

FSH 对体外培养仔猪睾丸支持细胞 *skp2* 表达的影响

甘 瑞, 左 敬, 张国升, 朱峰伟, 孙 燕, 王鲜忠*, 张家骅

(西南大学动物科技学院 重庆市牧草与草食家畜重点实验室, 重庆 400716)

摘 要: 本研究旨在确定促卵泡素是否可通过 cAMP、Ca²⁺ 内流和细胞外调节的蛋白激酶 (ERK1/2) 调节培养条件下未成熟仔猪睾丸支持细胞中 S 期激酶相关蛋白 2 (*skp2*) 的表达。以培养的仔猪睾丸支持细胞为实验材料, 通过添加各种信号通路的抑制剂, 运用 Western blot 检测 *skp2*、p27^{kip1} 蛋白的表达, 运用实时荧光定量 PCR 检测 *skp2* mRNA 的表达。结果发现, 促卵泡素 (50 ng · mL⁻¹) 以时间依赖的方式促进了 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 这一作用在 30 min 时达到高峰。FSH (50 ng · mL⁻¹) 和 Forskolin (10 μmol · L⁻¹) 均促进了 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 但降低了 p27^{kip1} 蛋白的水平, 而 Rp-cAMP、Verapamil 和 U0126 都抑制了 FSH 的作用, 使 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达有所下降, 但提高了 p27^{kip1} 蛋白的表达, 但 3 种抑制剂单独作用时对 *skp2* 蛋白、mRNA 以及 p27^{kip1} 蛋白的表达没有显著影响 ($P > 0.05$)。这表明 FSH 可能主要通过影响 cAMP 的产生和 Ca²⁺ 内流, 并激活 ERK1/2 通路调节 *skp2* 蛋白的表达, 而 *skp2* 蛋白的水平与 p27^{kip1} 蛋白成负相关。

关键词: 促卵泡素; 睾丸支持细胞; S 期激酶相关蛋白 2; 细胞外信号调节的蛋白激酶 1/2; p27^{kip1}

中图分类号: S828; Q38

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)06-0765-07

The Effect of FSH on the Expression of *skp2* in Cultured Immature Boar Sertoli Cells

GAN Rui, ZUO Jing, ZHANG Guo-sheng, ZHU Feng-wei, SUN Yan,

WANG Xian-zhong*, ZHANG Jia-hua

(Chongqing Key Laboratory of Forage & Herbivorous Livestock,

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The objective of the study was to identify whether FSH regulated the expression of *skp2* mRNA and protein via the Ca²⁺ influx, cAMP and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) pathway in cultured immature boar Sertoli cells. In the study, cultured immature boar Sertoli cells were used as material, and Western blot and Real-time RT-PCR were used to detect the expression of *skp2* protein, p27^{kip1} protein and *skp2* mRNA, respectively. FSH (50 ng · mL⁻¹) increased the protein concentration and the mRNA abundance of *skp2* from 15 to 90 min ($P < 0.05$). FSH activity was peaking at 30 min, compared to control ($P < 0.05$). Both FSH (50 ng · mL⁻¹) and Forskolin (10 μmol · L⁻¹) increased the level of *skp2* protein and mRNA ($P < 0.05$), and reduced the expression of p27^{kip1} protein. Rp-cAMP, Verapamil and U0126 reduced FSH-induced the expression of *skp2* protein and mRNA, but increased the expression of p27^{kip1} protein ($P < 0.05$), however Rp-cAMP, Verapamil and U0126 alone had no significant effect on the expression of *skp2* protein, *skp2* mRNA and p27^{kip1} protein. The result indicate that FSH regulates the expression of *skp2* via affecting the production of cAMP, Ca²⁺ influx and ERK1/2 activation, and the expression levels of *skp2* and p27^{kip1} protein is negatively correlated.

