

吴阳升, 林嘉鹏, 蒋香菊, 等. 绵羊 *FSHR* 基因可变剪接体的克隆、鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 630-637.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.021

绵羊 *FSHR* 基因可变剪接体的克隆、鉴定及表达分析

吴阳升, 林嘉鹏, 蒋香菊, 汪立芹, 韩冰, 黄俊成

(新疆畜牧科学院生物技术研究所以, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 根据 GenBank 中绵羊促卵泡激素受体基因 (*FSHR*) 的 mRNA 序列 (登录号: NM_001009289.1) 设计引物, 反转录 PCR (RT-PCR) 扩增蛋白编码区 (CDs) 区, 以获取绵羊 *FSHR* 基因可变剪接体, 并通过 Western blot 验证其在组织中的表达, 通过免疫组织化学方法检测其在卵泡中的表达位置。结果表明, 在绵羊卵巢中除了全长的、编码 695 个氨基酸的 *FSHR* 表达产物外, 还鉴定到分别编码 694 个、633 个、595 个、582 个和 533 个氨基酸的 *FSHR* 可变剪接形式的转录产物。在卵泡中主要以 695 (694)、633 和 595 3 种转录本形式存在。但在颗粒细胞中绵羊促卵泡激素受体主要以经典分子即 695 个氨基酸的形式存在。在卵泡发育过程中, *FSHR* 蛋白质含量发生变化: 在初级卵泡中, *FSHR* 主要在卵母细胞中表达, 而不是在单层的颗粒细胞中表达, 在次级卵泡中, *FSHR* 在颗粒细胞和卵母细胞中均不表达, 到三级卵泡 (有腔卵泡) 时, *FSHR* 蛋白质在颗粒细胞中表达丰富。可见, 绵羊 *FSHR* 基因虽然存在可变剪接体的结构, 但其功能主要取决于典型的 695 个氨基酸蛋白质分子, 并且对初级卵泡的发育具有一定的作用。

关键词: 绵羊; *FSHR* 基因; 可变剪接体; 卵泡

中图分类号: S826.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)03-0630-08

Cloning, identification, and expression analysis of alternative splicing isoforms of *FSHR* in sheep

WU Yang-sheng, LIN Jia-peng, JIANG Xiang-ju, WANG Li-qin, HAN Bing, HUANG Jun-cheng

(Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

Abstract: Based on the sequence of *FSHR* gene in GenBank (accession number: NM_001009289.1), primers were designed, and the coding sequence (CDs) of ovine *FSHR* were obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Temporal and spatial expression patterns were assessed by western blot and immunohistochemistry (IHC) in different tissues and follicles of sheep. The results showed that, in addition to a transcript encoding the classical 695 amino acids (aa), there are more than six *FSHR* splicing variants encoding proteins of 694 aa, 670 aa, 633 aa, 595 aa, 582 aa and 533 aa in sheep granulosa cells. Three transcripts (695/694 aa, 633 aa and 595 aa) were found in the follicles with different diameters. However, only the classical protein is translated in granulosa cells. In primary follicles, *FSHR* proteins were abundant in oocytes but not in monolayer granulosa cells. In secondary follicles, *FSHR* proteins were downregulated, both in granulosa cells and oocytes. In tertiary (antral) follicles, *FSHR* proteins were abundant in granulosa cells. It was

indicated that sheep *FSHR* plays a role in the development of primary follicles despite of the existence of *FSHR* alternative splicing isoforms, and its function depends on the classical *FSHR* protein.

Key words: sheep; *FSHR* gene; alternative splicing isoforms; follicle

收稿日期: 2016-12-12

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2014211A068)

作者简介: 吴阳升 (1977-), 男, 河南睢县人, 博士, 助理研究员, 主要从事家畜生殖生物学研究。 (Tel) 0991-3075297; (E-mail) victorwys@hotmail.com

通讯作者: 黄俊成, (E-mail) h_jc@sina.com

绵羊促卵泡激素 (Follicle stimulating hormone, FSH) 属于糖基化蛋白质激素,由垂体合成分泌并通过外周血液循环作用于其卵巢中的受体 (FSHR) 而调控个体繁殖过程。FSHR 主要表达于卵巢颗粒细胞中,其表达水平与颗粒细胞的分化、卵泡闭锁及成熟密切相关^[1]。FSH 及其受体因基因突变而引起的氨基酸组成变化,会导致卵泡发育不正常。例如,人 *FSHb* 亚基因的突变可导致原发性闭经^[2]、发育延迟及生殖器官发育不良^[3],*FSHR* 的突变导致卵巢发育失败^[4-7]。

