

牦牛 *Cyclin D1* 基因的克隆及 IGF-I 对其在睾丸支持细胞表达的影响

王亚营, 潘阳阳, 叶小琳, 李谷月, 何翊闵, 王 萌, 樊江峰, 崔 燕, 余四九*

(甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘 要: 本研究旨在克隆牦牛 (*Bos grunniens*) *Cyclin D1* 基因的 CDS 序列, 分析其生物学特性, 研究胰岛素样生长因子-I (Insulin-like growth factor-I, IGF-I) 对 *Cyclin D1* mRNA 和蛋白在睾丸支持细胞 (Sertoli cell, SC) 中表达的影响。采集 5~8 月龄健康牦牛的睾丸样品进行 SC 的分离培养, 用 RT-PCR 技术克隆牦牛 *Cyclin D1* 基因, 用 ORF Finder、MEGA7.0 和 DNAMAN 对其进行生物信息学分析, 并采用免疫荧光染色技术对 *Cyclin D1* 蛋白在 SC 中的表达进行定位分析。向体外培养的 SC 中加入不同浓度 (0 (对照组)、25、50、100、150 ng · mL⁻¹) 的 IGF-I, 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白免疫印迹法检测 *Cyclin D1* 基因和蛋白的表达。结果表明: 1) 牦牛 *Cyclin D1* 基因 (GenBank 登录号: KY 420723) 与其他物种的同源性均较高。2) *Cyclin D1* 蛋白在 SC 胞核中高表达, 为核蛋白。3) 浓度为 25 和 150 ng · mL⁻¹ IGF-I, *Cyclin D1* mRNA 表达量与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 浓度为 50 和 100 ng · mL⁻¹ IGF-I 时, *Cyclin D1* mRNA 表达量显著高于其他各组 ($P < 0.05$); IGF-I 浓度为 100 ng · mL⁻¹, *Cyclin D1* 蛋白表达量与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 25、50 和 150 ng · mL⁻¹ IGF-I 组 *Cyclin D1* 蛋白表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); IGF-I 浓度为 50 ng · mL⁻¹ 时, *Cyclin D1* mRNA 和蛋白表达量均为最高, 分别为对照组的 1.65 和 1.20 倍。综上所述, *Cyclin D1* 基因在进化过程中高度保守; IGF-I 可调控 SC 中 *Cyclin D1* 的表达, 其最佳作用浓度为 50 ng · mL⁻¹。

关键词: 牦牛; 睾丸支持细胞; 细胞周期蛋白 D1; 胰岛素样生长因子-I

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)02-0310-08

Cloning of Yak *Cyclin D1* Gene and the Effects of IGF-I on Its Expression in Sertoli Cells

WANG Ya-ying, PAN Yang-yang, YE Xiao-lin, LI Gu-yue, HE Hong-hong,

WANG Meng, FAN Jiang-feng, CUI Yan, YU Si-jiu*

(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The aim of this study was to clone the CDS of yak (*Bos grunniens*) *Cyclin D1* gene, to analyse its biological characteristics, and to research the effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on *Cyclin D1* gene and protein expression in Sertoli cell (SC). The testicular samples were collected from 5- to 8-month-old healthy yaks for isolation and culture of SC. The *Cyclin D1* gene was cloned by RT-PCR and its biological characteristics were analyzed by ORF Finder, MEGA7.0 and DNAMAN. The expression of *Cyclin D1* protein in SC was localized by immunofluorescence staining. IGF-I was added into the culture medium of SC in the concentration of 0 (control), 25, 50, 100, 150 ng · mL⁻¹, and then the relative expressions of *Cyclin D1* mRNA and protein were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. The results were as follows: 1) Yak *Cyclin D1* gene (GenBank accession number: KY 420723) had the high homology with other species. 2) *Cyclin D1* protein belonged to nuclear

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家自然科学基金 (31472244; 31660732)

作者简介: 王亚营 (1991-), 女, 河南巩义人, 硕士, 主要从事动物生殖生理研究, E-mail: 935249799@qq.com

* 通信作者: 余四九, 教授, 博士生导师, 主要从事动物胚胎工程研究, E-mail: sjyu@163.com

protein because of high fluorescence intensity on cell nucleus. 3) The level of *Cyclin D1* mRNA in 25 and 150 ng · mL⁻¹ groups were not significantly different with the control group ($P > 0.05$), while 50 and 100 ng · mL⁻¹ groups were significantly higher than other groups ($P < 0.05$); the difference of Cyclin D1 protein expression between 100 ng · mL⁻¹ group and the control group was not significantly different ($P > 0.05$), however, a significant difference existed between 25, 50, 150 ng · mL⁻¹ groups and control group ($P < 0.05$); the relative expression of Cyclin D1 mRNA and protein were all reached the highest levels when IGF-I was 50 ng · mL⁻¹, which were 1.65 and 1.20 times higher than that of the control group, respectively. The results suggested that *Cyclin D1* gene was highly conserved during evolutionary process; IGF-I could regulate the expression of Cyclin D1 in SC and its optimal concentration was 50 ng · mL⁻¹.

