陈 蓉,应诗家,陈 哲,等. *AMH* 及其相关基因在鸭不同等级卵泡中的表达[J].江苏农业学报,2018,34(1):87-92.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.013

AMH 及其相关基因在鸭不同等级卵泡中的表达

陈 蓉, 应诗家, 陈 哲, 于建宁, 施振旦
(江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 本研究旨在分析 *AMH* 及其相关基因在鸭不同等级卵泡中的表达特征,为水禽卵泡发育的分子机制研究积累基础资料。以连城白鸭为研究对象,通过定量 PCR 技术分别检测了卵巢不同等级卵泡中 *AMH* 基因及其相关调控基因的表达情况。结果表明,随着卵泡的发育,*AMH* 及其相关基因 *AMHR2*、*BMP6*、*SF1*、*GATA4* 和 *WT1* 的表达量逐渐降低,而 *CYP19A1* 基因的表达量逐渐升高,*SOX9* 和 *FSHR* 基因的表达量保持不变。我们推测 *AMH* 基因在鸭等级前卵泡中的高表达量可能有助于维持颗粒细胞未分化的状态,且可能是通过抑制 FSHR 信号通路来实现的。

关键字: 抗缪勒氏管激素;鸭;卵泡;基因表达
中图分类号: S858.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)01-0087-06

Expression of *AMH* and its related genes in various-sized follicles of duck

CHEN Rong, YING Shi-jia, CHEN Zhe, YU Jian-ning, SHI Zhen-dan
(*Institute of Animal Science*, *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, *Nanjng* 210014, *China*)

Abstract: To investigate the expression of *AMH* and its related genes in various-sized follicles of duck and provide the basic data for the molecular mechanism of waterfowl follicle development, the expression levels of *AMH* gene and its related regulatory genes in ovarian various-sized follicles from Liancheng duck were determined by quantitative PCR in this study. The results showed that the expression levels of *AMH* and its related genes *AMHR2*, *BMP6*, *SF1*, *GATA4* and *WT1* decreased gradually with the development of follicles, while the expression level of *CYP19A1* gene increased gradually and the expression levels of *SOX9* and *FSHR* genes remained unchanged. We speculated that the high expression of *AMH* gene in prehierarchal follicles of duck was helpful to maintain the undifferentiated state of granulosa cells, which might be achieved by inhibiting FSHR signaling pathway.

Key words: AMH; duck; follicles; gene expression

抗缪勒氏管激素(Anti-Mullerian hormone, AMH),又称缪勒氏管抑制物质(Mullerian-inhibiting substance, MIS),是转化生长因子 β(transforming growth factor β, TGFβ)超家族成员[1],在性腺组织中表达。最初,人们对 AMH 的理解仅限于其在性别分化中的作用——抑制雄性胚胎缪勒氏管的发育[2]。直到 1999 年,Durlinger 等通过 *AMH* 基因敲除小鼠研究发现 AMH 具有抑制原始卵泡募集和降低生长卵泡对促卵泡激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)敏感性的作用[3-4]。体外研究结果已表明,AMH 抑制生长卵泡对 FSH 敏感性是通过调控 FSH 受体(FSH receptor, FSHR)信号通路实现的[5-6]。与其他 TGFβ 超家族成员一样,AMH 通过与细胞膜上的 2 个丝氨酸/苏氨酸激酶受体(Ⅰ和Ⅱ型)相结合,激活胞浆内 Smad 分子从而调控靶基

收稿日期: 2017-07-10
基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20160592);江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5032]
作者简介: 陈 蓉(1985-),女,江苏淮安人,博士,助理研究员,主要从事家禽遗传育种与繁殖方面的研究。(E-mail)chenrong_big@163.com
通讯作者: 施振旦,(E-mail)zdshi@jaas.ac.cn

