

LHR 基因在济宁青山羊发情周期 不同阶段子宫中表达差异的研究

申颖^{1,2}, 王慧¹, 王树迎^{1*}, 王立芹¹, 侯衍猛¹, 黄丽波¹

(1. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018; 2. 山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

摘要: 从济宁青山羊子宫组织中提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增黄体生成素受体(LHR)基因, 获得一条 286 bp 的片段, 以 pGEM-TEasy vector 为载体, 转染大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆并测序。采用优化的半定量 RT-PCR 技术, 以山羊 *GAPDH* 为分子内参, 比较研究了发情周期不同阶段的济宁青山羊子宫组织中 LHR 基因的表达差异。结果表明: 得到的片段为山羊 LHR 基因的部分序列, 与 GenBank 中登录的山羊 LHR 基因(AF379199)41-326 bp 序列同源性高达 100%。LHR mRNA 在整个发情周期的子宫中都有表达。其中, 发情期的表达水平最低(0.454 ± 0.06), 且与其它时期比较均差异显著($P < 0.05$), 随之在间情期升至最高值(0.705 ± 0.09), 尔后在发情前期降至(0.553 ± 0.07)。这一研究结果为山羊的生殖内分泌调控机制研究提供了分子水平的数据。

关键词: LHR mRNA; 半定量 RT-PCR; 发情周期; 济宁青山羊

中图分类号: S827; Q344+.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)03-0338-05

Different Expression of LHR mRNA in the Uterus of Four Estrous Cycle Phases in Jining Gray Goat

SHEN Ying^{1,2}, WANG Hui¹, WANG Shu-ying^{1*}, WANG Li-qin¹,
HOU Yan-meng¹, HUANG Li-bo¹

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University,
Taian 271018, China; 2. Veterinary Department, Shandong Vocational
Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China)

Abstract: Total RNA extracted from the uterus of Jining gray goat was used for RT-PCR amplification of goat luteinizing hormone receptor (LHR) gene. A cDNA fragment of 289 bp in size was obtained and cloned into pGEM-T vector. Positive clones were identified and sequenced. Using *GAPDH* as an inner control, an optimal semi-quantitative RT-PCR method was established to analyze LHR mRNA expression levels in the goat uterus of four estrous cycle phases. Sequencing analysis indicated that this fragment was a partial sequence of LHR cDNA and identical to the reported LHR mRNA (AF379199). The LHR mRNA expression was different in the uterus of Jining gray goat during the four estrous cycle phases, being lowest in the estrus (0.454 ± 0.06), highest in the diestrus (0.705 ± 0.09), intermediate in the proestrus (0.553 ± 0.07). The expression in the estrus was significantly lower than that in other oestrous cycle phases ($P < 0.05$). The results provides molecular data for further elucidating the mechanisms of reproductive endocrine secretion in goats.

Key words: LHR mRNA; semi-quantitative RT-PCR; estrous cycle; Jining gray goat

收稿日期: 2007-12-13

基金项目: 山东省科技攻关项目(2006GG2209004); 国家自然科学基金项目(30671498)

作者简介: 申颖(1982-), 女, 山东蓬莱人, 硕士生, 主要从事动物形态学和发育生物学研究, E-mail: shyings33@163.com

* 通讯作者: 王树迎, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事动物组织学与发育生物学研究, E-mail: sywang@sdau.edu.cn

黄体生成素受体(Luteinizing hormone receptor, LHR)属于 G 蛋白偶联受体(Gprotein-coupled receptor, GPCR)超家族中的糖蛋白亚家族成员,其氨基酸序列和结构有高度同源性,具有 7 个跨膜区、4 个胞质区以及由 3 个环状区和 N 端组成的细胞外区^[1]。黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)是由垂体前叶的促性腺激素细胞分泌的一种糖蛋白类激素,其作用的发挥必须依赖于和 LHR 的胞外功能区结合,激活受体,进而激活 cAMP 系统,引起甾体激素的合成与分泌,从而参与哺乳动物受精卵着床、性腺发育等一系列生理活动的调节。