RNA 的可变剪接 (Alternative splicing, AS) 是指从一个 mRNA 前体中通过不同的剪接方式 (选择不同的剪接位点组合) 产生不同的 mRNA 剪接异构体的过程,是调节基因表达和产生蛋白质组多样性的重要机制^[8]。在哺乳动物中,*FSHR* 基因由 10 个外显子组成,前 9 个外显子编码胞外域,而第 10 外显子编码部分胞外域、七次跨膜结构域及胞内域。经典的 *FSHR* 编码 695 个氨基酸的 G 蛋白偶联受体。迄今为止,先后在绵羊、小鼠、人和牛等哺乳动物中发现了 *FSHR* 基因的可变剪接体。在绵羊卵巢中鉴定到的类似生长因子 I 型受体的 FSHR 可变剪接体,具有单次跨膜结构,并存在于卵巢上皮组织生殖干细胞及发育各阶段卵泡中,可能参与卵泡的发育过程^[9-12]。在女性卵泡中,存在多种具有七次跨膜结构的 FSHR 可变剪接形式,并发现在对外源激素反应性差异很大的卵巢颗粒细胞中存在不同的 FSHR 可变剪接体^[13-14]。推测 FSHR 可变剪接体可能影响女性的卵泡发育过程。而在小鼠卵泡中鉴定到的多种外显子缺失 FSHR 可变剪接体,但其表达均与卵泡的发育过程似乎无关。牛黄体发育过程中 FSHR 可变剪接体的变化表明其可能参与黄体化作用^[15]。目前尚不清楚绵羊卵泡内 G 蛋白偶联受体型 FSHR 可变剪接体的组成及其与卵泡发育之间的关系。

本研究以绵羊卵泡颗粒细胞为材料,通过聚合酶链式反应克隆 *FSHR* 基因的 cDNA 片段,并测序分析该基因可变剪接体的种类及序列特征,鉴定不同直径卵泡中 FSHR 可变剪接体的种类及比例,在蛋白质水平鉴定 FSHR 可变剪接体的种类及其在卵泡发育过程中的变化特征,以了解 *FSHR* 基因的可变剪接体表达规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绵羊卵巢采自乌鲁木齐市华凌畜牧牛羊屠宰市场。采集 50~60 只屠宰绵羊 (哈萨克羊) 卵巢置于生理盐水中,1 h 内运至实验室。

颗粒细胞收集:用 10 ml 注射器抽取直径 2~5 mm 卵泡内容物,1 000 g 离心 2 min,弃上清。PBS 洗沉淀 1 次,离心,弃上清。颗粒细胞沉淀置于 -80 °C 保存,用于 RNA 提取及 cDNA 合成,或用于 Western blot 蛋白质分析。

不同直径窦状卵泡收集:用尖头镊子手工分离绵羊卵巢上外形饱满、卵泡液清澈的窦状卵泡。根据直径分成 4 组:1.0~2.0 mm,2.1~3.0 mm,3.1~4.9 mm,≥5.0 mm。分别置于约 10 倍体积的样品保护剂 (Sample protector for RNA/DNA, TaKaRa 公司产品) 中, -20 °C 保存,用于提取总 RNA。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取收集的颗粒细胞或去除样品保护剂的卵泡,加入 1 ml Trizol (Invitrogen 公司产品),用 1 ml 注射器 (12 号针头) 多次抽吸细胞组织,充分裂解细胞,冰浴 5~10 min,12 000 g 离心 5 min,将上清移到新的离心管中,加 0.2 ml 氯仿,震荡 15 s,室温静置 3~5 min,12 000 g 离心 15 min,取上层水相至新离心管,在水相液中加入 0.5 ml 异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10 min,12 000 g 离心 10 min,弃上清,沉淀加 1 ml 75% 乙醇洗涤 1 次,7 500 g 离心 5 min,吸弃上清,RNA 沉淀在室温干燥 3~5 min,加入 Rnase-free water 溶解 RNA。以上离心温度均为 2~8 °C。然后对提取的总 RNA 进行浓度测定。

利用 cDNA 合成试剂盒 (TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix, 北京 TRANSGEN BIOTECH 公司产品),以 1 μg 总 RNA 为模板,Oligo (dT) 18 为引物,根据试剂盒说明书反转录成 cDNA。

1.3 PCR 扩增及克隆测序

根据 NCBI 上绵羊 *FSHR* 序列 (GenBank ID: NM_001009289.1) 设计全长 cDNA 扩增引物 oFshrF1 (5'-CAAAAGGGCTCAGTGTGGAG-3') 和 oFshrR1 (5'-CTTATGGATGTGCCAGGGAG-3'),菌液验证引物 oFshrF2 (5'-CGTCTGCAGAAGCAGAAGCA-3') 和 oFshrR2 (5'-AGTGCTCTGTCAGCTCTTGC-3'),半定

量扩增引物 oFshr-HF (5'-CTGCCAGGACAGCAAG-GT-3') 和 oFshr-HR (5'-GCTGGGCTCATCATCTTCT-3')。