因的转录[7]。其中,Ⅱ型受体(AMH receptor 2,AMHR2)是 AMH 特异性的[8],Ⅰ型受体则与 TGFβ 超家族另一个成员骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins,BMPs)共享[9]。与哺乳动物相比,*AMH* 基因在禽类卵泡发育中的功能研究起步较晚,目前主要集中在家鸡中。2008 年,Johnson 等[10]首次检测了产蛋鸡卵巢不同等级卵泡的颗粒细胞中 *AMH* 基因的表达情况,发现 *AMH* 基因的信使核糖核酸(Messenger ribonucleic acid,mRNA)表达量随着卵泡的发育逐渐降低,并且 AMH 主要由小卵泡的颗粒细胞表达,与哺乳动物的表达模式相一致,表明 *AMH* 基因在禽类中具有保守的生物学功能。目前,国内外尚无 *AMH* 基因在水禽卵泡发育中的功能研究。本研究拟以连城白鸭为研究对象,通过定量 PCR 技术检测卵巢不同等级卵泡中 *AMH* 基因及其相关调控基因的表达情况,为水禽卵泡发育的分子机制研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

选择同批出雏同条件饲养的 200 日龄连城白鸭雌性个体 8 只,分别采集卵巢组织中的等级卵泡 F5(最小的等级卵泡)、小黄卵泡(Small yellow follicle,SYF)和大白卵泡(Large white follicle,LWF),经液氮速冻后置于-80 ℃保存。其中,等级卵泡 F5 去除卵黄蛋白。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

采用动物组织总 RNA 提取试剂盒[DP431,天根生化科技(北京)有限公司产品]提取总 RNA,NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度($OD_{260}/OD_{280} \geqslant 1.8$;$OD_{260}/OD_{230} \geqslant 1.0$)和浓度。采用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒[RR036A,日医生物技术(北京)有限公司产品]以总 RNA 为模板合成互补脱氧核糖核酸(Complementary deoxyribonucleic acid,cDNA)第一链。

1.3 mRNA 定量 PCR 分析

根据 GenBank 中绿头鸭或者近缘物种相关 mRNA 序列设计基因特异性引物,引物信息见表 1,其中 *SF1*(Steroidogenic factor 1,类固醇生成因子 1)、*WT1*(Wilms tumor 1,Wilms 肿瘤基因 1)、*GATA4*(GATA-binding protein 4,GATA 结合蛋白 4)基因引物序列引自参考文献[11]。以 β-肌动蛋白(*β-actin*)为内参基因,按照 TransStart Top GreenSuperMix 试剂盒(AQ131-04,北京全式金生物技术有限公司产品)的说明书配制反应体系并在 ABI 7500 Real-Time PCR 仪上进行聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR),每个样品重复 3 次。

表 1 定量 PCR 引物信息表

Table 1 Primers information for quantitative PCR

基因名称	序列(5′→3′)	产物长度(bp)	退火温度(℃)
AMH	F: CTCGGATGACAAATGCTTCA	111	60
	R: ACTCCATCAGCGGAGAGGTA		
SOX9	F: GCTGAATGAGAGCGAGAAGC	119	60
	R: CGTTCTTCACCGACTTCCTC		
SF1	F: GCTCAGTACCTTTGGCCTCA	122	60
	R: GCAGCAGCTTCATCTGGTCT		
GATA4	F: TTTCTGCTAACGGGAGGGAGCAAT	102	60
	R: AAGTCCAAGTGGTGGCCATTTCAG		
WT1	F: TCTGAAGACTCATACCAGGACTCA	136	60
	R: CATGTTCCTCTGGTGCATGT		
AMHR2	F: CTGATGGAGCACGAGAACG	90	60
	R: GTAGAGCTGCAGGACCAGGA		
FSHR	F: CCTAGCCATTGCTGTGCATTT	106	60
	R: TGCCAGGTTGCTCATCAAGG		
CYP19A1	F: AGAAGCGACAACAGCTTTCC	126	60
	R: TCTCCAGCACACACTGGTTC		
β-actin	F: GAGAAATTGTGCGTGACATCA	152	60
	R: CCTGAACCTCTCATTGCCA		

1.4　总蛋白提取

将卵泡组织置于适量的组织细胞裂解液(WB-0061,北京鼎国昌盛生物技术有限公司产品)中,匀浆,冰上静置至充分裂解,4 ℃,12 000 r/min离心 10 min,保留上清液,BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白的浓度(BCA01,北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。取适量的上清液与蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 5 min,冷却至室温。

