal synaptogenesis and associate with neurobehavioural abnormalities[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 9028.

- [4] Seifer D B, Feng B, Shelden R M, et al. Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87(2): 655–659.
- [5] Chow R, Wessels J, Foster W. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and function in the mammalian reproductive tract[J]. *Human Reproduction Update*, 2020, 26(4): 545–564.
- [6] Disen G A, Hirshfield A N, Malamed S, et al. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated; changes at the time of folliculogenesis[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(10): 4681–4692.
- [7] Paredes A, Romero C, Disen G A, et al. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary[J]. *Developmental Biology*, 2004, 267(2): 430–449.
- [8] Qin X S, Zhao Y, Zhang T Y, et al. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide-induced premature ovarian failure model mice[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 914.
- [9] Chen S X, Wang F G, Liu Z, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes proliferation and progesterone synthesis in bovine granulosa cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(6): 8776–8787.
- [10] Kawamura K, Kawamura N, Sato W, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(8): 3774–3782.
- [11] Marchese M J, Li S, Liu B, et al. Perfluoroalkyl substance exposure and the BDNF pathway in the placental trophoblast[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 694885.
- [12] Li C, Li C, Zhu X, et al. The expression and putative role of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in bovine sperm[J]. *Theriogenology*, 2012, 77(3): 636–643.
- [13] Esmaili-Fard S M, Gholizadeh M, Hafezian S H, et al. Genome-wide association study and pathway analysis identify NTRK2 as a novel candidate gene for litter size in sheep[J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0244408.
- [14] Hong G K, Payne S C, Jane J A, Jr. Anatomy, physiology, and laboratory evaluation of the pituitary gland[J]. *Otolaryngol Clinics of North America*, 2016, 49(1): 21–32.
- [15] Li C Y, Li X Y, Ma Q M, et al. Genome-wide analysis of circular RNAs in prenatal and postnatal pituitary glands of sheep[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16143.
- [16] O'Shaughnessy P J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis[J]. *Seminars Cell & Developmental Biology*, 2014, 29: 55–65.
- [17] Walker W H, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells[J]. *Reproduction*, 2005, 130(1): 15–28.
- [18] Ulloa-Aguirre A, Lira-Albarrán S. Clinical applications of gonadotropins in the male[J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2016, 143: 121–174.
- [19] Casarini L, Crépeux P, Reiter E, et al. FSH for the treatment of male infertility[J]. *International Journal Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2270.
- [20] Hillier S G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 179(1/2): 39–46.
- [21] Bhartiya D, Patel H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2021, 14(1): 1–14.
- [22] Przybył B J, Szlis M, Wójcik-Gładysz A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) affects the activity of the gonadotrophic axis in sheep[J]. *Hormones Behavior*, 2021, 131: 104980.
- [23] Feng X, Li F Z, Wang F, et al. Genome-wide differential expression profiling of mRNAs and lncRNAs associated with prolificacy in Hu sheep[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(2): BSR20171350.
- [24] Zheng J A, Wang Z B, Yang H A, et al. Pituitary transcriptomic study reveals the differential regulation of lncRNAs and mRNAs related to prolificacy in different *FecB* genotyping sheep[J]. *Genes*, 2019, 10(2): 157.
- [25] Li M, Dai F R, Du X P, et al. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling[J]. *Behavioural Brain Research*, 2012, 231(1): 146–153.
- [26] Cao M S, Niu Q G, Xiang X Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates ishikawa cell proliferation through the TrkB-ERK1/2 signaling pathway[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1645.
- [27] Kawamura K, Kawamura N, Fukuda J, et al. Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor[J]. *Developmental Biology*, 2007, 311(1): 147–158.
- [28] Lim W, Bae H, Bazer F W, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves proliferation of endometrial epithelial cells by inhibition of endoplasmic reticulum stress during early pregnancy[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(12): 3641–3651.
- [29] de Souza D K, Salles L P, Camargo R, et al. Effects of PI3K and FSH on steroidogenesis, viability and embryo development of the cumulus-oocyte complex after *in vitro* culture[J]. *Zygote*, 2018, 26(1): 50–61.
- [30] Barroso G, Oehninger S, Monzó A, et al. Clinical assisted reproduction: high FSH:LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: impact on follicular development and IVF outcome[J]. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 2001, 18: 499–505.