全长编码区的扩增:以绵羊颗粒细胞总 cDNA 为模板,以 oFshrF1/oFshrR1 为引物进行 PCR 扩增。反应体系 20 μ l:1 \times Buffer, oFshrF1 0.2 μ mol/L, oFshrR1 0.2 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, cDNA 1 μ l, HiFi DNA polymerase (TransTaq DNA Polymerase High Fidelity, 北京全式金生物公司产品) 2 U。扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证, 回收大小约 2 kb 的目的片段, 连接 T 载体, 转化大肠杆菌。随机挑取单克隆, 用内部引物 oFshrF2/oFshrR2 验证, 扩增条件同上。随机挑取 30 个单克隆测序分析。

以绵羊不同直径卵泡 cDNA 为模板, 以引物 oFshr-HF/ oFshr-HR 进行 PCR 扩增, 扩增体系同上。程序为:95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证。

1.4 序列分析

根据测序结果, 分析各种 *FSHR* 可变剪接体的开放阅读框, 翻译蛋白质氨基酸序列, 利用在线软件 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析信号肽序列, 利用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜区分析, 利用在线软件进行分子量预测 (http://web.expasy.org/compute_pi/), 利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 在线分析外显子序列组成, 利用 Clustal X 软件对各种剪接体的氨基酸序列进行分析。

1.5 Western blot 分析

在 40 μ l 颗粒细胞沉淀中加入 500 μ l 细胞裂解 RIPA (Pierce, Thermo FisherTM), 用 1 ml 注射器反复抽吸颗粒细胞, 充分裂解细胞。取绵羊其他组织 (心、肝、脾、肺、肾、肌肉、淋巴等) 新鲜样品加入 RIPA 裂解液进行匀浆, 用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Pierce, Thermo FisherTM) 测定蛋白质浓度。在样品裂解液中加入上样缓冲液 [250 mmol/L Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、0.5% BPB、50% 甘油、5% β -巯基乙醇], 样品裂解液和上样缓冲液体积比 5:1。每孔上样 35 μ g 蛋白质裂解液样品, 进行 SDS-

PAGE, 之后将蛋白质转移到 PVDF 印迹膜 (Millipore 0.22 μ m) 上。PVDF 膜在封闭液 (5% 脱脂奶粉, PBS) 中封闭过夜, 在鼠抗 *FSHR* 单克隆抗体 (1:1 000, 抗原序列 EDDEPSYAKGFDMM) 中室温孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。将膜在二抗抗体 [Odyssey, Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight $\text{\textcircled{C}}$ 680 Conjugate)] 中室温孵育 1 h, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min。将 PVDF 膜在 Odyssey (美国 LI-COR 公司产品) 仪器上进行图像扫描、保存及分析。按照同样的上样量和上样顺序, 利用鼠抗肌动蛋白 (β -actin) 抗体作为一抗, 进行免疫印迹反应, 其他操作过程同上。

1.6 免疫组织化学检测

自屠宰场采集的绵羊卵巢用波恩固定液固定 24 h, 换 75% 酒精保存。进行常规石蜡包埋、石蜡切片、贴片和脱蜡。切片在 *FSHR* 抗体 (1:200, 抗体稀释液为含 5% BSA 的 PBS) 中在室温孵育 45 min, PBS 洗片 3 次, 每次 5 min。切片再经二抗 HRP-山羊抗鼠 (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 处理, PBS 洗片 5 次, 每次 5 min。DAB 显色液 (福建迈新生物技术公司产品) 显色 3~10 min, 显微镜观察显色效果, 封片, 拍照分析。

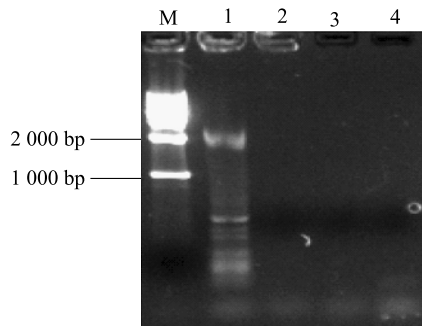
2 结果

2.1 绵羊 *FSHR* 基因全长编码区的扩增

以绵羊颗粒细胞总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行 *FSHR* 基因开放阅读框全长序列的 PCR 扩增, 获得约 2 kb 大小的产物条带 (图 1)。在卵巢上剥离出不同直径的卵泡 (图 2), 以不同直径卵泡 cDNA 为模板进行全长型 *FSHR* 基因的 PCR 扩增, 结果 (图 3) 显示各种卵泡均扩增出约 2 kb 的阳性条带, 其中在 2~3 mm 卵泡中表达量最高。以半定量引物对不同直径卵泡 cDNA 模板进行扩增, 获得分子量介于 800~1 000 bp 的 3 条不同大小的条带 (图 4), 其中在直径 2.1~3.0 mm 卵泡中表达量最高。说明在绵羊卵泡中存在以 3 种长度类型为主的 *FSHR* 可变剪接体。