1.5　蛋白质印迹检测

总蛋白质经浓度为 12%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离后,电转印至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene Fluoride,PVDF)膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入鼠抗人 AMH 单克隆抗体(稀释比例为1∶100,sc-166752,Santa Cruz 公司产品),4 ℃孵育过夜。洗膜缓冲液(Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20,TBST)洗涤后,加入过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(稀释比例为1∶2 000,CW0103S,北京康为世纪生物科技有限公司产品),室温孵育 1 h。TBST 洗涤后,加入 EasySee© Western Blot Kit 发光液(DW101-02,北京全式金生物技术有限公司产品),置于 ImageQuant LAS 4000 化学发光成像仪中曝光,拍照。同时,使用兔抗人 β-actin 单克隆抗体(稀释比例为1∶1 000,Cat No. 4970,Cell Signaling Technology 公司产品)进行内参蛋白的检测。

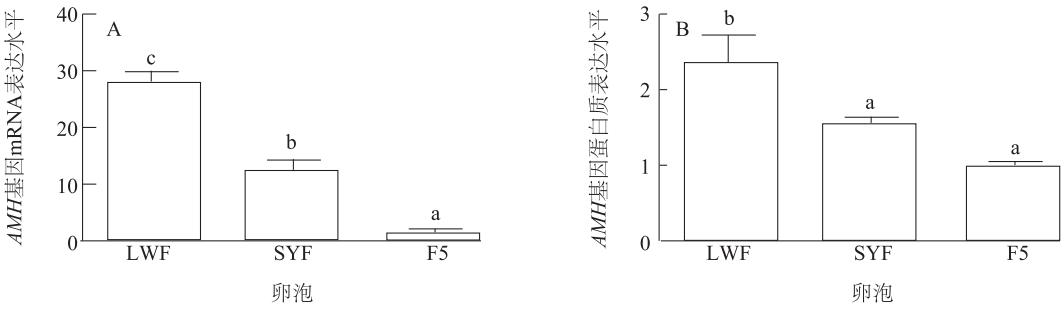
1.6　数据分析

采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行 mRNA 定量 PCR 试验数据处理,目的基因的相对表达量采用“平均数±标准差”的形式表示。采用 Image J 软件对蛋白质印迹条带进行灰度值分析,目的蛋白的相对表达水平采用“平均数±标准差”的形式表示。采用 SPSS 软件进行统计分析,均值比较采用单因素方差分析法,两两比较采用 LSD 法。

2　结果与分析

2.1　*AMH* 基因在鸭不同等级卵泡中的表达量

本研究分别通过定量 PCR 和蛋白质印迹技术检测了 *AMH* 基因在鸭不同等级卵泡中的表达情况。在 mRNA 水平上,*AMH* 基因在大白卵泡中的表达量显著高于等级卵泡 F5,在小黄卵泡中的表达量也显著高于等级卵泡 F5(图 1A)。在蛋白质水平上,AMH 蛋白在大白卵泡中的表达量显著高于小黄卵泡和等级卵泡 F5,但是在小黄卵泡中的表达量与等级卵泡 F5 无显著差异(图 1B)。此外,*AMH* 基因在蛋白质水平上的差异程度要低于 mRNA 水平。这些结果表明,随着卵泡的发育,*AMH* 基因的表达量逐渐降低。



A:*AMH* 基因的 mRNA 表达量;B:AMH 蛋白的表达量。F5:等级卵泡 F5;SYF:小黄卵泡;LWF:大白卵泡。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

