

李 樊, 李隐侠, 舒嘉傲, 等. 热应激通过钙信号调控湖羊卵巢颗粒细胞凋亡和雌激素合成[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1278-1285.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.015

热应激通过钙信号调控湖羊卵巢颗粒细胞凋亡和雌激素合成

李 樊^{1,2,3}, 李隐侠^{1,2,3}, 舒嘉傲^{1,2,3}, 孟春花^{1,2,3}, 张 俊^{1,2,3}, 钱 勇^{1,2,3}, 曹少先^{1,2,3}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 3.农业农村部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 热应激严重影响动物的繁殖性能, 但热应激是如何通过调控绵羊卵巢颗粒细胞功能进而调控绵羊繁殖的相关研究较少。本研究以湖羊卵巢颗粒细胞为研究对象, 利用 Real-time PCR、流式细胞技术、Western blot、ELISA 等方法探讨热应激对湖羊卵巢颗粒细胞钙信号通路、细胞凋亡和雌激素合成的影响。结果表明, 热应激后, 湖羊卵巢颗粒细胞中钙离子浓度显著上升 ($P < 0.05$), 钙离子信号通路中相关基因 *CACNA1B*、*CACNA1C*、*RYR1*、*CAMK2* 表达量显著升高, 线粒体分裂蛋白 *FIS1* 表达量显著上升, 促凋亡蛋白家族代表基因 *BAX* 和抗凋亡蛋白代表基因 *BCL2* mRNA 表达量比值 (*BAX/BCL2*) 显著上升, 细胞凋亡率增加; 雌二醇合成关键酶 *CYP19A1* 表达量显著下调, 雌二醇含量显著下降 ($P < 0.05$)。热应激卵巢颗粒细胞中加入钙离子螯合剂 (BAPTA-AM) 明显降低钙离子浓度, 同时减少细胞凋亡, 缓解热应激造成的卵巢颗粒细胞雌二醇含量下调。综上表明, 热应激打开了湖羊卵巢颗粒细胞膜电压门控钙离子通道和内质网膜上钙离子释放通道, 导致细胞质中钙离子浓度上升, 促进卵巢颗粒细胞凋亡, 引起雌二醇含量下调。

关键词: 热应激; Ca^{2+} ; 卵巢颗粒细胞; 细胞凋亡; 雌二醇

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1278-08

Regulation of heat stress on ovarian granulosa cell apoptosis and estrogen synthesis in Hu sheep through calcium signal

LI Fan^{1,2,3}, LI Yin-xia^{1,2,3}, SHU Jia-ao^{1,2,3}, MENG Chun-hua^{1,2,3}, ZHANG Jun^{1,2,3}, QIAN Yong^{1,2,3}, CAO Shao-xian^{1,2,3}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Agricultural Germplasm Resources Protection and Utilization Platform, Nanjing 210014, China; 3. Key Laboratory of Combination of Planting and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: Heat stress seriously affects the reproductive performance of animals, but there are few studies on the effects of heat stress on sheep reproduction by regulating the function of sheep ovarian granulosa cells. In this study, Hu sheep ovarian granulosa cells were used as the research objects, and real-time PCR, flow cytometry, Western blot, ELISA

and other methods were used to investigate the effects of heat stress on calcium signaling pathway, apoptosis and estrogen synthesis in Hu sheep ovarian granulosa cells. The results showed that after heat stress, the concentration of Ca^{2+} in Hu sheep ovarian granulosa cells increased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of calcium signaling pathway-related genes *CACNA1B*, *CACNA1C*, *RYR1*

收稿日期: 2021-12-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(20)3013]; 国家自然科学基金项目 (31902155)

作者简介: 李 樊 (1997-), 女, 湖北孝感人, 硕士研究生, 主要从事动物分子生物学研究。 (E-mail) lf15205159110@163.com

通讯作者: 曹少先, (E-mail) sxcao@jaas.ac.cn

and *CAMK2* and mitochondrial fission protein *FIS1* were significantly increased, the mRNA expression ratio of pro-apoptotic protein family representative gene *BAX* and anti-apoptotic protein family representative gene *BCL2* (*BAX/BCL2*) increased significantly, and the apoptosis rate increased. The expression of *CYP19A1*, the key enzyme in estradiol synthesis, was down-regulated, and the content of estradiol was significantly decreased ($P<0.05$). The addition of calcium chelator BAPTA-AM to heat-stressed ovarian granulosa cells significantly reduced Ca^{2+} concentration, decreased cell apoptosis, and alleviated the down-regulation of estradiol content in ovarian granulosa cells caused by heat stress. In conclusion, heat stress opens the voltage-gated calcium ion channel on the cell membrane of Hu sheep ovarian granulosa cells and the calcium ion release channel on the endoplasmic reticulum membrane, which leads to the increase of calcium ion concentration in the cytoplasm, promotes the apoptosis of ovarian granulosa cells, and causes the down-regulation of estradiol content.