2.2 绵羊 *FSHR* 可变剪接体形式

与人类的同源基因类似, 绵羊的 *FSHR* 基因也是由 10 个外显子和 9 个内含子组成, 共编码 695 个氨基酸 (aa), 其中第 1~9 外显子编码胞外域 (1~285 aa), 而第 10 外显子编码 C 端部分胞外域



M:Marker;1:模板为绵羊颗粒细胞 cDNA,引物为 oFshrF1 和 oFshrR1;2:模板为绵羊颗粒细胞 cDNA,引物为 oFshrF1;3:模板为绵羊颗粒细胞 cDNA,引物为 oFshrR1;4:模板为 H₂O,引物为 oFshrF1 和 oFshrR1。

图1 绵羊颗粒细胞 *FSHR* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of sheep *FSHR* gene in granulosa cell

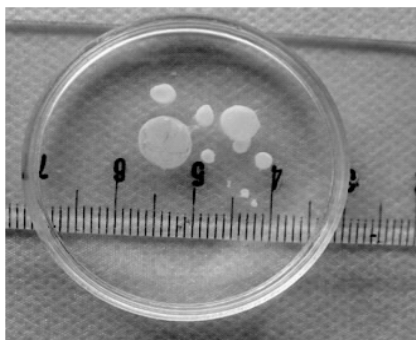
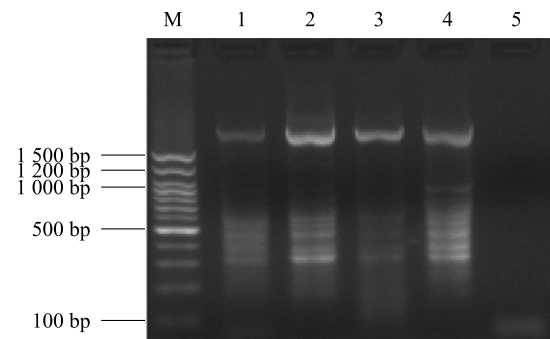


图2 剥离的绵羊不同直径卵泡

Fig.2 Different diameters of follicle derived from sheep ovary

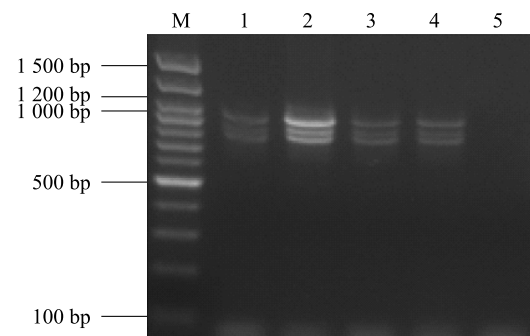
(286~366 aa)、跨膜域(367~630 aa)及胞内域(631~695 aa)。氨基末端首先是17个aa的信号肽序列。经过克隆测序分析,除了经典的编码695个氨基酸(aa)的FSHR₆₉₅外,还鉴定到6种编码694个、670个、633个、595个、582个和533个aa新的可变剪接体,即FSHR₆₉₄、FSHR₆₇₀、FSHR₆₃₃、FSHR₅₉₅、FSHR₅₈₂和FSHR₅₃₃。其中FSHR₆₉₄缺失第101位精氨酸(Arg,R),FSHR₆₇₀缺失 exon3,FSHR₆₃₃缺失 exon9,FSHR₅₉₅缺失 exon3、exon4、exon5 和 exon6,FSHR₅₈₂缺失第101位 Arg 和 exon5、exon6 和 exon9,FSHR₅₃₃缺失 exon3、exon4、exon5、exon6 和 exon9。这些剪接形式中,exon1、exon2、exon7 和 exon10 外显子最为保守,在各种剪接形式中均存在(图5)。



1、2、3、4 泳道模板分别是直径 1.0~2.0 mm、2.1~3.0 mm、3.1~4.9 mm 和 ≥5.0 mm 卵泡的 cDNA;5 泳道模板为 H₂O。引物均为 oFshrF1 和 oFshrR1。

图3 不同直径卵泡 cDNA 的全长 *FSHR* PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of *FSHR* in follicles with different diameters



M:分子量标准;1、2、3、4 泳道模板分别是直径 1.0~2.0 mm、2.1~3.0 mm、3.1~4.9 mm 和 ≥5.0 mm 卵泡的 cDNA;5 泳道模板为 H₂O。引物均为 oFshr-HF 和 oFshr-HR。

图4 绵羊不同直径卵泡 *FSHR* 基因的半定量 PCR 扩增

Fig.4 Semi-quantitative PCR of *FSHR* gene in ovine follicles with different diameters

对半定量引物扩增不同直径卵泡 *FSHR* 基因获得的3种扩增条带进行测序分析,结果表明3种条带所对应的可变剪接体分别是FSHR₆₉₅(包括FSHR₆₉₄)、FSHR₆₇₀、FSHR₆₃₃。它们在每种卵泡中的表达比例约为1:1:1,在不同直径卵泡中的组成无显著差异。