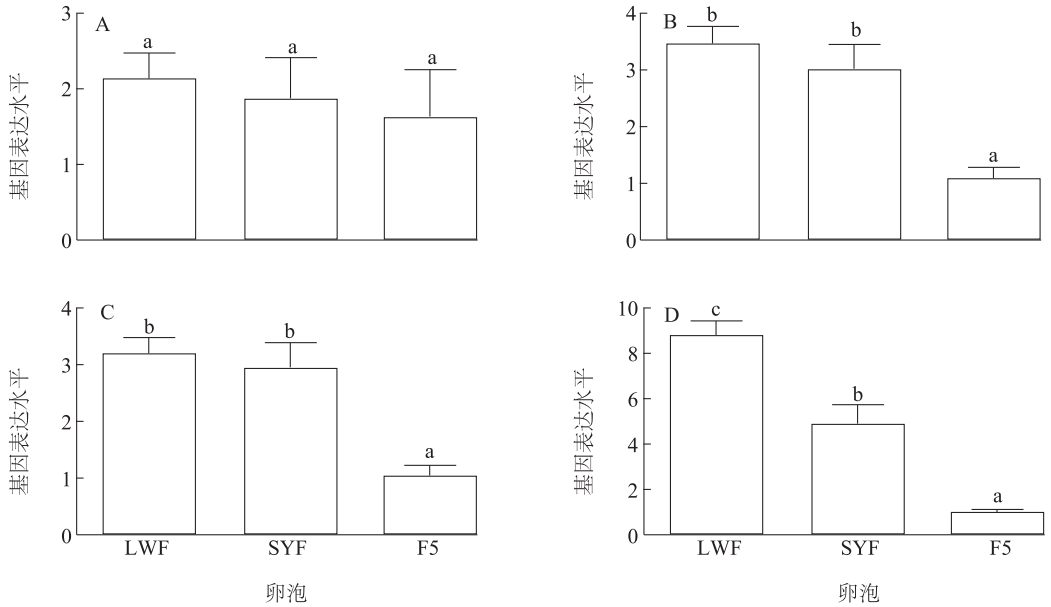
图 1　鸭不同等级卵泡中 *AMH* 基因的表达量

Fig.1　Expression of *AMH* gene in various-sized follicles of duck

2.2　*AMH* 基因启动子区相关转录因子在鸭不同等级卵泡中的表达量

本研究通过定量 PCR 技术分别检测了 *SOX9*(Sex determining region Y-box 9,SRY 相关基因 9)、*SF1*、*GATA4* 和 *WT1* 这 4 种转录因子在鸭卵巢不同等级卵泡中的表达量。在 mRNA 水平上,*SOX9* 基因在不同等级卵泡中的表达量无显著差异(图 2A);*SF1* 和 *GATA4* 基因在大白卵泡和小黄卵泡中的表达量显著高于等级卵泡 F5(图 2B 和图 2C);*WT1* 基因在大白卵泡和小黄卵泡中的表达量也显

著高于等级卵泡 F5(图 2D)。这些结果表明,随着卵泡的发育,*SF1*、*GATA4* 和 *WT1* 基因的表达量逐渐降低。



A~D:分别为 *SOX9*、*SF1*、*GATA4* 和 *WT1* 基因的 mRNA 表达量。F5:等级卵泡 F5;SYF:小黄卵泡;LWF:大白卵泡。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 2 鸭不同等级卵泡中转录因子 *SOX9*、*SF1*、*GATA4* 和 *WT1* 的表达量

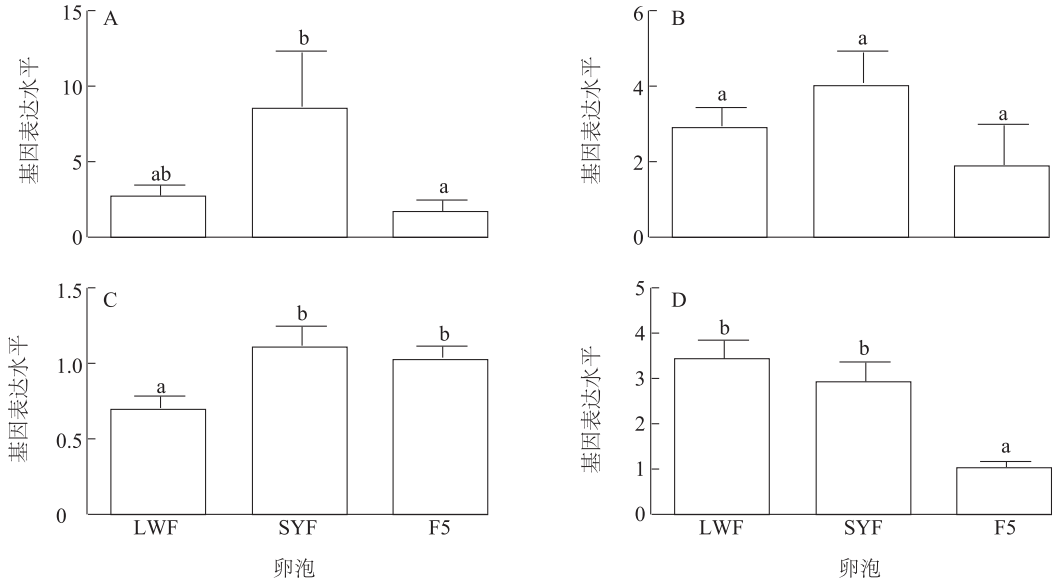
Fig.2 Expression of *SOX9*, *SF1*, *GATA4* and *WT1* in various-sized follicles of duck