Key words: yak; Sertoli cell; Cyclin D1; insulin-like growth factor-I

牦牛是能够适应高寒低氧环境的珍稀物种,主要分布在我国青藏高原海拔 3 000 m 以上的地区,具有重要的经济价值,但其自然繁殖率低,限制了牧区的发展。在牦牛上应用辅助生殖技术(Assisted reproductive technology, ART)是提高其繁殖率的重要手段,而雄性牦牛提供高质量的精子是体外繁殖成功的前提。睾丸支持细胞(Sertoli cell, SC)是唯一与生精细胞(Germ cell, GC)直接接触的体细胞,其共同构成睾丸曲细精管。睾丸支持细胞结构上紧密相连构成了血-睾屏障(Blood-testis barrier, BTB),为生殖细胞的发育提供独特的微环境^[1]。睾丸支持细胞产生一系列蛋白质来调控垂体激素的释放,从而影响生殖细胞减数分裂的活性并促进精子的释放^[2],对生精过程起到至关重要的调控作用。成年雄性动物睾丸的大小、生殖细胞的数量以及精子质量与 SC 的数量直接相关^[3]。

细胞周期蛋白(Cyclins)是调控细胞周期进程的一系列蛋白质。细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)高表达于细胞 G1 期,与细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和 6(Cyclin-dependent kinase4/6, CDK4/6)结合,形成 Cyclin D1-CDK4/CDK6 复合物,之后与磷酸化的视网膜母细胞瘤蛋白(Phosphorylation retinoblastoma protein, pRb)结合,使细胞由 G1 期进入 S 期,促进细胞周期进程。G1/S 是细胞周期中重要的时间点,其决定细胞是否进行分裂增殖^[4-5]。研究表明,Cyclin D1 促进睾丸间质细胞的增殖并抑制其凋亡^[6]。将小鼠胚胎干细胞中 *Cyclin D1* 基因的部分外显子用非编码序列替换,得到缺乏 Cyclin D1 蛋白的突变鼠,其在发育过程中表现出生殖障碍等多种症状^[7]。胰岛素样生长因子-I(Insulin-like growth factor-I, IGF-I)是一种促生长因子,对生殖

器官的功能起到重要的调控作用。IGF-I 通过调控 *Bax* 和 *Bcl-2* 等凋亡相关基因,降低了卵丘细胞^[8]、卵母细胞^[9]和睾丸间质细胞^[10]等的凋亡率,同时还提高精子在低温环境中的运动能力及冷冻复苏的活性^[9,11]。IGF-I 显著提高牦牛冻精活性和体外授精胚胎的囊胚产量,并且降低了囊胚中细胞凋亡比率^[12-13]。缺乏胰岛素受体(Insulin Receptor, InsR)和胰岛素样生长因子受体(Insulin-like growth factor Receptor, IGFR)的小鼠,睾丸支持细胞增殖率降低,从而导致精子产量降低,成年后睾丸的尺寸比正常鼠小 75%^[14]。IGF-I 在维持与生殖相关细胞的正常生理功能方面发挥着重要作用,然而 IGF-I 是否调控睾丸支持细胞中周期相关蛋白的表达尚不清楚,牦牛 *Cyclin D1* 基因的克隆及生物信息学分析在国内外也尚未见报道。

本研究以牦牛睾丸支持细胞为研究对象,克隆牦牛 *Cyclin D1* 基因的 CDS 序列,并对其进行生物信息学分析;同时研究 IGF-I 对 Cyclin D1 在睾丸支持细胞中表达的影响。研究结果将为调控睾丸支持细胞的发育提供试验依据,为探索精子发生机制和提高精子质量奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

细胞培养箱(Thermo, 美国)、PCR 仪(Rio-Rad, 美国)、荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)、倒置荧光显微镜(Olympus, 日本);DMEM/F-12、胎牛血清(Fetal Bovine serum, FBS)(Gibco);胰蛋白酶、胶原蛋白酶、透明质酸酶、IGF-I(Sigma);总 RNA 提取试剂盒(Omega);反转录试剂盒、Go-Taq Green Master Mix(Promega);胶回收试剂盒