2.3 绵羊 *FSHR* 基因在蛋白质水平的表达

经 Western blot 分析,*FSHR* 基因仅在颗粒细胞中检测到蛋白质形式的表达,而在心、肝、脾、肺、肾、肌肉和淋巴等组织中均检测不到蛋白质水平的表

MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	120
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	119
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	95
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	120
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	74
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	119
MALFLVALLAFLSLGSGCHHRLCHCSNGVFLCQDSKVTEMPSDLPRDAVELRFVLTCLRVIPEGAFSGFGDLEK	IEISQNDVLEVEANVFSNPKLHE	TRIEKANNLLYIDPDAFQNL	74
NLRYLLISNTGIKHLPVHKIQLQKVLDDIQDNINIHTVERNSFMGLSFESMIWLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVILDISRTRIRSLPSYGLN			240
NLRYLLISNTGIKHLPVHKIQLQKVLDDIQDNINIHTVERNSFMGLSFESMIWLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVILDISRTRIRSLPSYGLN			239
NLRYLLISNTGIKHLPVHKIQLQKVLDDIQDNINIHTVERNSFMGLSFESMIWLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVILDISRTRIRSLPSYGLN			215
NLRYLLISNTGIKHLPVHKIQLQKVLDDIQDNINIHTVERNSFMGLSFESMIWLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVILDISRTRIRSLPSYGLN			223
	WLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVIL		140
NLRYLLISNTGIKHLPVHKIQLQKVLDDIQDNINIHTVERNSFMGLSFESMIWLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVILDISRTRIRSLPSYGLN			172
	WLSKNGIQETHNCAFNGTQLDELNLSNLSNLEELPNDVFQAGSGPVIL		123
LKKLRAKSTYHLKKLPSLEKFTVLEASLTYPHCCAFANWRRQTS	LDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	360
LKKLRAKSTYHLKKLPSLEKFTVLEASLTYPHCCAFANWRRQTS	LDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	359
LKKLRAKSTYHLKKLPSLEKFTVLEASLTYPHCCAFANWRRQTS	LDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	335
	SDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	298
LKKLRAKSTYHLKKLPSLEKFTVLEASLTYPHCCAFANWRRQTS	LDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	260
	SDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	247
	SDLHPICNKSILRQEVDDMTQARGQRISLAEDDEPSYAKGFDMMYSEFDYDLCEVVDVTCSPEDAFNPCE	IM	198
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			480
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			479
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			455
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			418
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			380
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			367
GYDILRVLIWFISILAITGNILVLVILITSQYKLTVPFLMCNLAADLCIGIYLLLIASVDVHTKSQYHNYAIDWQTGAGCDAAGFFTVFASLSVYTLTAITLERWHTITHAMQLECK			318
VHVRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	600
VHVRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	599
VHVRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	575
VQLRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	538
VQLRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	500
VQLRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	487
VQLRHAASIMLVGWVFAFAVALFPFIFGISSYMKVSIKLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNLVAFVVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSDTKIAKRMAMLI	FTDFLCMAPI	SFFAISASLKVP	438
LITVSKSKILLVLFYPIINSCANPFLYAIIFTRNFRDDFILLSKFGCEYVQAQTYRSETSFTHNHFPRNGHCPPAPRV	TNGSNYTLIPLRHLAKN		695
LITVSKSKILLVLFYPIINSCANPFLYAIIFTRNFRDDFILLSKFGCEYVQAQTYRSETSFTHNHFPRNGHCPPAPRV	TNGSNYTLIPLRHLAKN		694
LITVSKSKILLVLFYPIINSCANPFLYAIIFTRNFRDDFILLSKFGCEYVQAQTYRSETSFTHNHFPRNGHCPPAPRV	TNGSNYTLIPLRHLAKN		670
LITVSKSKILLVLFYPIINSCANPFLYAIIFTRNFRDDFILLSKFGC			

图 5 绵羊不同剪接形式的 FSHR 氨基酸序列比对

Fig.5 The amino acid sequences alignment of different alternatively spliced ovine FSHR

达。在颗粒细胞中,仅有一种大小的 FSHR 阳性条带,其相对分子质量约 7.7×10^4 (图 6),与编码全长 695 氨基酸序列预测的分子量(带信号肽分子量预测为 7.823×10^4 ,不带信号肽的分子量预测为

7.653×10^4) 最为接近。对绵羊卵巢进行 FSHR 免疫组化定位分析发现:在窦状卵泡中,FSHR 的阳性信号集中在壁颗粒细胞中;在具有单层颗粒细胞的原始卵泡中,FSHR 阳性信号则集中卵母细胞中而非