Key words: heat stress; Ca^{2+} ; ovarian granulosa cells; cell apoptosis; estradiol

随着绵羊养殖集约化发展和全球变暖加剧,热应激对绵羊生产性能的不利影响日益严重。有研究表明,热应激组公羔羊的生长速度和饲料利用率均显著低于正常组的羔羊^[1];夏季公羔羊的生长速度、饲料利用率和腰肉产量均显著低于冬季^[2]。在交配周期内,环境温度大于等于 32 ℃ 的条件下每增加 1 d,母羊的受精率和产羔率分别下降 2.7% 和 3.5%^[3-4],说明交配期间的高温对受精、胚胎存活都产生不利影响。热应激影响绵羊卵母细胞后期的发育,且延长发情周期,导致受精率和胚胎成活率明显下降。

钙离子通过在细胞内外形成离子梯度,在细胞内充当第二信使。钙稳态是细胞信号转导的中心,受到许多离子通道、泵和交换器的严格调控^[5]。在非兴奋性细胞中,大多数细胞内钙离子的释放是通过以下 3 种通道进行的:(1)内质网膜上的 1,4,5-三磷酸肌醇受体(*IP3Rs*)的钙离子通道;(2)内质网中的 *RyR* (*Ryanodine*)受体的钙释放通道;(3)溶酶体样细胞器中的烟酸腺嘌呤二核苷酸(*NAADP*)钙离子通道^[6]。

控制钙离子释放或者积累的钙信号通路在调控细胞周期、生长、发育和繁殖等方面发挥重要作用。钙离子浓度在细胞分裂间期(DNA 合成前期/DNA 复制期、DNA 合成后期/细胞分裂期)和细胞分裂中期到后期的相变期间显著增加^[7-9]。在斑马鱼和非洲爪蟾胚胎发育过程中都有观察到细胞间的钙波存在^[10-11],在哺乳动物卵子激活和胚胎发育中也发现了钙信号的重要作用^[12]。

本研究拟以湖羊卵巢颗粒细胞为对象,研究热应激对细胞钙离子浓度、钙离子通路相关基因表达、细胞凋亡和雌激素合成的影响,以期为解析热应激影响绵羊繁殖性能的分子机制提供理论依据,为缓

解夏季绵羊热应激提供候选靶点。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜的湖羊卵巢从江苏省太仓市东林屠宰场采集,放入装有 37 ℃ 生理盐水的保温杯中立即带回实验室。生理盐水冲洗 3 遍后用手术剪剪掉卵巢周围组织,注射器抽取 3~5 mm 卵泡的卵泡液后轻轻注入 15 ml 的离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,再用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)清洗 2 遍后弃去 PBS;用预热的 DMEM/F-12 培养基重悬细胞并将细胞接种于细胞培养 6 孔板中,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中;24 h 后观察细胞贴壁情况,用 PBS 清洗细胞,更换培养基,进行后续试验。

1.2 试验处理

湖羊卵巢颗粒细胞培养 24 h,贴壁后分为 3 组,对照组(37 ℃)、热应激组(42 ℃)和热应激+钙离子螯合剂(BAPTA-AM)组(42 ℃),分别在 5% CO_2 细胞培养箱中培养 4 h 后收集细胞,进行 RNA 和蛋白质提取,每项试验进行 3 个生物学重复。

1.3 RNA 提取和逆转录

用 RNA 提取试剂盒(BioTeke 公司产品)抽提 RNA,Nandrop2000 分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]测定 RNA 质量浓度。采用逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)将 RNA 逆转录为 cDNA;20 μl 反应体系为:RNA 1 000 ng,4×gDNA wiper Mix 4 μl ,RNase Free dH_2O 16 μl ,混合均匀,42 ℃ 2 min 去除基因组 DNA,然后加入 5×HiScript II qRT SuperMix II 4 μl ,吹打混匀,50 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。反转录后所得的 cDNA 产物可于-20 ℃或-80 ℃保存备用。

1.4 引物合成和 real-time PCR

根据绵羊相关基因的 NCBI 序列,采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物,以 β -actin 为内参基因,进行 real-time PCR 试验(表 1)。20.0 μ l 反应体系:2.0 μ l cDNA,10.0 μ l 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品),0.4 μ l 上游引物,0.4 μ l 下游引物,7.2 μ l ddH₂O。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;最后 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样本重复 3 次。

表 1 real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for real-time PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
CACNA1B-F	AACGTCACCTCGCATGGGTA
CACNA1B-R	TCCTTCTGCTTGGCTTTCC
FIS1-F	CAGCGGGATTATGCTTCTT
FIS1-R	GAGCCGTTCCAGTTCTTT
CACNA1C-F	TGCCGCAACTACTTCAACA
CACNA1C-R	AGGACTCGCAGGATCTTCA
BCL2-F	CGCATCGTGGCCTTCTTT
BCL2-R	CGGTTTCAGGTAAGTTCATC
RYR1-F	CAAGGCAACATCCACAGC
RYR1-R	AAGCAGCCAATGACAAGGT
BAX-F	CGAGTGGCGGCTGAAAT
BAX-R	GGTCTGCCATGTGGGTGTC
CAMK2A-F	GTCCAGTTCCAGCGTTCA
CAMK2A-R	TCCGCACTTTGCTGCTTT
CYP19A1-F	AGGTCATCCTGGTACCCTTCTG
CYP19A1-R	CGGTCGCTGGTCTCGTCTGG
MFN2-F	TGCTCTCAAGGTTTACAAGA
MFN2-R	TCCATTTGACTCCGCACA
β -actin-F	AGCCTTCCTTCTGGGCATGGA
β -actin-R	GGACAGCACCGTGTGGCGTAGA