Key words: follicle stimulant hormone; Sertoli cell; S-phase kinase-associated protein 2; extracellular signal-regulated kinase 1/2; p27^{kip1}

收稿日期: 2010-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31072183); 中央高校基本科研业务费专项项目 (XDJK2009B035)

作者简介: 甘 瑞 (1985-), 女, 四川新都人, 硕士生, 主要从事动物生殖生理的研究, E-mail: gangan.279@163.com

* 通讯作者: 王鲜忠, 副教授, Tel/Fax: 023-68251196, E-mail: xianzhong_wang@yahoo.com.cn

FSH 是调节睾丸支持细胞增殖的重要激素。外源性 FSH 具有促进仔猪睾丸支持细胞增殖的作用;仔猪血浆中 FSH 的高峰与支持细胞的增殖高峰一致^[1]。我们前期的研究发现,FSH 通过 cAMP、Ca²⁺ 激活 ERK1/2 调节支持细胞的增殖^[2],但其下游的事件仍不清楚。S 期依赖的蛋白激酶(S-phase kinase-associated proteins, skp2)作为一种原癌基因,能与发生泛素化的 p27^{kip1} 结合,使细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制因子(CKIs)p27^{kip1} 的 thr187 发生磷酸化并在 26S 的蛋白酶体上发生降解,进而激活 cyclin E/Cdk2,促进 G1/S 的进程^[3-4]。skp2 以细胞周期依赖的形式在 G1 晚期开始出现,S/G2 期高表达,然后其水平迅速下降^[5],FSH 在调节睾丸支持细胞增殖的过程中是否可以影响 skp2 的表达目前并不清楚,在睾丸支持细胞中 p27^{kip1} 的降解是否与 skp2 相关也不清楚。本试验利用体外培养的仔猪睾丸支持细胞,研究 FSH 是否通过 cAMP、Ca²⁺ 内流和 ERK1/2 调节 skp2 表达的机制,并分析 skp2 表达与 p27^{kip1} 降解的关系,为进一步认识促卵泡素调节睾丸支持细胞增殖的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验材料

DMEM/F-12 Hams、胎牛血清和 VI 型胶原酶购自 Gibco 公司;胰蛋白酶、FSH、Foskolin、U0126 和 Rp-cAMP 购自 Sigma 公司, Ca²⁺ 通道抑制剂 Verapamil 购自 ALEXIS; 荧光定量 PCR 试剂及 SYBR Green I 均购自 Invitrogen 公司;RNApreP pure cell 总 RNA 提取 kit 和 TIANScript RT Kit (TIANGEN BIOTECH), skp2 抗体、抗 p27^{kip1} 和抗 beta-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司;其余均为国产分析纯,购自鼎国生物合成。仔猪睾丸采自重庆本地 2~3 周龄长白仔猪。

1.2 细胞培养

仔猪睾丸支持细胞的分离培养方法参考文献^[6]。用血球计数板进行计数,并根据计数结果将细胞稀释至 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。利用 GATA-4 作为标记分子通过免疫荧光进行支持细胞纯度鉴定,具体步骤参照 McCoard 等的方法并略作改进^[7]。当纯度大于 90% 时符合要求。

1.3 FSH 作用不同时间对 skp2 表达的影响

细胞培养至 48 h 左右用 FSH($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[2] 处理 0、5、30、60、90 min,收集细胞提取 RNA 和蛋白质,用荧光定量 PCR 检测 skp2 mRNA 的丰度,用

Western blot 检测 skp2 蛋白的表达。

1.4 cAMP 对 FSH 诱导 skp2、p27^{kip1} 表达的影响

细胞培养至 48 h 左右,用 FSH($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、cAMP 促进剂 Foskolin($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 cAMP 抑制剂 Rp-cAMP($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 30 min,Rp-cAMP 在 FSH 处理前 2 h 加入。试验中 Foskolin 和 Rp-cAMP 的浓度按照说明书所设定的范围进行预试验,通过 CCK8 检测细胞数量来确定最终的使用浓度^[6]。细胞培养结束后,收集细胞,提取 RNA 和蛋白质,用荧光定量 PCR 检测 skp2 mRNA 的丰度,用 Western blot 检测 skp2 和 p27^{kip1} 蛋白的表达。

1.5 Ca²⁺ 内流对 FSH 诱导 skp2、p27^{kip1} 表达的影响

细胞培养至 48 h 左右,用 FSH($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Ca²⁺ 通道抑制剂 Verapamil($0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、FSH + Verapamil 处理 30 min,Verapamil 在 FSH 处理前 2 h 加入。试验中 Verapamil 的浓度按照说明书所设定的范围进行预试验,通过 CCK8 检测细胞数量来确定最终的使用浓度。培养结束后,收集细胞提取 RNA 和蛋白质,用荧光定量 PCR 检测 skp2 mRNA 的丰度,用 Western blot 检测 skp2 和 p27^{kip1} 蛋白的表达。