近年的研究发现,LHR 不仅存在于性腺组织,如卵巢的颗粒细胞及睾丸的支持细胞,在牛^[2]、猪^[3]、鼠^[4]等雌性哺乳动物的子宫、输卵管等生殖道中也有分布。同时,*LHR* 基因敲除鼠表现出明显的子宫发育迟缓^[5]。某些恶性肿瘤性疾病,如子宫内膜癌上也已经发现了 LHR,并且推测其可能通过局部作用来调节子宫内膜癌细胞的功能^[6],这表明生殖道内的 *LHR* 在动物的生殖调控过程中也发挥了重要作用。有关山羊生殖道内 *LHR* 的研究尚未见报道。

济宁青山羊是我国特有的羔皮用山羊品种,繁殖力高是其重要特征,初产母羊平均产羔率为 163.1%,一年产两胎或两年产三胎,经产羊平均产羔率达 293.7%^[7]。因此,研究发情周期不同阶段的 *LHR* mRNA 在济宁青山羊子宫中的表达水平,能够为探讨济宁青山羊高繁殖力的生殖内分泌调控机理提供一些分子水平上的直接证据。

1 材料和方法

1.1 试验动物和主要试剂

在莱芜黑山羊育种研究所基础母羊群中选取 12 只同父异母健康空怀的济宁青山羊,年龄 2~3 岁,体质量为 24 kg 左右,统一进行圈养饲养。通过早晚 2 次公羊试情,结合母羊外阴变化,分别选取处于发情期、发情后期、间情期和发情前期的母羊各 3 只,分为 3 个重复,逐一动脉放血,5 min 内从腹腔中取出子宫,立即投于液氮中备用。

TRNzol 购自北京天根生物技术有限公司,焦磷酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate, DEPC)购自美国 Sigma 公司, pMD18-T Vector、DNA marker、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,割胶回收试剂盒(QIA quick Gel Extraction Kit)购自 GIBCO 公

司,其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

取 50~100 mg 冻存的子宫组织,经液氮速冻研磨后,收集入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,用 TRNzol 法提取总 RNA, DNAase I 除去总 RNA 中的 DNA。并用紫外分光光度计测定其纯度和浓度。取 2 μ g 总 RNA 提取液为模板, Oligo(dT)₁₈ 为反转录引物,在 M-MLV 反转录酶的作用下进行反转录,反应体系为 25 μ L。

1.3 聚合酶链反应(PCR)

根据已报道的羊的 *LHR* 和 *GAPDH* 基因序列(AF379199, AJ431207)设计引物,由上海博尚生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 *LHR* 和 *GAPDH* 基因引物序列

基因 Gene	引物(5'-3') Primer	产物大小/bp Length of amplified fragments
LHR	F: AATATCGAGCTGAACTTT	286
	R: TTGCCTGATGTGCCTAAC	
GAPDH	F: GGGTGATGCTGGTGCTGAGT	259
	R: TCCCTCCACGATGCCAAA	

以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中模板 cDNA 1 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L 混匀后,对 *LHR* 和 *GAPDH* 基因进行 MgCl₂ 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 PCR 扩增,从中筛选对扩增效率最佳的 MgCl₂ 浓度。通过对引物核苷酸序列的分析及不同退火温度下 PCR 产物的电泳结果分析,*LHR* 和 *GAPDH* 基因片段扩增的最佳退火温度分别为 47 和 55 $^{\circ}$ C。

LHR 的 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 47 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 分别进行 26、28、30、32、34、36 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*GAPDH* 的 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 90 s; 95 $^{\circ}$ C 25 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 分别进行 24、26、28、30、32、34、36 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。最佳循环数选定在 *LHR* 和 *GAPDH* 基因产物均在指数增长长期内。