1.5 Western blot 分析

将卵巢颗粒细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度达到 80%时,将培养板分别置于 37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C 和 42 $^{\circ}$ C+BAPTA-AM 条件下培养 4 h,收集细胞蛋白质样品,BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质质量浓度,100 $^{\circ}$ C 10 min 变性。处理好的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量为 30 μ g,60 V 电泳

3.0 h,然后进行转膜(100 V,30 min),将膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1.5 h,用 GAPDH 蛋白(Proteintech 公司产品,货号 60004-1-Ig,稀释倍数 1:3 000)、BAX 蛋白(Proteintech 公司产品,货号 50599-2-Ig,稀释倍数 1:2 000)、BCL2 蛋白(Proteintech 公司产品,货号 66799-1-Ig,稀释倍数 1:2 000)、MFN2 蛋白(AFFINITY 公司产品,货号 DF8106,稀释倍数 1:2 000)、FIS1 蛋白(AFFINITY 公司产品,货号 DF12005,稀释倍数 1:1 000)、CYP19A1 蛋白(AFFINITY 公司产品,货号 DF6884,稀释倍数 1:1 000)抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,含吐温 20 的 Tris 盐酸(TBST)缓冲液洗膜(1 次 10 min,3 次),二抗室温孵育 2 h,洗膜,显影,image J 灰度值分析。

1.6 钙离子浓度测定方法

去除颗粒细胞的培养液,用 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)缓冲液清洗 3 遍,每孔加入 200 μ l Fluo-4 AM(Fluo-4 是钙离子荧光探针,AM 是一种乙酰甲酯衍生物)工作液(终浓度为 1 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,随后用 HBSS 洗涤 3 次,洗涤后再孵育 30 min 以确保 Fluo-4 AM 在细胞内完全转变成 Fluo-4。荧光显微镜检测荧光并拍照分析,以确定细胞内钙离子浓度的变化。

1.7 流式细胞术检测卵巢颗粒细胞的细胞凋亡率

湖羊卵巢颗粒细胞在各处理下培养 48 h 后,胰酶[不含乙二胺四乙酸(EDTA)]消化 5 min,冷 PBS 缓冲液清洗 2 次,100 μ l 1 \times binding buffer 重悬,加入 5 μ l FITC Annexin V 和 5 μ l PI 染色液混匀,避光孵育 15 min,加 400 μ l 1 \times binding buffer 混匀,染色后的样品于 1 h 内在流式细胞仪中进行细胞凋亡水平的检测,结果用 FlowJo V7.6 软件进行分析。

1.8 数据分析

采用 SPSS16.0 软件中 t 检验以及单因素方差分析进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 热应激对湖羊卵巢颗粒细胞钙离子浓度的影响

利用 Fluo-4 钙离子荧光探针检测热应激前后湖羊卵巢颗粒细胞中钙离子浓度的变化。结果(图 1)显示,与对照组相比,热应激组湖羊卵巢颗粒细胞的钙离子荧光强度明显增强,说明热应激诱导卵巢颗粒细胞钙离子浓度升高。加入 BAPTA-AM 后,热应激组的钙离子浓度明显下调。

2.2 热应激对湖羊卵巢颗粒细胞中钙离子信号通路相关基因表达的影响

钙离子是细胞的第二信使,热应激导致卵巢颗粒细胞钙离子浓度上升,可引起细胞膜的去极化。以钙离子信号通路中细胞膜去极化通路中 *CACNA1C*、*CACNA1B*、*RYR1* 和 *CAMK2* 共 4 个基因为对象,real-

time PCR 检测热应激对这 4 个基因 mRNA 表达的影响。结果(图 2)表明,热应激组湖羊卵巢颗粒细胞中钙离子信号通路中 *CACNA1B*、*CACNA1C*、*RYR1*、*CAMK2* 基因表达均显著或极显著上调,但是热应激+钙离子螯合剂组,*CAMK2* 基因表达显著下调($P<0.05$)。