(GenStar); SYBR Premix Ex Taq™ II、pMD 18-T Vector(TaKaRa); FasI 多克隆兔抗、CyclinD1 多克隆兔抗以及羊抗兔多克隆抗体(博奥森)。

1.2 样品采集及细胞培养与鉴定

2016年10月在青海省西宁市乐家湾屠宰场,采取健康5~8月龄(此阶段为牛睾丸支持细胞的增殖分化期)牦牛的睾丸样品。获得样品后,将其放入生理盐水(含双抗)中,再置于冰盒密封,4 h内送到实验室,并对其进行处理。牦牛睾丸支持细胞的体外分离培养与鉴定参考 M. D. Anway 等^[15]和 H. Zhang 等^[16]的操作方法,采用两次酶消化法获得睾丸支持细胞,20 mmol·L⁻¹ Tris-Hcl 低渗处理和饥

饿培养以纯化细胞,再用含10% FBS的培养液培养细胞,细胞生长至80%以上融合时,用0.25%的胰酶消化细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,爬片培养48 h,采用 FasI 免疫细胞化学方法鉴定细胞。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中牛(*Bos taurus*)的 *CyclinD1* 和 β actin 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计牦牛的 CDS 序列扩增引物 Cyclin D1-C、荧光定量检测引物 Cyclin D1-Y 和 β -actin 内参引物。引物序列送上海华大基因科技公司合成。引物序列详见表 1。

表 1 目的基因和内参基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target and reference genes

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/℃ Tm
Cyclin D1-C	F: CCCAACCATGGCACACC R: CCCAACCATGGCACACC	1 009	60
Cyclin D1-Y	F: CGGTGTCTACTTCAAGTGTGTG R: GACAGGAAGCGGTCCAGGTA	148	60
β -actin	F: AGGCTGTGCTGTCCCTGTATG R: GCTCGGCTGTGGTGGTAAA	200	58

1.4 牦牛 *CyclinD1* 基因的克隆及生物信息学分析

当原代 SC 生长至 80% 以上融合时,提取细胞总的 RNA,再反转录成 cDNA,置于冰箱 -20 ℃,保存备用。以 cDNA 为模板, Cyclin D1-C 为引物进行 PCR 扩增。反应体系: cDNA 2 μL , 上下游引物各 0.5 μL , GoTaq Green Master Mix 10 μL , ddH₂O 7 μL 。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,对目的条带进行胶回收,将纯化后的 DNA 与 pMD 18-T Vector 载体连接,转染到 JM109 感受态细胞,培养获得的菌液,送至上海生工生物工程公司进行测序。测序完成之后,将结果进行拼接,并对其生物信息学分析。利用 NCBI 在线软件 Open reading frame finder (ORF Finder) 对基因进行开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 分析; 利用 MEGA7.0 软件,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 绘制系统进化树; 利用 DNAMAN 对核苷酸和氨基

酸的同源性进行分析。

1.5 细胞免疫荧光法对蛋白质表达进行定位

选取纯化后的牦牛 SC,将细胞密度调整为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行细胞爬片。培养 48 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞,置于冰箱,4 ℃ 过夜; 0.5% Tritonx-100 透化 1 h; 1% BSA 溶液室温封闭 2 h; CyclinD1 抗体稀释液 (1:100) 孵育细胞,冰箱 4 ℃ 过夜; 二抗稀释液 (1:100) 孵育细胞,室温 2 h; 5 ng·mL⁻¹ 的 DA-PI 染细胞核 3 min; 置于倒置荧光显微镜下拍照。每个步骤之间用 PBS 将玻片洗净,且二抗孵育后应避免光操作。

1.6 qRT-PCR 检测 *CyclinD1* 基因表达

选取纯化后的牦牛 SC,以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于 6 孔板中,每孔接种 2 mL 细胞悬液,培养 24 h (使细胞全部处于静止期) 后,加入 IGF-I,使其终浓度分别为 0、25、50、100、150 ng·mL⁻¹,每个浓度 3 个重复,24 h 后提取细胞总 RNA。IGF-I 作用时间根据牦牛睾丸支持细胞分裂周期选取^[16]。

反转录后,将 cDNA 浓度调至 $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,通过 qRT-PCR 检测 *CyclinD1* mRNA 的表达。反应体系: cDNA $1 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$, SYBR Premix Ex Taq™ II $10 \mu\text{L}$, Rox Reference Dye II $0.4 \mu\text{L}$, ddH₂O $7.6 \mu\text{L}$, 共 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 34 s , 共 40 个循环。