颗粒细胞中;在具有多层颗粒细胞的次级卵泡中,颗粒细胞和卵母细胞中均无显著的 *FSHR* 阳性信号 (图 7)。

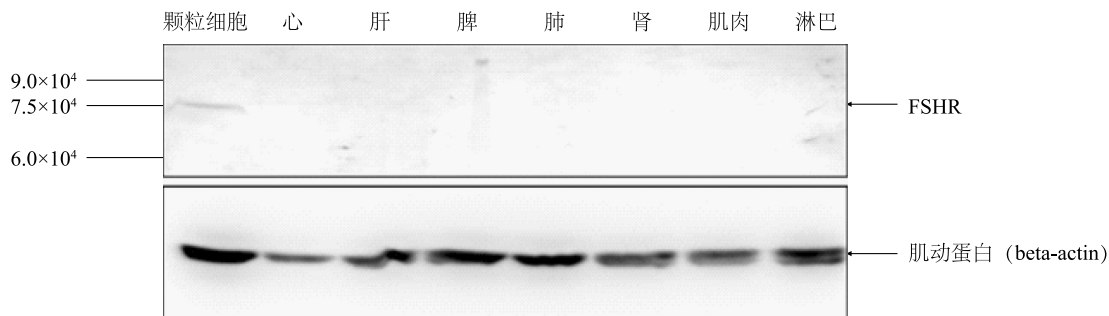
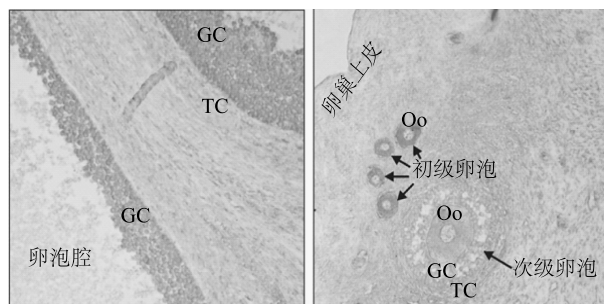


图 6 Western blot 分析绵羊不同组织中 *FSHR* 蛋白质的表达

Fig.6 Western blot analysis of ovine *FSHR* protein expression in different sheep tissues



Oo:卵母细胞;GC:颗粒细胞;TC:膜细胞。

图 7 绵羊卵巢中 *FSHR* 蛋白质的免疫组织化学表达 ($\times 200$)

Fig.7 Immunohistochemical analysis of *FSHR* protein in sheep ovary ($\times 200$)

3 讨论

本研究中,我们鉴定到绵羊卵泡中存在多种具有 G 蛋白偶联受体形式的 *FSHR* mRNA 可变剪接形式,而蛋白质形式的 *FSHR* 仅有全长形式的分子存在。在初级卵泡中 *FSHR* 基因仅在卵母细胞中高水平表达,在三级卵泡中主要在颗粒细胞中表达。本研究所鉴定的可变剪接体均为胞外域部分的选择性剪接形式。

FSHR 的可变剪接形式在多个哺乳动物物种中被发现,但剪接形式随物种不同有所差异。在小鼠中发现有缺失 exon2、exon5、exon6 的多种 *FSHR* 可变剪接形式^[16]。在猫颗粒细胞中发现有缺失 exon3 的可变剪接形式^[17]。在人卵巢中存在缺失 exon2、

exon6、exon9 及 exon8 的表达形式^[14, 18]。在牛卵巢中发现有 exon4、exon5、exon9 缺失的表达形式^[15]。我们发现,绵羊卵巢中存在缺失 exon3、exon4、exon5、exon6、exon9 等外显子的可变剪接形式的表达。在可变剪接过程中,导致仅 exon3 和 exon4 交界处的单个精氨酸 (Arg) 缺失,比典型的分子缺少 1 个氨基酸。目前还不清楚这种剪接类型是否能翻译成蛋白质,以及具有什么生物学功能。另外,与人、牛等单胎类型哺乳动物相似,绵羊中很早就发现存在 exon9 缺失类型^[19],这种缺失所对应编码的氨基酸序列恰好是受体信号特异性反应结构域位置^[20]。但我们在卵泡颗粒细胞仅鉴定到一种大小的 *FSHR* 蛋白质分子,根据其分子量大小判断很可能是含 695 个 aa 的全长形式。因此缺失 exon9 的可变剪接体是否具有生物学功能,仍然有待于进一步研究。

在 1~3 日龄的新生小鼠卵巢中仅有可变剪接形式的 *FSHR* 表达,这些可变剪接形式似乎也不影响完整分子 *FSHR* 的功能,而全长型 *FSHR* 直至第 5 日龄才表达^[16]。这些可变剪接体不能与 FSH 结合,也不能提高 cAMP 和孕酮含量^[21]。*FSHR* 胞外域部分的可变剪接,可能通过降低同配体激素的亲合和活性而影响受体的功能^[22]。在猫卵丘颗粒细胞中存在缺失第 3 外显子的剪接形式 (670 aa),但在繁殖季节和非繁殖季节中表达变化不大^[17]。颗粒细胞中存在缺失 exon6 的 *FSHR* 形式的妇女,经外源激素超排处理可获得 30 枚左右的卵母细胞,而缺失 exon2 的仅可获得 2~4 枚卵母细胞,而且这些可