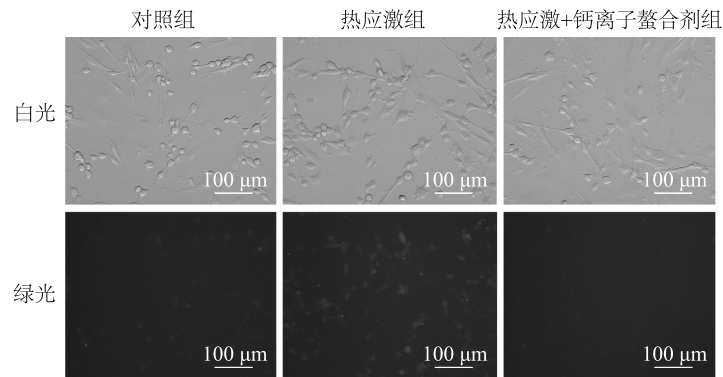
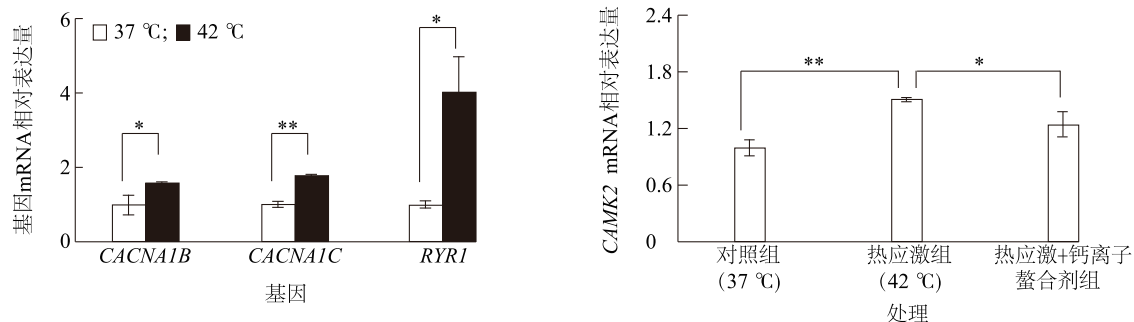


图 1 热应激对湖羊卵巢颗粒细胞钙离子浓度的影响

Fig.1 Effects of heat stress on the calcium concentration in Hu sheep ovarian granulosa cells



* 表示差异达 0.05 显著水平; ** 表示差异达 0.01 显著水平。

图 2 热应激对绵羊卵巢颗粒细胞中钙离子信号通路中相关基因 mRNA 表达的影响

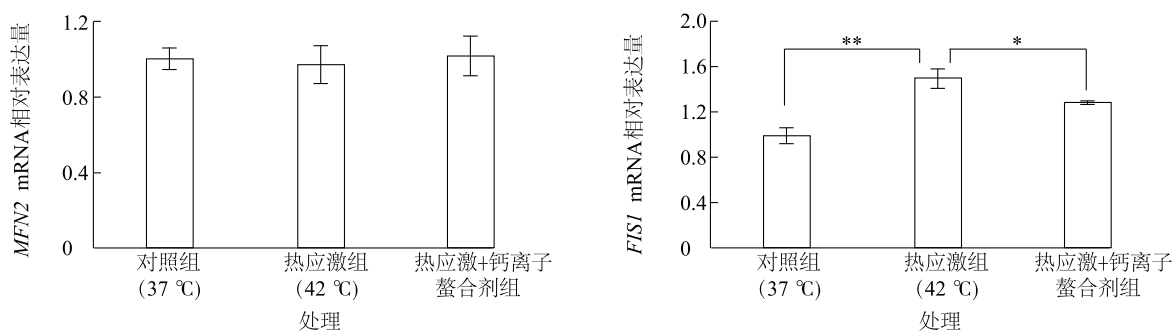
Fig.2 Effects of heat stress on mRNA expression of related genes in calcium signaling pathway in ovine ovarian granulosa cells

2.3 热应激通过钙信号调控湖羊卵巢颗粒细胞线粒体结构相关蛋白质表达

以线粒体融合蛋白 2 (MFN2) 和分裂蛋白 (FIS1) 为对象,检测热应激后其在卵巢颗粒细胞中表达水平的变化。Real-time PCR (图 3) 和 Western blot 结果 (图 4) 显示,与对照组相比,热应激组线粒体融合蛋白基因 *MFN2* 无论是 mRNA 表达水平还是蛋白质表达水平均无显著变化,但是热应激组线粒体分裂蛋白基因 *FIS1* 的 mRNA、蛋白质表达水平均显著提高。热应激+钙离子螯合剂组, *FIS1* 基因的 mRNA、蛋白质表达水平均较热应激组显著下调。