1.7 Western blotting 检测 CyclinD1 蛋白表达

细胞培养及因子作用等与 1.6 中相同,提取细胞总蛋白。获得的蛋白质样品与蛋白上样缓冲液(4×)按 3:1 混合,置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 温箱中,煮 10 min ,使蛋白质充分变性;变性后的蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离;在 300 mA 恒定电流条件下,将凝胶上的目的蛋白转到 PVDF 膜上;用 5% 脱脂奶粉溶液,将膜封闭 2 h; Cyclin D1 抗体 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;二抗常温孵育 2 h;加电化学发光显色液(Electroche-

mi-luminescence, ECL) 避光显色, X 光片曝光,扫描蛋白条带。

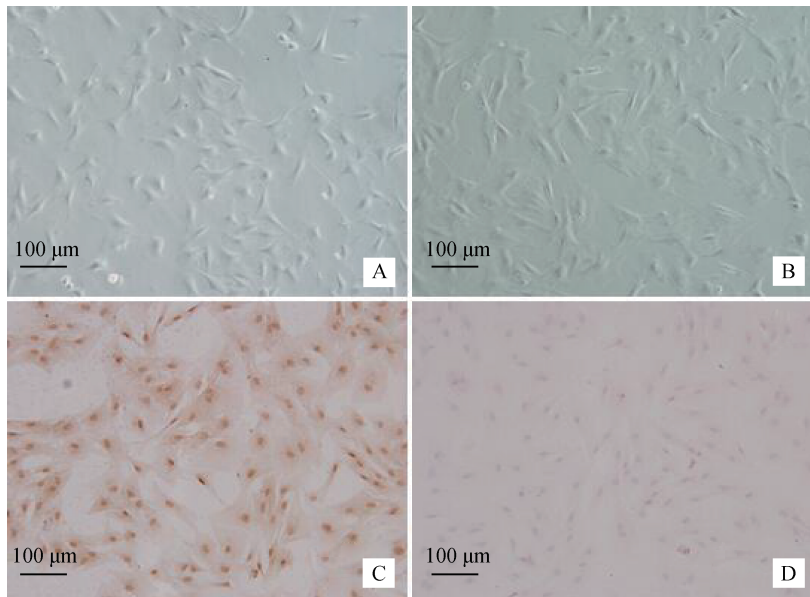
1.8 数据分析

采用 SPSS21.0 软件对 Cyclin D1 基因和蛋白的相对表达量进行单因素方差分析,相对表达水平为“平均值±标准误($\bar{X} \pm \text{SE}$)”表示。 $P > 0.05$ 为差异不显著, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 牦牛睾丸支持细胞培养与鉴定

纯化培养获得原代牦牛 SC(图 1 A)和三代 SC(图 1 B),均生长良好。Fasl 免疫细胞化学法显示, Fasl 蛋白在该细胞表达呈阳性(图 1 C),阴性对照不表达(图 1 D),由此可确定试验所用为纯度较高的牦牛睾丸支持细胞。



A. 原代 SC; B. 三代 SC; C. Fasl 阳性表达; D. 阴性对照

A. The first generation of SC; B. The third generation of SC; C. Positive staining for Fasl; D. Negative control

图 1 牦牛睾丸支持细胞的培养和鉴定(标尺: $100 \mu\text{m}$)

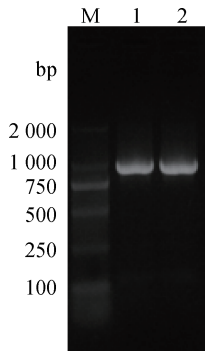
Fig. 1 The cultivation and identification of the yak Sertoli cells (Scale bar: $100 \mu\text{m}$)

2.2 CyclinD1 基因的克隆及生物信息学分析

Cyclin D1-C 进行 RT-PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳显示,预期位置有明显荧光条带(图 2)。利用 NCBI 在线软件 BLAST 对拼接后的序列进行比对, Cyclin D1-C 扩增产物序列与牛的 *CyclinD1* (NM_001046273.2) 序列为 99% 相似。将牦牛 *CyclinD1* 序列提交至 GenBank, 登录号为 KY 420723。

ORF 分析表明,该基因编码区长 888 bp, 起始密码子在 8 bp 处, 终止密码子在 895 bp 处, 编码 295 个氨基酸。系统进化树结果显示(图 3), 牦牛 *Cyclin D1* 基因与瘤牛、黄牛和水牛的亲缘关系最近, 与山羊和绵羊次之, 与人和猫的亲缘关系最远。同源性分析结果表明(表 2): 牦牛 *Cyclin D1* 核苷酸序列同源性与黄牛和瘤牛的最高, 为 99.9%; 与人的最低, 为 92.2%。牦牛 *Cyclin D1* 氨基酸序列同