1.4 PCR 扩增产物的回收、克隆及序列分析

采用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增的目的片

段,割胶回收,用回收试剂盒纯化后连接到 PMD18-T vector,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5a 感受态细胞,铺板,过夜培养后挑取白色单菌落进行重组质粒的快速鉴定,对初步鉴定为含有重组质粒的菌落进行培养、提取质粒、用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定,选择阳性菌落,送北京华大基因研究中心进行测序,序列用 DNAMAN 软件进行分析。

1.5 RT-PCR 法对发情周期中 *LHR* 基因表达差异的检测

以 *GAPDH*(循环数为 26)为内参基因,对处于发情期、发情后期、间情期和发情前期的济宁青山羊子宫中 *LHR* 基因(循环数为 30)进行 $MgCl_2$ 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 PCR 扩增。

1.6 半定量分析及数据处理:

用 AlphaEaseFC 软件对电泳结果进行半定量分析。*LHR* mRNA 相对表达量为 *LHR* mRNA 的 OD(Integrated Optical Density)值与 *GAPDH* 的 OD 值的比值。数据用 SPSS13.0 进行统计分析,数据结果均以均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 及 PCR 产物的电泳结果

采用 TRNzol 试剂进行总 RNA 的提取。经测定,光密度比值 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0,总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见有 28S、18S 和 5S 3 条明显的条带(图 1),且 5S 带比 28S 和 18S 两条带弱,表明提取的总 RNA 符合 RT-PCR 的试验要求。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,显示扩增得到大约 286 bp 的片段,与理论产物大小相近(图 2)。

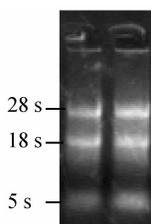
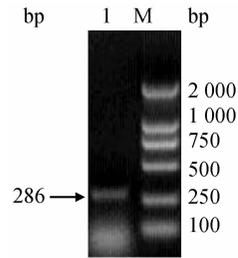


图 1 子宫组织总 RNA
Fig. 1 Total RNA of uterus

2.2 重组质粒的 PCR 检验结果

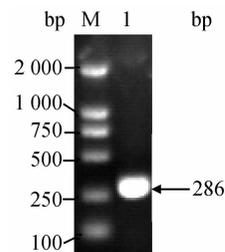
将 RT-PCR 扩增产物回收、纯化、克隆。挑取重组子,进行菌体 PCR 扩增、酶切和凝胶电泳鉴定,显示一条明亮的与理论片段长度(286 bp)相符的条带(图 3),表明目的基因已成功转入大肠杆菌。



1. PCR 产物; M. DNA marker
1. PCR product; M. DNA marker

图 2 *LHR* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 The PCR-amplified product of *LHR* gene



M. DNA marker; 1. 重组质粒 PCR 产物

M. DNA marker; 1. PCR product of recombinant plasmid

图 3 *LHR* 基因的质粒 PCR 产物

Fig. 3 The PCR product of the *LHR* gene recombinant plasmid

2.3 测序结果

阳性克隆子经过正、反向 2 个测序反应,得到 286 bp 的核苷酸序列(图 4)。经过序列同源性比对,其与 GenBank 中登录的羊 *LHR* mRNA 基因(AF379199) 41-326 bp 之间的核苷酸序列同源性达到了 100%,这表明所克隆的基因序列为 *LHR* 基因。

2.4 济宁青山羊子宫组织 *LHR* 基因表达的半定量检测结果

分别以不同样品中的 *GAPDH* 基因为内标,对处于发情周期不同阶段的济宁青山羊子宫中的 *LHR* 基因表达水平进行半定量 RT-PCR 分析。用 AlphaEaseFC 分析软件测出每组各条带的光密度值(OD),对子宫中 *LHR* 基因表达水平进行相对定量分析。对 3 个重复的数据分析表明,济宁青山羊子宫中 *LHR* mRNA 在发情周期的各个阶段表达量不同(图 5)。经分析,其中发情期的表达水平最低(0.454 ± 0.06),且与其它时期比较均差异显著($P < 0.05$),随之在间情期升至最高值(0.705 ± 0.09),而后在发情前期降至(0.553 ± 0.07)。