2.3 *AMHR2* 和 *AMH* 相关调控基因在鸭不同等级卵泡中的表达量

本研究通过定量 PCR 技术分别检测了 *AMHR2*、*FSHR*、*CYP19A1* 和 *BMP6* 这 4 种基因在鸭卵巢不同等级卵泡中的表达量。在 mRNA 水平上,*AMHR2* 基因在小黄卵泡的表达量显著高于等级卵泡 F5(图 3A);*FSHR* 基因在不同等级卵泡中的表达量无显著差异(图 3B);*CYP19A1* 基因在小黄卵泡和等级卵泡 F5 中的表达量显著高于大白卵泡(图 3C);*BMP6* 基因在大白卵泡和小黄卵泡中的表达量显著高于等级卵泡 F5(图 3D)。这些结果表明,随着卵泡的发育,*CYP19A1* 基因的表达量逐渐升高,*AMHR2* 和 *BMP6* 基因的表达量逐渐降低。

3 讨 论

鉴于 *AMH* 基因在哺乳动物和鸡卵泡发育中的重要作用,本研究通过定量 PCR 技术检测了鸭卵巢不同等级卵泡中 *AMH* 基因的表达情况。结果发现 *AMH* 基因的 mRNA 表达量随着卵泡的发育逐渐降低,这与 Johnson 等在产蛋鸡中的研究结果相一致[10],表明 *AMH* 基因在禽类中具有保守的生物学功能。鉴于哺乳动物 AMH 抗体可用于检测禽类 AMH 蛋白表达[12],本研究还从蛋白质水平上验证了 *AMH* 基因在卵泡发育中的表达规律。在哺乳动物中,*AMH* 基因的起始转录需要转录因子 *SOX9* 的参与,而转录因子 *SF1*、*WT1* 和 *GATA4* 能够协同 *SOX9* 增强 *AMH* 基因的表达[13]。但是,Oreal 等[14]在鸡胚中发现 *AMH* 基因的起始转录不需要转录因子 *SOX9* 的参与,表明 *AMH* 基因转录的调控机制在禽类与哺乳动物之间是非保守的。本研究通过定量 PCR 技术分别检测了这 4 种转录因子在鸭卵巢不同等级卵泡中的表达情况。结果发现,除了 *SOX9* 基因外,*SF1*、*WT1* 和 *GATA4* 基因的 mRNA 表达量随着卵泡的发育逐渐降低,与 *AMH* 基因的表达趋势相一致,表明这 3 种转录因子可能在 *AMH* 转录调控中发挥重要作用。其中,Takada 等[15]在鸡胚中已经证实 *SF1* 能够结合到 *AMH* 基因启动子区并激活其转录。因此,下一步我们需要证实 *WT1* 和 *GATA4* 是否能够结合到禽类 *AMH* 基因启动子区并激活其转录。



A~D:分别为 *AMHR2*、*FSHR*、*CYP19A1* 和 *BMP6* 基因的 mRNA 表达量。F5:等级卵泡 F5;SYF:小黄卵泡;LWF:大白卵泡。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 3　鸭不同等级卵泡中 *AMHR2*、*FSHR*、*CYP19A1* 和 *BMP6* 基因的表达量