源性与黄牛、瘤牛和水牛的同源性均为 100%，与人的同源性为 93.5%。



M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~2. *Cyclin D1* 基因扩增产物

M. DL2000 DNA marker; 1-2. *Cyclin D1* RT-PCR products

图 2 牦牛 *Cyclin D1* 基因的 RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Agarose gels electrophoresis results of *Cyclin D1* RT-PCR products

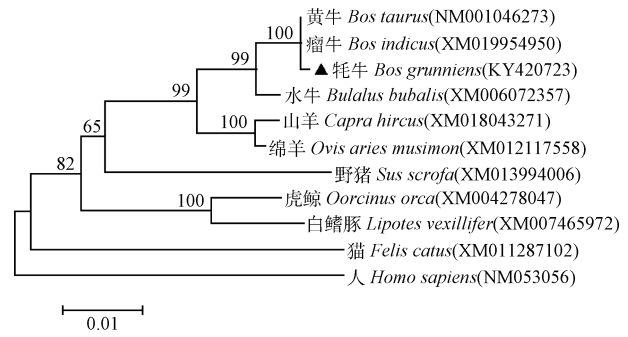


图 3 *Cyclin D1* 基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Cyclin D1*

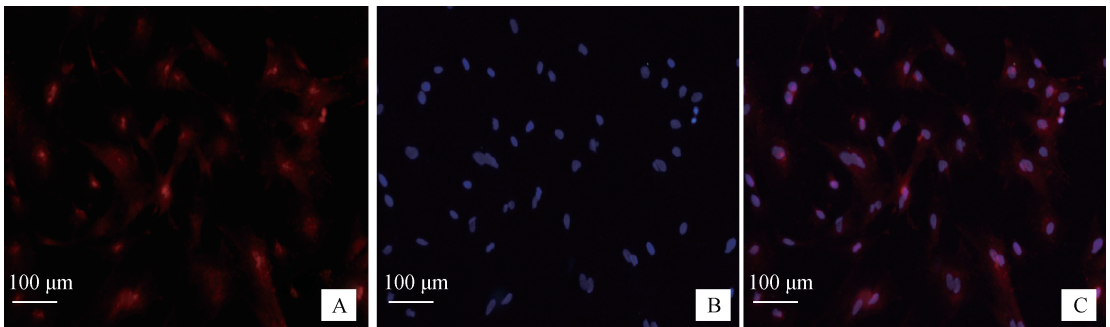
2.3 *Cyclin D1* 蛋白在 SC 中的分布与定位

细胞免疫荧光显示(图 4),*Cyclin D1* 蛋白在 SC 胞核上高表达,部分细胞核中呈强表达,在 SC 胞质上呈极微弱表达。

表 2 牦牛和不同物种间 *Cyclin D1* 基因序列和氨基酸序列同源性比较

Table 2 Homologous comparisons of nucleotide and amino acids sequences of yak *Cyclin D1* gene with that of other species

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number	核苷酸序列同源性 Nucleotide sequence identity	氨基酸序列同源性 Amino acid sequence identity
黄牛 <i>Bos taurus</i>	NM_001046273.2	99.9	100.0
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	XM_019954950.1	99.9	100.0
水牛 <i>Bulalububalis</i>	XM_006072357.1	99.0	100.0
绵羊 <i>Ovis aries musimon</i>	XM_012117558.2	97.7	99.3
山羊 <i>Capra hircus</i>	XM_018043271.1	97.5	99.3
野猪 <i>Sus scrofa</i>	XM_013994006.1	94.5	97.3
虎鲸 <i>Orcinus orca</i>	XM_004278047.1	94.6	95.9
白鳍豚 <i>Lipotes vexillifer</i>	XM_007465972.1	94.5	95.9
猫 <i>Felis catus</i>	XM_011287102.2	92.5	95.6
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_053056.2	92.2	93.5



A. *Cyclin D1*;B. DAPI;C. 合成

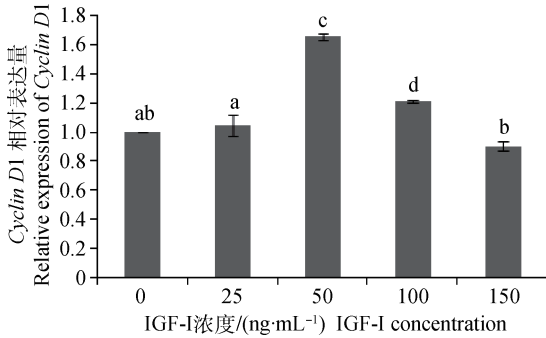
A. *Cyclin D1*;B. DAPI;C. Merge

图 4 牦牛 SC *Cyclin D1* 蛋白表达免疫荧光技术检测(标尺:100 μm)