变剪接体的 cAMP 活性均低于经典类型的 FSHR, 且对促黄体激素 (LH) 和促甲状腺激素 (TSH) 均无反应^[14]。而在人单核细胞和破骨细胞中表达的 FSHR 是缺失 exon9 的可变剪接形式^[23]。这些人卵泡中所存在的 FSHR 不同可变剪接形式, 可能影响其配体的反应性, 从而影响其生物学功能。有研究表明, 在牛卵巢黄体形成全过程中均有缺失 exon4、exon5、exon9 的 FSHR 可变剪接体表达, 而经典形式的 FSHR 仅存在于黄体早期^[15], 推测 FSHR 可变剪接体与牛黄体形成过程有关。我们在研究中发现绵羊不同直径的有腔卵泡中存在多种可变剪接形式 FSHR 的表达, 主要有 3 种 FSHR 可变剪接体表达, 但在各阶段可变剪接体类型相似, 在不同直径卵泡之间表达差异并不显著。虽然在 RNA 水平有 3 种长度的可变剪接体存在, 但在蛋白质水平却仅有 1 种形式的蛋白质存在, 即经典的全长形式的 FSHR 蛋白质分子 (或相差 1 个 aa 可变剪接体)。这表明, 尽管绵羊颗粒细胞中存在多种 FSHR 可变剪接体, 但主要还是以全长型 FSHR 在蛋白质水平发挥生物学作用。

此外, Babu 等报道在绵羊卵巢中已鉴定到类生长因子受体形式的非 G 蛋白偶联受体形式的可变剪接体, 编码 1~8 外显子和一段特有的羧基末端氨基酸序列^[10]。由于我们所使用的抗体所识别的抗原序列位于 exon10 区域内氨基酸多肽抗原位点, 因此我们在 Western blot 检测中, 并未检测到这些短型单次跨膜的 FSHR 可变剪接体蛋白质分子。我们在进行全长 cDNA 扩增时, 也获得了一些较短的扩增产物, 其中可能包括了这类单次跨膜结构的 FSHR 可变剪接体。有研究结果表明类生长因子类的 FSHR 可变剪接体在绵羊卵巢上皮组织生殖干细胞及发育各阶段卵泡中均存在^[11-12], 可能参与卵泡的发育过程。

Tisdall 等^[19] 在研究成年绵羊卵泡中 FSHR 的表达时, 发现 FSHR 在初级卵泡的 1 至 2 层颗粒细胞中有 mRNA 的表达, 并且一直持续到卵泡闭锁早期, 即从原始卵泡过渡到初级卵泡后 FSHR 一直表达。而我们在对成年绵羊卵巢进行 FSHR 蛋白质表达分析时, 发现 FSHR 蛋白质在三级卵泡 (有腔/窦状) 的颗粒细胞内含量丰富, 而在具有多层颗粒细胞的次级卵泡中, 无论是颗粒细胞还是卵母细胞中都检测不到 FSHR 蛋白质分子。与前人在 mRNA 水

平检测结果不同的是: 我们发现 FSHR 蛋白质分子在初级卵泡卵母细胞中表达丰富, 而不是在颗粒细胞中。Meduri 等^[24] 在人和猪初级卵泡到三级卵泡的卵母细胞中均发现 FSHR 蛋白质分子的存在, 甚至在排卵前卵母细胞中的表达量高于颗粒细胞近 20 倍, 并且无卵丘细胞的卵母细胞可以响应 FSH 动员 Ca^{2+} 信号效应。前人所发现的从绵羊初级卵泡至三级卵泡中颗粒细胞中存在的 FSHR mRNA 分子, 很可能包括各种剪接体形式。而绵羊与人和猪卵母细胞中发现的 FSHR 蛋白质分子表达不同的是: 在初级卵泡中 FSHR 在卵母细胞中表达, 而在次级卵泡中不表达。我们的这一结果与绵羊次级卵泡对外源激素不敏感而窦状卵泡对外源激素敏感的现象完全吻合。在绵羊初级卵泡发育过程中, 很可能是以全长形式的 FSHR 蛋白分子 (或至少包括第 10 外显子胞外域 EDDEPSYAKGFDMM 抗原多肽序列的蛋白质分子) 参与到初级卵泡的发育。根据以上结果, 我们推测 FSH 对绵羊卵泡发育的影响: 在初级卵泡阶段是卵母细胞上的受体发挥作用, 而到次级卵泡阶段因其受体蛋白分子表达显著降低而不敏感, 至三级卵泡时则主要通过颗粒细胞上受体恢复其对发育的影响。