2.4 热应激通过钙信号调控湖羊卵巢颗粒细胞凋亡

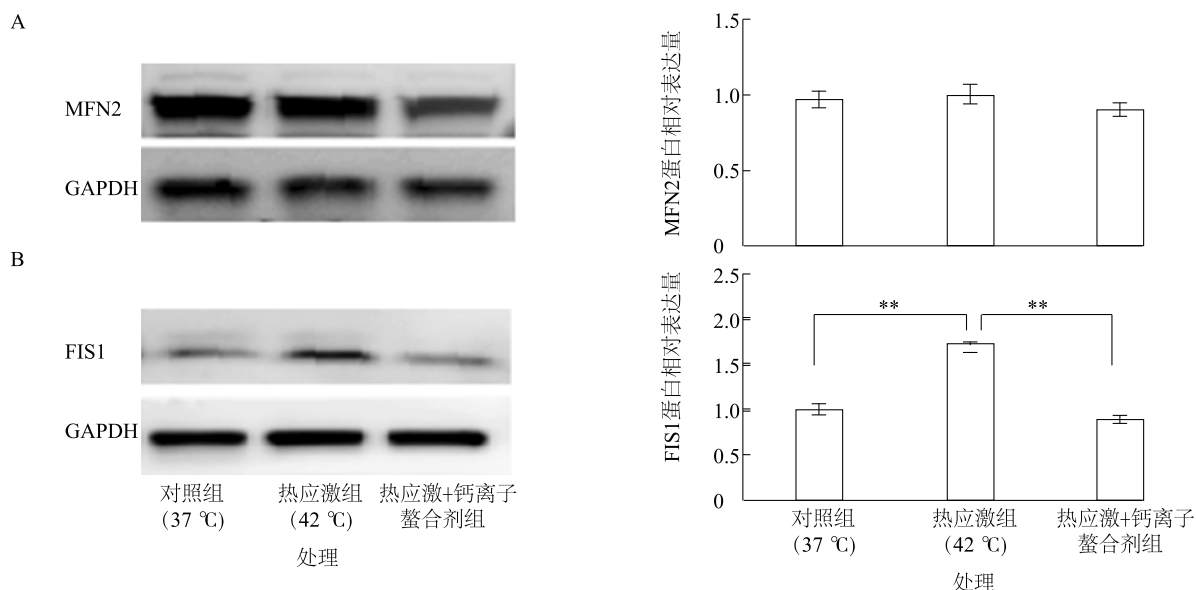
流式细胞仪检测结果 (图 5) 显示,与对照组相比,热应激组细胞凋亡率显著增加 ($P<0.05$),热应激+钙离子螯合剂组细胞凋亡率下降。与对照组相比,热应激组促凋亡蛋白家族代表基因 *BAX* 和抗凋亡蛋白家族代表基因 *BCL2* 在卵巢颗粒细胞中 mRNA 表达量的比值 (*BAX/BCL2*) 显著上升,但是加入钙离子螯合剂后比值下降。Western blot 结果表明,热应激组 *BAX* 蛋白表达量上升, *BCL2* 蛋白表达量下降,加入钙离子螯合剂后结果相反。说明热应激通过钙离子信号调控 *BAX* 基因表达上调和 *BCL2* 基因表达下调,调控湖羊卵巢颗粒细胞的凋亡。



* 表示差异达 0.05 显著水平; ** 表示差异达 0.01 显著水平。

图 3 热应激通过钙离子信号对湖羊卵巢颗粒细胞线粒体结构相关蛋白基因 mRNA 表达的调控

Fig.3 The regulation of heat stress on the mRNA expression of mitochondrial structure related protein genes in Hu sheep ovarian granulosa cells through calcium signal



* 表示差异达 0.05 显著水平; ** 表示差异达 0.01 显著水平。

图 4 热应激通过钙离子信号对湖羊卵巢颗粒细胞线粒体结构相关蛋白表达的调控

Fig.4 The regulation of heat stress on the expression of mitochondrial structure related proteins in Hu sheep ovarian granulosa cells through calcium signal