Fig. 4 The detection of *Cyclin D1* protein on yak SC by immunofluorescence method (Scale bar: 100 μm)

2.4 IGF-I 对牦牛 SC 中 *Cyclin D1* mRNA 的调节

IGF-I 作用于体外培养的 SC, 对获得的样品进行 qRT-PCR 分析, 结果显示(图 5): IGF-I 浓度为 25 和 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, *Cyclin D1* mRNA 表达量与对照组差异不显著($P > 0.05$), 前者表现促进, 后者表现抑制; IGF-I 浓度为 50 和 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, *Cyclin D1* mRNA 表达量显著高于其他各组($P < 0.05$), 其中 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的表达量最高, 为对照组的 1.65 倍。



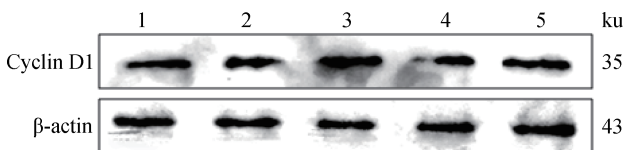
不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$). 下同

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$); same letter means no significant difference ($P > 0.05$). The same as below

图 5 不同浓度 IGF-I 对 *Cyclin D1* mRNA 表达的影响
Fig. 5 Effect of different concentration of IGF-I on *Cyclin D1* mRNA expression

2.5 IGF-I 对牦牛 SC 中 *Cyclin D1* 蛋白的调节

不同浓度 IGF-I 加入体外培养的 SC, 作用 24 h, 对获得的蛋白样品进行 Western blotting, 结果显示(图 6 和 7): 与对照组相比, IGF-I 作用组的 *Cyclin D1* 蛋白的表达量均有提高, IGF-I 浓度为 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组蛋白表达量与对照组差异不显著($P > 0.05$), IGF-I 浓度为 25、50 和 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组蛋白表达量显著高于对照组($P < 0.05$), 其中, 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的蛋白表达量最高, 为对照组的 1.20 倍。



1~5. 0, 25, 50, 100, 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IGF-I
1-5. 0, 25, 50, 100, 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IGF-I

图 6 *Cyclin D1* 和 β -actin 蛋白检测
Fig. 6 The detection of *Cyclin D1* and β -actin protein

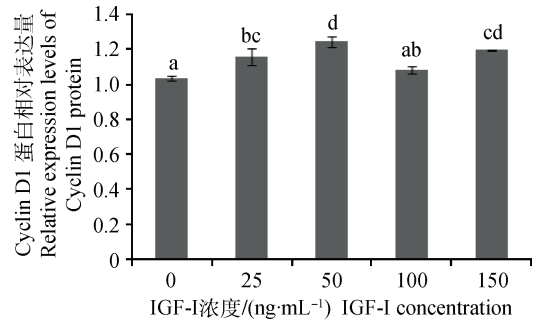


图 7 不同浓度 IGF-I 对 *Cyclin D1* 蛋白表达的影响
Fig. 7 Effect of different concentration of IGF-I on *Cyclin D1* protein expression

3 讨论

本研究成功克隆出牦牛 *Cyclin D1* 基因的 CDS 序列(GenBank 登录号: KY 420723)。生物信息学分析显示, 牛属动物 *Cyclin D1* 核酸序列同源性达到 99% 以上, 氨基酸序列完全一致, 与其他物种相比均有较高同源性, 表明 *Cyclin D1* 基因在进化过程中具有保守性。Cyclin D1 蛋白在细胞中呈周期性表达, 于 G1 期表达量最高。异步生长的人成纤维细胞免疫荧光结果显示, Cyclin D1 蛋白在绝大多数细胞中呈阳性表达, 且定位于细胞核^[17]。本研究中, 用于免疫荧光检测的 SC 未做同步生长处理, 其结果显示, 绝大多数细胞核中高表达 Cyclin D1 蛋白, 这与前人的研究结果一致, 但胞核中 Cyclin D1 的荧光强度并不同, 可能由于细胞处于周期进程中的不同阶段。