Fig.3　Expression of *AMHR2*, *FSHR*, *CYP19A1* and *BMP6* genes in various-sized follicles of duck

在哺乳动物中的研究结果表明,AMH 抑制生长卵泡对 FSH 敏感性是通过调控 FSHR 信号通路实现的。因此,本研究通过定量 PCR 技术分别检测了 *AMHR2*、*FSHR* 和 *CYP19A1* 基因的表达情况。结果发现,*AMHR2* 基因的 mRNA 表达量在等级卵泡中显著降低,与 *AMH* 基因的表达趋势相似,推测 AMH 在卵泡发育中的重要作用是由其受体 AMHR2 介导的。尽管 *FSHR* 基因的表达量在不同等级卵泡间无显著差异,但是 *CYP19A1* 基因的表达量随着卵泡的发育逐渐升高,与 *AMH* 基因的表达趋势相反,推测 *AMH* 基因具有抑制 FSHR 信号通路的功能,而且这种作用是通过影响 FSHR 信号通路的下游因子来调控类固醇激素的合成实现的。在鸡中,Ocón-grove 等[11]发现 *BMP6* 和 *AMH* 基因在卵泡发育中具有相似的表达模式,并且 BMP6 能以剂量依赖关系促进鸡等级前卵泡颗粒细胞中 *AMH* 基因的表达,表明 *AMH* 基因的表达受到卵巢局部生长因子的调控。在本研究中,我们也发现 *BMP6* 和 *AMH* 基因在鸭不同等级卵泡中的表达趋势一致,但是 BMP6 是否能够促进 *AMH* 基因的表达需要进一步的试验验证。

综上所述,*AMH* 基因在鸭卵泡发育过程中发挥重要作用,其在等级前卵泡中的高表达量可能有助于维持颗粒细胞未分化的状态,且可能是通过抑制 FSHR 信号通路来实现的。

参考文献:

[1] CATE R L, MATTALIANO R J, HESSION C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells [J]. Cell, 1986, 45(5): 685-698.

[2] JOST A, VIGIER B, PREPIN J, et al. Studies on sex differentiation in mammals [J]. Recent Prog Horm Res, 1973, 29: 1-41.

[3] DURLINGER A L, KRAMER P, KARELS B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary[J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5789-5796.

[4] DURLINGER A L, GRUIJTERS M J, KRAMER P, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2001, 142(11): 4891-4899.

[5] PELLATT L, RICE S, DILAVER N, et al. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells [J]. Fertil Steril, 2011, 96(5): 1246-1251.

[6] CHANG H M, KLAUSEN C, LEUNG P C, et al. Antimullerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells [J]. Fertil Steril, 2013, 100(2): 585-592.

[7] JOSSO N, CLEMENTE N. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family [J]. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(2): 91-97.

[8] BAARENDS W M, VAN HELMOND M J, POST M, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct [J]. Development, 1994, 120(1): 189-197.

[9] VISSER J A. AMH signaling: from receptor to target gene [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 211(1/2): 65-73.

[10] JOHNSON P A, KENT T R, URICK M E, et al. Expression and regulation of anti-mullerian hormone in an oviparous species, the hen [J]. Biol Reprod, 2008, 78(1): 13-19.

[11] OCÓN-GROVE O M, POOLE D H, JOHNSON A L. Bone morphogenetic protein 6 promotes FSH receptor and anti-Müllerian hormone mRNA expression in granulosa cells from hen prehierarchal follicles [J]. Reproduction, 2012, 143(6): 825-833.

[12] JOHNSON P A. Follicle selection in the avian ovary [J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47(S4): 283-287.

[13] LASALA C, CARRÉ-EUSÈBE D, PICARD J Y, et al. Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species [J]. DNA Cell Biol, 2004, 23(9): 572-585.

[14] OREAL E, PIEAU C, MATTEI M G, et al. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular *SOX9* expression [J]. Dev Dyn, 1998, 212(4): 522-532.

[15] TAKADA S, WADA T, KANEDA R, et al. Evidence for activation of *Amh* gene expression by steroidogenic factor 1 [J]. Mech Dev, 2006, 123(6): 472-480.

(责任编辑:陈海霞)