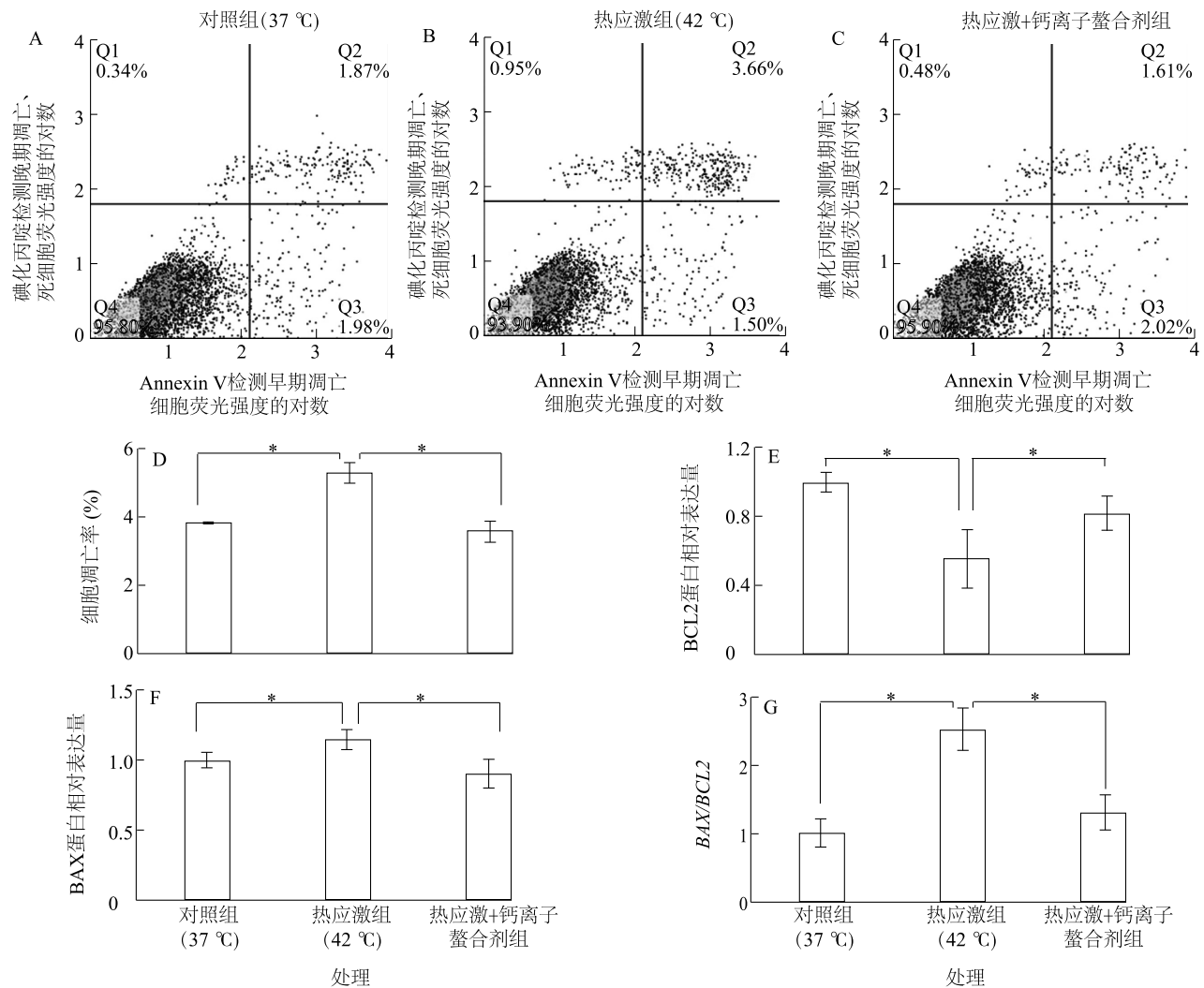
2.5 热应激通过钙信号调控湖羊卵巢颗粒细胞功能

为了研究热应激对湖羊卵巢颗粒细胞功能的影响,本研究用 ELISA 方法检测热应激后卵巢颗粒细胞雌二醇的水平。图 6 显示,与对照组相比,热应激组雌二醇含量显著下降 ($P < 0.05$);热应激+钙离子螯合剂组与热应激组相比,雌二醇含量显著上升 ($P < 0.05$)。与对照组相比,雌激素合成关键基因 *CYP19A1* 的 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平在热应激组卵巢颗粒细胞中均显著下降 ($P < 0.05$),但是热应激+钙离子螯合剂组与热应激组相比显著上升 ($P < 0.05$)。说明热应激通过钙离子浓度调控湖

羊卵巢颗粒细胞雌二醇合成能力,影响卵巢颗粒细胞的功能。

3 讨论

热应激对动物健康有重要影响,可显著降低生产力和繁殖性能^[13-14]。大量研究结果表明,很多基因和信号通路参与了热应激调控动物生产性能的过程,钙信号通路就是其中之一^[15-17]。有研究发现, Ca^{2+} -CaMK2-HSF1 信号通路调控斑马鱼的热应激^[17]。本研究以湖羊卵巢颗粒细胞为对象,发现热应激处理后,卵巢颗粒细胞中钙离子浓度显著上升,说明热应激导致卵巢颗粒细胞钙离子浓度发生变



A~C:流式细胞仪检测对照组(37 °C)、热应激组(42 °C)、热应激+钙离子螯合剂组湖羊卵巢颗粒细胞凋亡情况;D:流式细胞仪检测不同处理卵巢颗粒细胞凋亡率;E~F:热应激对颗粒细胞 BCL2、BAX 蛋白表达水平的影响;G:热应激对颗粒细胞促凋亡蛋白家族代表基因 BAX 和抗凋亡蛋白代表基因 BCL2 mRNA 表达量比值(BAX/BCL2)的影响。*表示差异达0.05显著水平。Annexin V:钙离子依赖性磷脂结合蛋白。

图5 热应激对湖羊卵巢颗粒细胞凋亡的影响

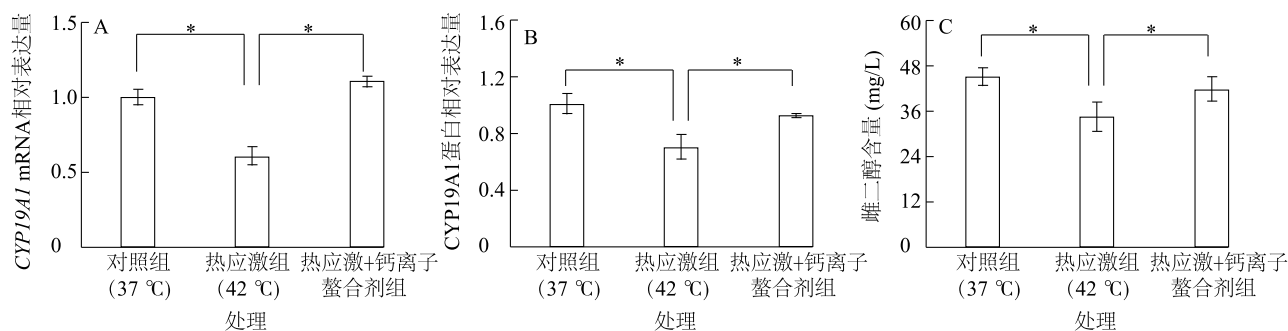
Fig.5 The effects of heat stress on apoptosis of Hu sheep ovarian granulosa cells