A. Dance 等^[18]通过细胞计数证明, IGF-I 促进体外培养的牛 SC 数目增殖。本研究则从分子水平进行探究, 分析不同浓度的 IGF-I 对牦牛睾丸支持细胞中 *Cyclin D1* 基因和蛋白表达的影响, 结果显示: 添加 IGF-I 后, *Cyclin D1* 基因和蛋白的表达量总体上升, 且具有剂量依赖性, 表明 IGF-I 可以通过调控 *Cyclin D1* 的表达, 促进 SC 周期进程, 引起细胞增殖; 但高浓度的 IGF-I 可能激活了抑制 *Cyclin D1* 表达的途径, 在本研究中, IGF-I 为 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 试验组 *Cyclin D1* mRNA 表达量低于对照组($P > 0.05$), 可能与 PI3K 介导的胰岛素家族的负调控机制有关^[19]。P. Ye 等^[20]研究发现, 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IGF-I 作用于大鼠少突胶质细胞 24 h, *Cyclin D1* mRNA 表达量为对照组的 7 倍; Y. Jiang 等^[21]发现, 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IGF-I 作用于鼠系膜细胞,

Cyclin D1蛋白表达量为对照组的 1.6 倍。在本研究中,IGF-I 为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,Cyclin D1 mRNA 和蛋白的表达量分别为对照组的 1.21 和 1.05 倍。IGF-I 作用于细胞时,首先与细胞表面的受体相结合,激活下游分子。研究显示,不同组织器官中 IGF-I 及其受体的含量^[22-23]与活性^[24]均不同。因此,以上差异可能与试验对象在机体内的位置及功能有关,提示生长因子对生殖器官的调控可能存在特异性。本研究中 Cyclin D1 基因和蛋白表达呈现一定差异性,可能是由于 Cyclin D1 蛋白表达过程受到多条信号通路的调控。目前研究表明,Cyclin D1 至少存在两条转录后调控通路,即 mTOR 和/或 PI3-p70S6 通路和 PI3 -eIF4E 通路,它们可与 Ras 偶联,对 Cyclin D1 进行蛋白翻译水平的调控^[25]。Ras 是生长因子作用靶标,将刺激细胞生长的信号传递给下游分子,促进细胞周期进展^[26]。同时,IGF-I 还可以激活 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 激酶途径,调控 Cyclin D1 的表达^[27]。因此,Cyclin D1 在 SC 上的表达可能受到多方面的调控。

雄性动物成年后,SC 在体内不再进行增殖分化,雄性动物的生精质量在其成年之前就已决定^[3]。SC 的成熟障碍是多数雄性生殖障碍的根本原因,且 SC 的成熟障碍可能在出生之前就已经存在^[28-29]。总结本研究及前人成果发现,IGF-I 上调牦牛 SC 中 Cyclin D1 蛋白的表达,同时还可抑制多种生殖相关细胞的凋亡。因此,IGF-I 可能通过促进牦牛 SC 周期进程,抑制其凋亡,从而促进 SC 的增殖和成熟,使其数量和质量维持正常。这对提高牦牛的生精能力及精子质量具有重要意义。

4 结 论

本研究成功克隆牦牛 *Cyclin D1* 基因(GenBank 登录号:KY 420723),生物信息学分析显示,其在进化过程中高度保守,Cyclin D1 蛋白主要在 SC 胞核表达。IGF-I 上调 SC 中 Cyclin D1 基因和蛋白的表达,具有剂量依赖性,最佳作用浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。IGF-I 可以通过影响 SC 中 Cyclin D1 的表达调控睾丸发育,从而影响雄性胚胎的生殖发育和成年动物的精子质量。

参考文献(References):