1.6 ERK1/2 对 FSH 诱导 skp2、p27^{kip1} 表达的影响

细胞培养至 48 h 左右,用 FSH($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、ERK 抑制剂 U0126($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、FSH+U0126 处理 30 min,并设空白对照,U0126 在 FSH 处理前 2 h 加入。试验中 U0126 的浓度按照说明书所设定的范围进行预试验,通过 CCK8 检测细胞数量来确定最终的使用浓度。培养结束后,收集细胞提取 RNA 和蛋白质,用荧光定量 PCR 检测 skp2 mRNA 的丰度,用 Western blot 检测 skp2 和 p27^{kip1} 蛋白的表达。

1.7 Western blot

用细胞刮刮取贴壁细胞,保存于 PBS 缓冲液中,每离心管加入 $200 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液和 $1 \mu\text{L}$ PMSF、 $5 \mu\text{L}$ DTT,冰上孵育 30 min,充分裂解,离心,取上清液为蛋白提取物。SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western bolt 按 Wang 等人^[6]所述的方法进行,试验中 skp2、p27^{kip1} 和 β -actin 抗体的稀释倍数分别为 1:300,所用二抗的稀释倍数为 1:4 000。

1.8 荧光定量 PCR

将收集的细胞用 RNApreP pure cell 总 RNA 提取 kit (TIANGEN BIOTECH) 进行总 RNA 提取,并通过电泳进行 RNA 纯度鉴定^[8]。取总 RNA $1 \mu\text{g}$,用 TIANScript RT Kit (TIANGEN BIOTECH) 进行逆转录反应,具体方法按试剂盒的说明书进行。根据 GenBank 中 18S rRNA、cyclin A2

的 cDNA 序列,取保守区设计引物,所有的引物至少跨越一个内含子,引物信息如表 1,引物由鼎国生物合成。荧光定量 PCR 的反应体系总体积为 25 μL ,包括 cDNA (1 μL),上下游引物(浓度为 20 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 0.5 μL ,2 \times mix 液 12.5 μL ,SYBR Green I(10 \times) 1 μL ,ddH₂O 为 9.5 μL 。荧光定量 PCR 的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56(18S rRNA)或 52 $^{\circ}\text{C}$ (*skp2*)退火

30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环。每个样品设 3 个重复。18S rRNA 在动物体内表达相当恒定,因此选其作为内参照进行实时荧光定量 PCR 分析。将目的基因的 Ct 值(Cycle threshold)与标准曲线相比较计算目的基因的浓度。以目的基因与内参的比值表示目的基因的相对含量。每个样品中的 Ct (Cycle threshold)值通过内参的 Ct 进行标准化处理,并与对照相比后所得的值再进行统计分析。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

基因 Gene	序列号码 Sequence number	序列位置/bp Sequence position	产物长度/bp Product length	序列(5'-3') Sequence
18S rRNA	NR_002170.3	621~993	373	F: CTCCACCAACTAAGAACGG R: GACGGACCAGAGCGAAA
<i>skp2</i>	NM-001171755	1 014~1 339	325	F: ACCTCCAACACCTATCCC R: CCTGCCTACTTTCCTGT

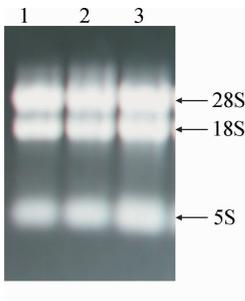
1.9 统计分析

每组数据设 3 个重复,结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,用 SPSS 16.0 One way ANOVA 和 Tukey's post hoc test 进行统计分析, $P < 0.05$ 确定为差异显著,图中不同的字母表示差异显著。

2 结果

2.1 RNA 的完整性检测

从图 1 可以看出总 RNA 电泳呈现一片较为分散的、亮度呈正态分布的模糊阴影,但可以清楚看到 28S、18S,其中 28S 的亮度为 18S 的 2 倍,5S 比较弥散不易看清楚。进一步检测样品的 OD 值, $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 在 1.8~2.0 之间,表明 RNA 的纯度较高,可以用于下一步的分析。