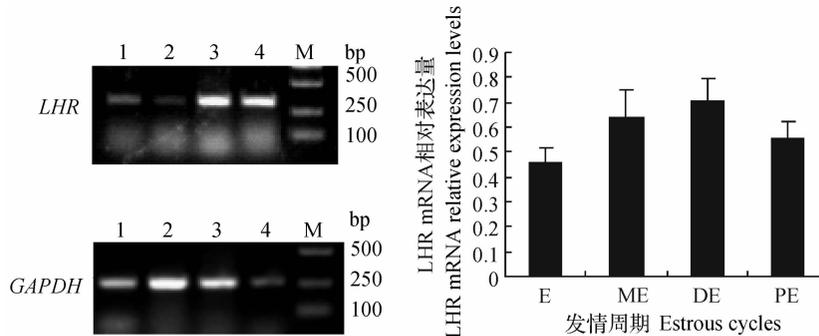
```

AATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTTCAGCTTATATCTCCAAGTGCAAA
AATGGCTTCACTGGATCAAATAAGOCCTCCCGGTCCACCTTCAAGTTGACTACATTACA
ATGTCAATATTCAGCTGTCTCTGGACAAGACTTGTCTGTAAGGAGTGTTAACTGTGGTATC
AGTAAGCACATTACTGAATTATAC TTAAATATGTAAAAAAAATTCTCTCTACCAGTAATA
TTAACAAAGAGTTGGTTTCAGGAAATTATGTGTTAGGCACATCAGGCAA

```

图 4 *LHR* 基因片段的测序结果

Fig. 4 The sequenced result of the *LHR* gene fragment



1. 发情前期; 2. 发情期; 3. 发情后期; 4. 间情期; M. DNA 相对分子质量标准

1. Proestrus (PE); 2. Estrus (E); 3. Metestrus (ME); 4. Diestrus (DE); M. DNA marker

图 5 发情周期不同阶段山羊子宫 *LHR* mRNA 表达规律

Fig. 5 Gene expression of *LHR* mRNA in the uterus of Jining gray goat during the different estrous cycle phases

3 讨 论

3.1 关于 *LHR* mRNA 在发情周期不同阶段的子宫组织中表达的变化规律

目前,关于山羊子宫组织中 *LHR* mRNA 的表达量的研究还未见报道。本研究中,在发情周期的不同阶段,*LHR* mRNA 在济宁青山羊子宫组织均有表达,其表达水平呈现不同的变化趋势。Rzucidlo 等^[8]在猪的研究中也发现,*LHR* 在发情周期的 6~7 和 11~12 d 表达量最高(以发情第 1 天记为 0 天),即在发情周期的黄体期表达量最高,而在发情周期的 1~2 和 18~20 d 表达量较低,与本研究结果基本一致。另外,Shemesh 等^[9-10]对牛以及 Sawitzke 等^[11]对兔和鼠的研究结果也证实了相同的变化规律。

大量研究表明,子宫中 *LHR* mRNA 表达量的变化与 COX-2 和 PGF 产物的诱导作用之间存在一定程度的相关性^[2,12],*LH* 能够使黄体期子宫内膜 *LHR* 表达量达到最高值,这将促进子宫内膜中 COX-2 和 PGF_{2α} 的分泌,伴随其分泌量的增多,将诱导黄体溶解,继而降低卵泡期子宫内膜的 *LH* 结合位点数量,这一点也由体外注射 PGF_{2α} 后黄体中

LH 结合位点的数量降低所证实^[13]。这种先于排卵前 *LH* 峰的 PGF_{2α} 浓度的升高,将诱发排卵并起始一个新的发情周期^[12-14],这说明子宫中的 *LHR* 在发情周期的调节过程中也发挥了重要作用。因此 Rahe 等推论,*LHR* 在子宫中数量的增加要比外周血浆中 *LH* 的浓度变化所发挥的作用更加重要^[15]。