化,破坏细胞内的钙平衡。

热应激是如何调控卵巢颗粒细胞钙离子浓度变化的呢?钙离子通过其进入通道和释放通道进出细胞膜和细胞器,以满足机体各项生理功能的需要^[5]。电压门控钙离子通道是一种钙进入通道,镶嵌于细胞膜上,其中央是高度选择性的亲水通道,允许适当电荷和适当大小的钙离子通过^[18]。本研究发现热应激后电压门控钙离子通道基因 *CACNA1C*、*CACNA1B* 的 mRNA 表达水平显著上升,说明热应激打开了细胞膜上的钙进入通道。*RYR1* 是内质网钙离子释放通道的一个关键受体^[19],是内质网钙池的

钙离子进入细胞浆的重要通道之一。热应激后湖羊卵巢颗粒细胞中 *RYR1* 表达量显著上升,说明热应激引起卵巢颗粒细胞中内质网应激,内质网中的钙离子通过 *RYR1* 受体进入细胞质。总之,热应激打开卵巢颗粒细胞钙离子进入通道和释放通道,导致细胞外钙离子进入细胞质,内质网中的钙离子释放到细胞质,导致细胞质内钙离子浓度上调。

释放到细胞质中的 Ca^{2+} 很快与 Ca^{2+} 结合蛋白结合,成为信号转导途径的激活成分,钙调素就是其中之一。钙调蛋白是一种依赖于钙离子活性的蛋白质,与钙离子结合形成 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物,从而启动



A~B:热应激对卵巢颗粒细胞 *CYP19A1* mRNA、蛋白质表达水平的影响;C:热应激对卵巢颗粒细胞雌二醇水平的影响; * 表示差异达 0.05 显著水平。

图 6 热应激通过钙离子信号调控卵巢颗粒细胞雌二醇合成

Fig.6 Regulation of heat stress on estradiol synthesis in ovarian granulosa cells by calcium signal

下游多种信号通路^[20]。热应激导致卵巢颗粒细胞钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (*CAMK2*) 表达量显著升高,但是在热应激卵巢颗粒细胞中加入钙离子螯合剂后,*CAMK2* 基因表达量显著下调,说明热应激导致卵巢颗粒细胞钙离子浓度上升,诱导 *CAMK2* 表达上调,进而启动下游其他信号通路,参与调控细胞的功能。

线粒体为细胞正常生长代谢提供必需的能量,线粒体稳态对维持机体的生物学功能具有非常重要的作用^[21-23]。融合和分裂伴随着线粒体的一生,维持着线粒体的稳态^[24]。有研究发现,氧化应激会损伤线粒体,破坏线粒体稳态^[25]。本研究选择调控线粒体融合和分裂的 2 种蛋白质 MFN2、FIS1,探讨热应激导致钙离子浓度变化后对 MFN2、FIS1 表达的影响。结果发现在湖羊卵巢颗粒细胞中,热应激导致线粒体分裂基因 *FIS1* 表达量显著升高,降低细胞内钙离子浓度后 *FIS1* 基因表达水平恢复正常,说明热应激可能通过调控钙离子浓度来调控线粒体分裂基因 *FIS1* 的变化,进而诱导线粒体损伤。

BAX 作为促凋亡蛋白参与细胞凋亡,而 BCL2 蛋白可拮抗 BAX 的促凋亡效应,BAX/BCL2 失衡导致半胱天冬酶释放并引发半胱天冬酶级联发生,最终激活半胱天冬酶 3 导致细胞凋亡^[26-27]。本研究发现,热应激后绵羊卵巢颗粒细胞的细胞凋亡率显著上升,促凋亡蛋白基因 *BAX* 和抗凋亡蛋白基因 *BCL2* 的表达量比值显著上升;加入钙离子螯合剂后,*BAX/BCL2* 表达量比值显著下降,细胞凋亡率下降,表明热应激通过调控钙离子浓度的变化,引起 *BAX/BCL2* 表达量比值变化,进而诱导卵巢颗粒细

胞凋亡。

卵巢颗粒细胞是雌性动物卵巢卵泡的重要组成部分,颗粒细胞分泌雌二醇,促进卵泡的生长发育和卵母细胞的成熟,进而调控雌雄动物的生殖^[28]。本研究发现,热应激后调控雌激素合成关键基因 *CYP19A1* 的 mRNA、蛋白质表达水平均显著下降,但是加入钙离子螯合剂后 *CYP19A1* 的 mRNA、蛋白质表达水平显著上升;相应的,热应激后湖羊卵泡颗粒细胞分泌雌二醇的能力显著下降,钙离子螯合剂加入后能恢复由于热应激导致的雌二醇下降。说明热应激通过钙离子信号调控卵巢颗粒细胞凋亡,从而影响其细胞功能,进而影响动物的繁殖。

4 结 论

热应激导致卵巢颗粒细胞细胞膜上的钙离子进入通道(电压门控钙离子通道)和钙离子释放通道(RYR1 受体)打开,钙离子浓度上升,导致 *CAMK2* 蛋白表达上调,激活下游信号通路,诱导细胞凋亡,进而影响卵巢颗粒细胞的功能,调控绵羊的繁殖性能。