1~3 代表样品号

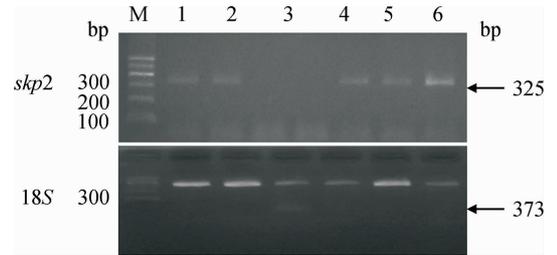
1-3. Represent sample numbers

图 1 RNA 完整性检测

Fig. 1 The integrity detection of total RNA

2.2 PCR 扩增

从图 2 可以看出,利用设计的 *skp2* 和 18S 的引物进行 PCR 扩增,在 325 bp 处扩增到了一条 *skp2* 条带(仅 3 号样品没有见到清楚的条带),在 373 bp 处扩增到了一条 18S 条带,与预期相符,经测序证实为目的基因的产物。



1~6. 代表样品号;M. DNA 相对分子质量标准

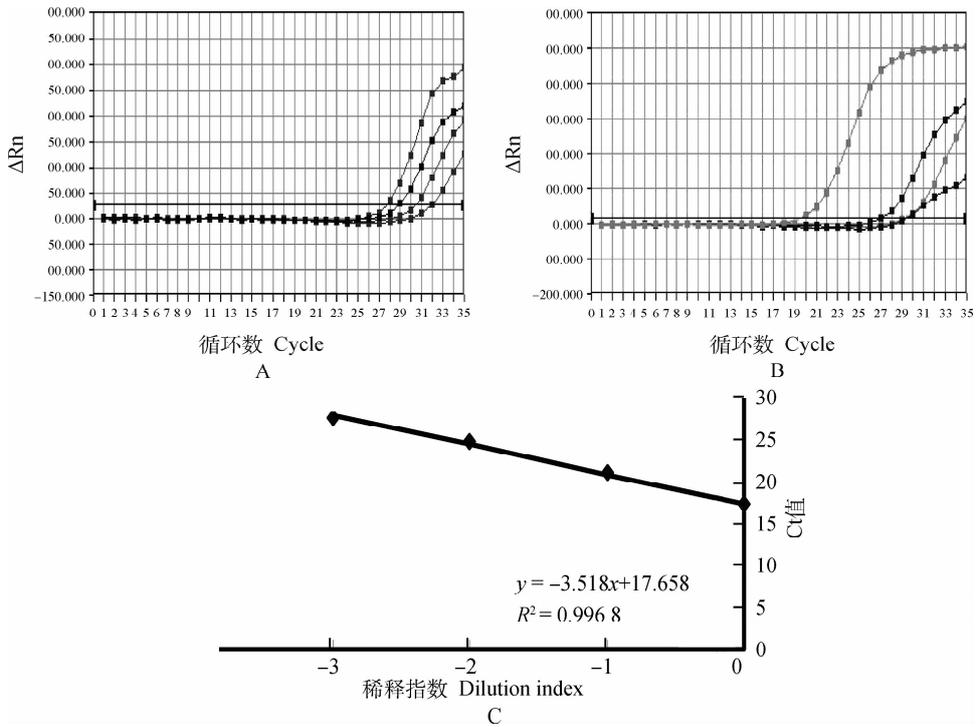
1-6. Represent sample numbers;M. DNA marker

图 2 PCR 检测

Fig. 2 The results of PCR

2.3 定量 PCR 熔解曲线和标准曲线的制作

从图 3A、3B 可以看出,进行 *skp2* 与 18S PCR 扩增时,基线比较平稳,表明干扰信号较小,而且 18S 起跳的循环数为 18~25,符合作为内标的条件。以任一样品进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释,制作标准曲线,从图 3C 可以发现,其回归方程为 $y = -3.518x + 17.658$, $R^2 = 0.9968$,这表明曲线的拟合度较好,可以用于定量分析。