- [1] WONG C H, CHENG C Y. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 71: 263-296.
- [2] JOHNSON L, THOMPSON D L Jr, VARNER D D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis[J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(1-2): 23-51.
- [3] ORTH J M, GUNSALUS G L, LAMPERTI A A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development [J]. *Endocrinology*, 1988, 122(3): 787-794.
- [4] BRADEN W A, MCCLENDON A K, KNUDSEN E S. Cyclin-dependent kinase 4/6 activity is a critical determinant of pre-replication complex assembly[J]. *Oncogene*, 2008, 27(56): 7083-7093.
- [5] HINDS P W, DOWDY S F, EATON E N, et al. Function of a human *Cyclin* gene as an oncogene[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(2): 709-713.
- [6] WANG H, YUAN Q Q, SUN M, et al. BMP6 regulates proliferation and apoptosis of human Sertoli cells via Smad2/3 and cyclin D1 pathway and DACH1 and TFAP2A activation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45298.
- [7] SICINSKI P, DONAHER J L, PARKER S B, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast[J]. *Cell*, 1995, 82(4): 621-630.
- [8] 潘阳阳,崔 燕,樊江峰,等. 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)对牦牛卵丘细胞热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响及其与细胞凋亡的关联性分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(9): 1208-1216.
PAN Y Y, CUI Y, FAN J F, et al. The effect of insulin-like growth factor (IGF-1) on heat shock protein 70 (HSP70) expression of yak (*Bos grunniens*) cumulus cells and its relation with apoptosis [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23 (9): 1208-1216. (in Chinese)
- [9] PAN Y Y, CUI Y, BALOCH A R, et al. Insulinlike growth factor I improves yak (*Bos grunniens*) spermatozoa motility and the oocyte cleavage rate by modulating the expression of Bax and Bcl-2[J]. *Theriogenology*, 2015, 84(5): 756-762.
- [10] YOON M J, ROSER J F. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) protects cultured equine Leydig cells from undergoing apoptosis[J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(3-4): 353-358.
- [11] SHIN S M, KIM S, HONG J G, et al. IGF-I improves mitochondrial membrane potential during hy-

- pothemic storage of canine spermatozoa[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(7): 1065-1067.
- [12] SIRISATHIEN S, BRACKETT B G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(1): 51-56.
- [13] CHEN P, PAN Y, CUI Y, et al. Insulin-like growth factor I enhances the developmental competence of yak embryos by modulating aquaporin 3[J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(5): 825-835.
- [14] PITETTI J L, CALVEL P, ZIMMERMANN C, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(5): 814-827.
- [15] ANWAY M D, FOLMER J, WRIGHT W W, et al. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to *ex vivo* studies of Sertoli cell function[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(3): 996-1002.
- [16] ZHANG H, LIU B, QIU Y, et al. Pure cultures and characterization of yak Sertoli cells[J]. *Tissue Cell*, 2013, 45(6): 414-420.
- [17] BALDIN V, LUKAS J, MARCOTE M J, et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1[J]. *Gene Dev*, 1993, 7(5): 812-821.
- [18] DANCE A, KASTELIC J, THUNDATHIL J. A combination of insulin-like growth factor I (IGF-I) and FSH promotes proliferation of prepubertal bovine Sertoli cells isolated and cultured *in vitro*[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 29(8): 1635-1641.
- [19] TANIGUCHI C M, EMANUELLI B, KAHN C R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 85-96.
- [20] YE P, HU Q C, LIU H D, et al. β -catenin mediates insulin-like growth factor-I actions to promote cyclin D1 mRNA expression, cell proliferation and survival in oligodendroglial cultures[J]. *Glia*, 2010, 58(9): 1031-1041.
- [21] JIANG Y, CHENG D W, LEVI E, et al. IGF-1 increases laminin, cyclin D1, and p21^{Cip1} expression in glomerular mesangial cells: an investigation of the intracellular signaling pathway and cell-cycle progression[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(1): 208-220.
- [22] WERTHER G A, ABATE M, HOGG A, et al. Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by *in situ* hybridization-relationship to IGF-I receptors[J]. *Mol Endocrinol*, 1990, 4(5): 773-778.
- [23] WEISS O, ANNER H, NEPHESH I, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the kidney of the chronically hypoinsulinemic rat and hyperinsulinemic rat[J]. *Metabolism*, 1995, 44(8): 982-986.
- [24] PFAFFL M W, GEORGIEVA T M, GEORGIEV I P, et al. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 22(2): 91-102.
- [25] GUO Y, STACEY D W, HITOMI M. Post-transcriptional regulation of cyclin D1 expression during G2 phase[J]. *Oncogene*, 2002, 21(49): 7545-7556.
- [26] FU M F, WANG C G, LI Z P, et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(12): 5439-5447.
- [27] YAN Y, LI X Y, KOVER K, et al. CREB participates in the IGF-I-stimulation cyclin D1 transcription [J]. *Dev Neurobiol*, 2013, 73(8): 559-570.
- [28] SHARPE R M, MCKINNELL C, KIVLIN C, et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood[J]. *Reproduction*, 2003, 125(6): 769-784.
- [29] 梁洺源,朱化彬,陈晓丽,等.支持细胞调控精原干细胞增殖、分化和凋亡的研究进展[J].畜牧兽医学报, 2016, 47(2): 225-231.
- LIANG M Y, ZHU H B, CHEN X L, et al. The study progress of the proliferation, differentiation and apoptosis of spermatogonial stem cells under the regulation of Sertoli cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 225-231. (in Chinese)