参考文献:

- [1] NICOLÁS-LÓPEZ P, MACÍAS-CRUZ U, MELLADO M, et al. Growth performance and changes in physiological, metabolic and hematological parameters due to outdoor heat stress in hair breed male lambs finished in feedlot [J]. International Journal Biometeorology, 2021, 65: 1451-1459.
- [2] MACÍAS-CRUZ U, SAAVEDRA O R, CORREA-CALDERÓN A, et al. Feedlot growth, carcass characteristics and meat quality of hair breed male lambs exposed to seasonal heat stress (winter vs. summer) in an arid climate [J]. Meat Science, 2020, 169:

- 108202.
- [3] MEZA-HERRERA C A, VICENTE-PEREZ A, OSORIO-MARIN Y, et al. Heat stress, divergent nutrition level, and late pregnancy in hair sheep: effects upon cotyledon development and litter weight at birth [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2015, 47 (5): 819-824.
- [4] KLEEMANN D O, WALKER S K. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues [J]. *Theriogenology*, 2005, 63 (9): 2416-2433.
- [5] SLUSARSKI D C, PELEGRI F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2007, 307(1): 1-13.
- [6] BERRIDGE M J, BOOTMAN M D, RODERICK H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4: 517-529.
- [7] RUSSA A D, MAESAWA C, SATOH Y. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in G1/S phase-synchronized cells [J]. *Journal of Electron Microscopy*, 2009, 58(5): 321-329.
- [8] PATEL R, HOLT M, PHILIPOVA R, et al. Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(12): 7958-7968.
- [9] HEIM A, TISCHER T, MAYER T U. Calcineurin promotes APC/C activation at meiotic exit by acting on both XErp1 and Cdc20 [J]. *EMBO Reports*, 2018, 19(12): e46433.
- [10] MARIN M. Calcium signaling in *Xenopus* oocyte [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 740: 1073-1094.
- [11] CHRISTOU M, FRASER T W K, BERG V, et al. Calcium signaling as a possible mechanism behind increased locomotor response in zebrafish larvae exposed to a human relevant persistent organic pollutant mixture or PFOS [J]. *Environmental Research*, 2020, 187: 109702.
- [12] MIAO Y L, WILLIAMS C J. Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: influence of subcellular localization [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79 (11): 742-756.
- [13] LI Y K, KONG L X, DENG M, et al. Heat stress-responsive transcriptome analysis in the liver tissue of Hu sheep [J]. *Genes*, 2019, 10(5): 395.
- [14] KUMAR D, DE K, SHEKHAWAT I, et al. Combined effect of heat and nutritional stress on superovulation of Malpura ewes in a semi-arid region [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 80: 158-163.
- [15] LI L, TAN H P, GU Z T, et al. Heat stress induces apoptosis through a Ca^{2+} -mediated mitochondrial apoptotic pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e111083.
- [16] LI Y X, FENG X P, WANG H L, et al. Transcriptome analysis reveals corresponding genes and key pathways involved in heat stress in Hu sheep [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24 (6): 1045-1054.
- [17] LI F, LONG Y, XIE J, et al. Generation of GCaMP6s-expressing zebrafish to monitor spatiotemporal dynamics of calcium signaling elicited by heat stress [J]. *International Journal Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5551.
- [18] 李双君, 潘 君, 崔玉红. 内皮细胞电压门控钙离子通道及其功能研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(6): 1061-1074.
- [19] LAVER D R. Ca^{2+} stores regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channels via luminal and cytosolic Ca^{2+} sites [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(10): 3541-3555.
- [20] HOEFLICH K P, IKURA M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms [J]. *Cell*, 2002, 108: 739-742.
- [21] 李文俊, 李 强, 钟良明, 等. 基于线粒体 DNA 控制区序列的珠江和长江水系光倒刺鲃群体遗传变异分析 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(11): 3121-3129.
- [22] 谢启明, 柯瑞林, 刘 帆, 等. 基于线粒体 D-loop 区分析安徽省 5 个翘嘴鲃养殖群体的遗传多样性 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(9): 143-147.
- [23] 邹 辉, 韦玲静, 黄 杰, 等. 基于线粒体 CO I 基因和 D-Loop 区序列的 7 个鲤群体遗传差异分析 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 1209-1216.
- [24] 陶 元, 彭凯歌, 但国蓉, 等. 线粒体融合/分裂对线粒体的质量控制作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(23): 4588-4590.
- [25] SLIMEN I B, NAJAR T, GHAM A, et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review [J]. *International Journal Hyperthermia*, 2014, 30(7): 513-523.
- [26] 马汉宇, 姬艳燕, 陈 伟, 等. 甘草次酸通过抑制 Caspase 3/Bax/Bcl-2 凋亡信号通路保护心脏骤停心肺复苏大鼠心脏功能 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(4): 28-33.
- [27] KARIMI A S, TAFVIZI F, TAJABADI E M. Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2019, 38(9): 1069-1081.
- [28] ROSENFELD C S, WAGNER J S, ROBERTS R M, et al. Intraovarian actions of oestrogen [J]. *Reproduction*, 2001, 122(2): 215-226.

(责任编辑:王 妮)