A. *skp2* 基因扩增曲线; B. 18S 基因扩增曲线; C. *skp2* 基因的标准曲线图
 A. Linear curve of *skp2* gene; B. Linear curve of 18S gene; C. Standard curve of *skp2* gene

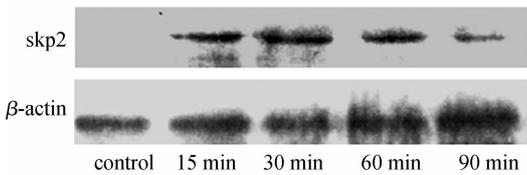
图 3 荧光定量 PCR 扩增曲线图和标准曲线图

Fig. 3 Linear curve and standard curve of fluorescence quantified PCR

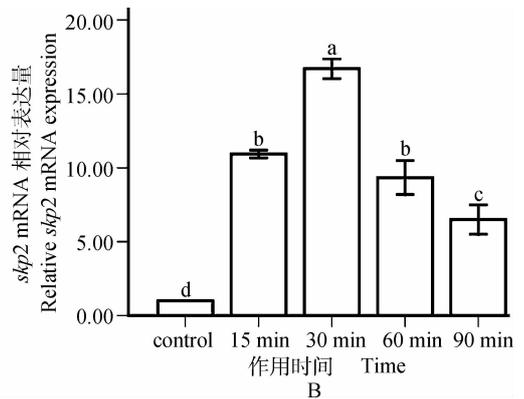
2.4 FSH 作用不同时间对 *skp2* 表达的影响

从图 4A 可以看出, FSH 促进了 *skp2* 蛋白的表达, 30 min 时, 蛋白的量最大, 此后 *skp2* 的表达有所下降, 到 90 min 时, *skp2* 蛋白的表达量与对照相比无显著差异。从图 4B 可以看出, FSH 促进了

skp2 mRNA 的表达, 加入 FSH 15 min 后, *skp2* mRNA 的表达显著增加, 与对照组相比增加了 11.56 倍 ($P < 0.05$), 在 30 min 时, *skp2* mRNA 表达量最高, 是对照组的 17.76 倍 ($P < 0.05$), 此后其表达水平有所下降。



A



B

A, B 分别表示 *skp2* 蛋白与 mRNA。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同
 A, B. Represent *skp2* protein and mRNA, respectively. The different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same as below

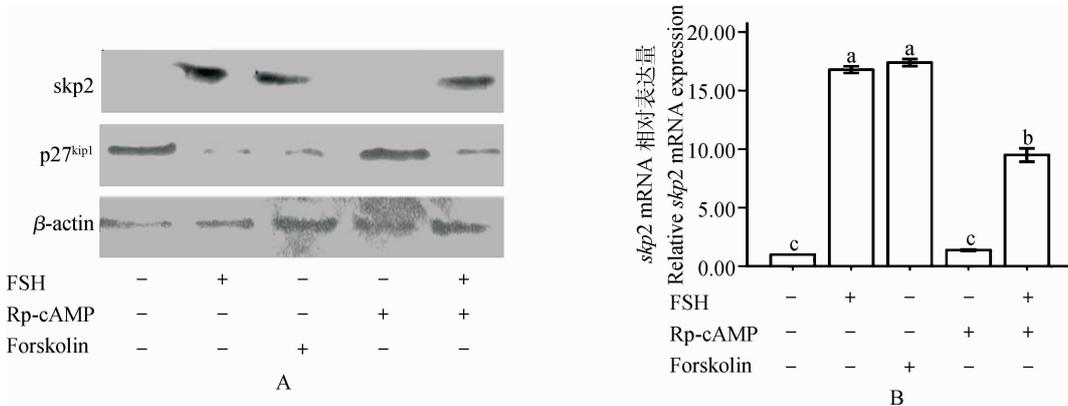
图 4 FSH 作用不同时间对 *skp2* mRNA 和蛋白的影响

Fig. 4 Time dependent in the expressing of *skp2* after FSH treatment

2.5 cAMP 对在 FSH 诱导 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达的影响

从图 5A 可以看出,FSH 与 cAMP 的促进剂 Forskolin($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)均显著促进了 *skp2* 蛋白的表达,抑制了 *p27^{kip1}* 蛋白的表达;cAMP 的抑制剂 Rp-cAMP ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)单独作用时对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的表达无显著影响,但抑制了 FSH 对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的作用。从图 5B 可以看出,Fors-

kolin 与对照 *skp2* mRNA 丰度相比增加了 16.39 倍($P < 0.05$),但与单独的 FSH 作用无显著差异($P > 0.05$)。Rp-cAMP ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与 FSH 共同作用时影响了 *skp2* 的表达,使 *skp2* mRNA 的表达量降低了 43.35%,但 Rp-cAMP 单独作用时对于 *skp2* 的表达无显著影响($P > 0.05$)。