总之, 我们在绵羊卵泡中鉴定到缺失 exon3、exon4、exon5、exon6 和 exon9 等的 FSHR 基因多种可变剪接体, 但翻译成蛋白质分子的仅有全长形式的剪接形式。FSHR 蛋白质分子在初级卵泡卵母细胞中表达, 而在次级卵泡的卵母细胞和颗粒细胞中均不表达, 在三级卵泡中主要在颗粒细胞中表达来调控卵泡的发育进程。

参考文献:

- [1] SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology [J]. Endocr Rev, 1997, 18(6): 739-773.
- [2] MATTHEWS C H, BORGATO S, BECK-PECCOZ P, et al. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone [J]. Nat Genet, 1993, 5(1): 83-86.
- [3] LAYMAN L C, LEE E J, PEAK D B, et al. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene [J]. N Engl J Med, 1997, 337(9): 607-611.
- [4] AITTOAKI K, LUCENA J L, PAKARINEN P, et al. Mutation

- in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure [J]. *Cell*, 1995, 82(6): 959-968.
- [5] BEAU I, TOURAINE P, MEDURI G, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(7): 1352-1359.
- [6] TOURAINE P, BEAU I, GOUGEON A, et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(11): 1844-1854.
- [7] DOHERTY E, PAKARINEN P, TIITINEN A, et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3): 1151-1155.
- [8] LUCO R F, ALLO M, SCHOR I E, et al. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing [J]. *Cell*, 2011, 144(1): 16-26.
- [9] SAIRAM M R, JIANG L G, YARNEY T A, et al. Alternative splicing converts the G-protein coupled follitropin receptor gene into a growth factor type I receptor: implications for pleiotropic actions of the hormone [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48(4): 471-479.
- [10] BABU P S, JIANG L, SAIRAM A M, et al. Structural features and expression of an alternatively spliced growth factor type I receptor for follitropin signaling in the developing ovary [J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 1999, 2(1): 21-27.
- [11] PATEL H, BHARTIYA D, PARTE S, et al. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant FSH-R3 [J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6: 52.
- [12] SULLIVAN R R, FARIS B R, EBORN D, et al. Follicular expression of follicle stimulating hormone receptor variants in the ewe [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013, 11: 113.
- [13] KARAKAYA C, GUZELOGLU-KAYISLI O, HOBBS R J, et al. Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) alternative skipping of exon 2 or 3 affects ovarian response to FSH [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(7): 630-643.
- [14] GERASIMOVA T, THANASOULA M N, ZATTAS D, et al. Identification and *in vitro* characterization of follicle stimulating hormone (FSH) receptor variants associated with abnormal ovarian response to FSH [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2): 529-536.
- [15] RAJAPAKSHA W R, ROBERTSON L, O'SHAUGHNESSY P J. Expression of follicle-stimulating hormone-receptor mRNA alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization *in vivo* and *in vitro* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 120(1): 25-30.
- [16] O'SHAUGHNESSY P J, MARSH P, DUDLEY K. Follicle-stimulating hormone receptor mRNA in the mouse ovary during post-natal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse: structure of alternate transcripts [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 101(1/2): 197-201.
- [17] HOBBS R J, HOWARD J, WILDT D E, et al. Absence of seasonal changes in FSHR gene expression in the cat cumulus-oocyte complex *in vivo* and *in vitro* [J]. *Reproduction*, 2012, 144(1): 111-122.
- [18] GROMOLL J, GUDERMANN T, NIESCHLAG E. Molecular cloning of a truncated isoform of the human follicle stimulating hormone receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 188(3): 1077-1083.
- [19] TISDALL D J, WATANABE K, HUDSON N L, et al. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep [J]. *J Mol Endocrinol*, 1995, 15(3): 273-281.
- [20] JIANG X, LIU H, CHEN X, et al. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12491-12496.
- [21] TENA-SEMPERE M, MANNA P R, HUHTANIEMI I. Molecular cloning of the mouse follicle-stimulating hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid; functional expression of alternatively spliced variants and receptor inactivation by a C566T transition in exon 7 of the coding sequence [J]. *Biol Reprod*, 1999, 60(6): 1515-1527.
- [22] YARON Y, EVANS M I, LESSING J B, et al. Alternatively spliced mRNA transcripts encoding the extracellular domain of the FSH receptor gene. Expression in the mouse ovary during the ovulatory cycle [J]. *J Reprod Med*, 1998, 43: 435-438.
- [23] ROBINSON L J, TOURKOVA I, WANG Y, et al. FSH-receptor isoforms and FSH-dependent gene transcription in human monocytes and osteoclasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(1): 12-17.
- [24] MEDURI G, CHARNAUX N, DRIANCOURT M A, et al. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(5): 2266-2276.

(责任编辑:张震林)