A、B 分别表示蛋白与 mRNA

A, B. Represent protein and mRNA, respectively

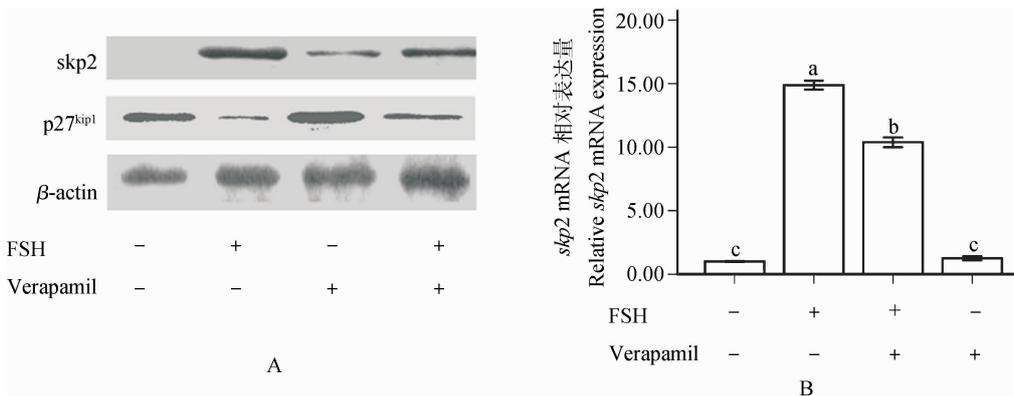
图 5 cAMP 对 FSH 调节 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达的影响

Fig. 5 Effect of cAMP-PKA on FSH regulating the expression of *skp2* and *p27^{kip1}*

2.6 Ca^{2+} 内流对 FSH 诱导 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达的影响

从图 6A 可以看出, Ca^{2+} 通道抑制剂 Verapamil 单独作用时对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的表达无显著影响,但抑制了 FSH 对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的作用。从图 6B 可以看出,加入 FSH 后,细胞中 *skp2* mRNA 表

达水平与对照组相比增加了 7.14 倍;加入 Ca^{2+} 通道抑制剂 Verapamil 后使细胞内 *skp2* mRNA 的水平有所下降,仅为 FSH 单独作用时的 67.45% ($P < 0.05$)。Verapamil 单独作用时对于 *skp2* mRNA 的表达与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。



A、B 分别表示蛋白与 mRNA

A, B. Represent protein and mRNA, respectively

图 6 Ca^{2+} 对 FSH 调节 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达的影响

Fig. 6 Effect of Ca^{2+} on FSH regulating the expression of *skp2* and *p27^{kip1}*

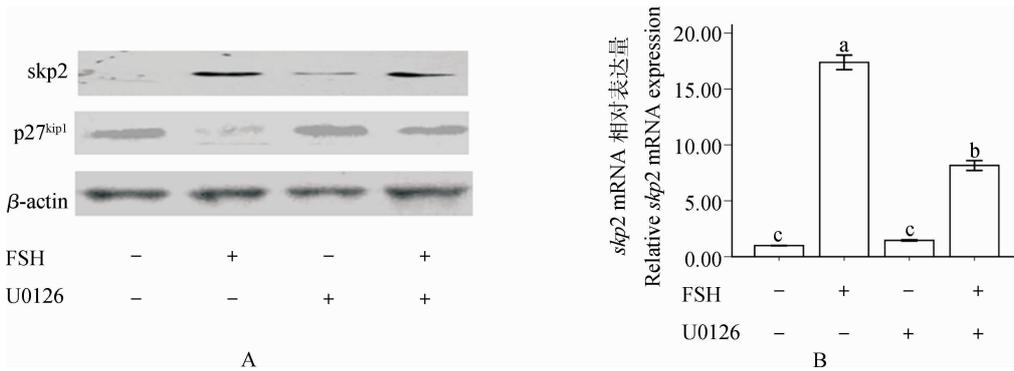
2.7 ERK1/2 对 FSH 诱导 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达的影响

从图 7A 可以看出 ERK 抑制剂 U0126 单独作

用时对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的表达无明显影响,但抑制了 FSH 对 *skp2*、*p27^{kip1}* 蛋白的作用。从图 7B 可以

看出,加入 ERK 抑制剂 U0126 对 *skp2* mRNA 的表达无明显影响($P>0.05$),当 U0126 与 FSH 共同

作用时 *skp2* mRNA 的表达明显下降,与 FSH 单独作用相比降低了 53.0%($P<0.05$)。



A、B 分别表示蛋白与 mRNA

A, B. Represent protein and mRNA, respectively

图 7 ERK1/2 在 FSH 调节 *skp2*、*p27^{kip1}* 表达中的作用

Fig. 7 Effect of ERK1/2 on FSH regulating the expression of *skp2* and *p27^{kip1}*

3 讨论

在正常的细胞周期中, *skp2* 的水平在 S 和 G2 期最高,而在 G0 和 G1 中的含量很少, *skp2* 的稳定性是造成 *skp2* 在细胞周期不同阶段水平差异的主要原因^[5]。尽管 *skp2* 在细胞周期中的水平主要受翻译后调节机制的影响,但本试验发现, FSH 作用支持细胞后以时间依赖的方式诱导了 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达, Katz 等^[9] 在对体外培养的鼠 NIH3T3 和人 HeLa 细胞进行试验时也发现 *skp2* 的表达受到了转录水平的调节,这表明 *skp2* 在睾丸支持细胞周期中的水平可能受到转录和翻译后两个水平的调节。

本试验中加入 cAMP 的增强剂 Forskolin 促进了 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达,而加入 cAMP 的抑制剂 Rp-cAMP 却抑制了 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达,这表明 cAMP 级联参与了 FSH 诱导的 *skp2* 表达的调节。我们前期的研究表明, FSH 可以通过 cAMP 和 Ca^{2+} 激活 ERK1/2,促进细胞的增殖^[2]。本试验和我们前期的结果显示,细胞内一定浓度的 cAMP 可以促进 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) 和 *skp2* 的表达,这可能是与细胞内一定水平的 cAMP 能调节 Rb 的磷酸化,发生去磷酸化的 Rb 可以促进 *skp2* 转录和翻译调节有关^[10-11]。

在本试验中加入 L-型钙离子通道抑制剂 Verapamil 后,试验数据表明 Verapamil 通过影响细胞内 Ca^{2+} 浓度而影响了睾丸支持细胞中 *skp2* 蛋白和

mRNA 的表达,这表明, Ca^{2+} 内流可能参与了 *skp2* 的表达调节。我们前面的研究也发现,在睾丸细胞内, FSH 与受体结合后,除了促进 cAMP 的产生,还可以促进 Ca^{2+} 的内流^[3]。 Ca^{2+} 内流之所以促进了 *skp2* 的表达,可能是 Ca^{2+} 能激活 calmodulin 和 CaM 激酶,促进 CREB 等转录因子的磷酸化,进而影响 *skp2* 转录的结果^[12]。

在本试验中,加入 ERK1/2 的抑制剂 U0126 阻断其活性后,试验数据表明 ERK1/2 的水平降低明显降低了 FSH 诱导的 *skp2* 蛋白和 mRNA 的表达。 ERK1/2 之所以能促进 *skp2* mRNA 的表达,主要是因为 G1/S 中, ERK1/2 能通过 c-fos 和 c-myc 调节 cyclin D1 的转录,并且能促进 CDK2 的转位和 CDK2 中 thr160 的磷酸化,而 *skp2* 的表达从属于 MEK/ERK 对 cyclin D1 的表达和 Rb 的磷酸化^[13]。本结果还发现 ERK1/2 也可以调节 *skp2* 的蛋白水平,可能与 ERK1/2 能激活磷酸化翻译起始因子 eIF4E (Translation initiation factor 4E) 的蛋白激酶 MNK1 和 mTOR/p70S6K,进而调节 *skp2* 蛋白的翻译和翻译后修饰有关^[13]。我们前期的研究也表明, cAMP 和 Ca^{2+} 内流可以激活 ERK1/2,而且活化的 ERK1/2 参与了仔猪睾丸支持细胞周期的调节^[3],这说明 FSH 能通过 MEK-ERK-RSK 级联途径调节 *skp2* mRNA 的表达,诱导支持细胞的增殖。

在相同条件下,本试验检测 *skp2* 蛋白的同时也检测了 *p27^{kip1}* 的表达,表明细胞中 *skp2* 蛋白的水平

与 p27^{kip1} 成负相关,这与 PC3 (Human prostate cancer cell lines) 细胞中 p27^{kip1} 的表达水平与 cyclin D 和 PCNA 的表达水平成负相关相吻合^[14];也进一步提示 FSH 可能通过转录和翻译后两种方式调节 *skp2* 的水平,促进 p27^{kip1} 的降解,进而调节细胞周期。

4 结 论

本试验表明,一定浓度的 FSH 可以以时间依赖的方式诱导 *skp2* mRNA 和蛋白的表达;FSH 可能通过 cAMP 的产生和促进 Ca²⁺ 的内流激活 ERK1/2 级联,并通过 ERK1/2 级联诱导 *skp2* 的表达;细胞中 *skp2* 的水平与 p27^{kip1} 的水平成负相关。

参考文献:

- [1] FRANCA L R,SILVA V A Jr,CHIARINI-GARCIA H,et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig[J]. *Biol Reprod*,2000,63(6): 1629-1636.
- [2] 王鲜忠,周玉兰,赵伯川,等. FSH 通过 cAMP、Ca²⁺ 调节仔猪睾丸支持细胞的增殖[J]. *畜牧兽医学报*,2010,41(10): 1240-1245.
- [3] HULIT J,LEE R J,LI Z P,et al. p27(Kip1) repression of ErbB2-induced mammary tumor growth in transgenic mice involves Skp2 and Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Cancer Res*,2006,66(17): 8529-8541.
- [4] NAKAYAMA K I,NAKAYAMA K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2005,16(3): 323-333.
- [5] BASHIR T,PAGANO M. Don't skip the G1 phase; how APC/CCdh1 keeps SCFSKP2 in check[J]. *Cell Cycle*,2004,3(7): 850-852.
- [6] WANG X Z,ZHAO B C,ZHOU Y L,et al. 17 beta-estradiol regulates cultured immature boar Sertoli cell proliferation via the cAMP-ERK1/2 pathway and the estrogen receptor beta[J]. *Agricultural Sciences in China*,2010,9(8): 1201-1210.
- [7] McCOORD S A,LUNSTRA D D,WISE T H,et al. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of

Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period[J]. *Biol Reprod*,2001,64(2): 689-695.

- [8] LUCAS T F,SIU E R,ESTEVEZ C A,et al. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane. MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells[J]. *Biol Reprod*,2008,78(1): 101-114.
- [9] KATZ M,AMIT I, YARDEN Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases[J]. *Biochim Biophys Acta*,2007,1773(8): 1161-1176.
- [10] BOUSKINE A,NEBOUT M,BRUCKER-DAVIS F, et al. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor [J]. *Environ Health Perspect*,2009,117(7): 1053-1058.
- [11] MAKKONEN K M,MALINEN M,ROPPONEN A, et al. Cell cycle regulatory effects of retinoic acid and forskolin are mediated by the Cyclin C gene[J]. *J Mol Biol*,2009,393(2): 261-271.
- [12] WU G Y,DEISSEROTH K,TSIEN R W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2001,98(5): 2808-2813.
- [13] NAKAYAMA K I,HATAKEYAMA S,NAKAYAMA K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,282(4): 853-860.
- [14] WANG C D,HUANG J G,GAO X,et al. Fangchinoline induced G1/S arrest by modulating expression of p27,PCNA,and cyclin D in human prostate carcinoma cancer PC3 cells and tumor xenograft[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2010,74(3): 488-493.

(编辑 郭云雁)