3.2 *LHR* 在介导子宫功能调节中的作用

我们的研究发现,处于发情周期不同阶段的子宫中 *LHR* mRNA 表达量的变化趋势,与血清中 *LH* 浓度变化趋势不一致^[16],Sawitzke 等^[11]对鼠的研究也证实了这点。在排卵前 *LH* 峰到来之前,*LHR* 在黄体期达到最高值,这或许能够表明 *LH* 对性腺外组织的作用机制和其对排卵调控机制不一致^[8,11],也说明还有其他的影响反刍动物发情周期的调节和植入过程的特异性细胞因子的存在。

传统观点认为,子宫仅是胚胎发育和卵巢激素的靶器官,然而近年来研究表明,子宫与下丘脑-垂体-卵巢系统形成完整的内分泌轴,子宫内膜合成和分泌的激素、酶类、肽类物质对于维持子宫本身和全身生殖生理及生殖内分泌功能都发挥重要的作用。子宫上 *LHR* 的发现,或许能够表明主要作用

于卵巢调控卵泡发育的 *LH* 可能对子宫的生理活性也有重要意义。尽管 *LHR* 已经在包括人和多种动物的生殖道内发现,但是它对于反刍动物的作用或许更加重要。因为反刍动物的黄体溶解主要由子宫所调节,并且子宫内环境中的旁分泌-自分泌规律是黄体溶解的一个重要部分^[17]。Weems^[14]等研究发现 *LH* 能够促进母羊子宫内膜前列腺素的合成,表明 *LH* 在母羊的黄体溶解过程中也发挥一定的作用,并且也参与到发情周期的调节和植入过程中,因此,在今后的生产实践中,可以通过外源性因素来调节和影响山羊的周期发情及提高山羊的繁殖力等。

本试验研究了发情周期的不同阶段济宁青山羊子宫中 *LHR* mRNA 的表达规律,为进一步揭示非性腺组织中 *LHR* 的功能提供了一定的理论依据,这为提高山羊繁殖率的研究提供了基础研究数据,对于保护地方品种等方面的研究也具有重要的意义。

致谢:本试验是在莱芜市畜牧局和莱芜黑山羊育种研究所的大力协助下完成的。在此,对在研究中提供帮助的魏述东研究员以及莱芜黑山羊育种研究所的全体职工表示诚挚的感谢!

参考文献:

- [1] MENON K M, MUNSHI U M, CLOUSER C L, et al. Regulation of luteinizing hormone /human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(4): 861-866.
- [2] FRIEDMAN S, GUREVICH M, SHEMESH M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors[J]. *Biol Reprod*, 1995, 52: 1020-1026.
- [3] STEPIEN A, DERECKA K, GAWRONSKA B, et al. LH/hCG receptors in the porcine uterus-a new evidence of their presence in the Cervix[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2000, 51(4): 917-931.
- [4] ZHENG M L, SHI H, DEBORAH L, et al. Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64: 179-187.
- [5] RAO C V, LEI Z M. Consequences of targeted inactivation of LH receptors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 57-67.
- [6] 陈 蕾, 白宏伟, 尹善德, 等. 子宫内膜癌组织中黄体生成素及其受体的表达意义[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(4): 310-312.
- [7] 郑丕留. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989.
- [8] RZUCIDLO S J, WEIGL R M, TILTON J E. Myometrial LH/hCG receptors during the estrous cycle and pregnancy in pigs[J]. *Animal Reproduction Science*, 1998, 51: 249-257.
- [9] SHEMESH M, MIZRACHI D, GUREVICH M, et al. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium; LH augmentation of cAMP and inositol phosphate in vitro and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin in vivo[J]. *Reprod Biol*, 2001, 1: 13-32.
- [10] SHEMESH M, MIZRACHI D, GUREVICH M, et al. Functional importance of bovine myometrial and vascular LH receptors and cervical FSH receptors [J]. *Semin Reprod Med*, 2001, 19: 87-96.
- [11] SAWITZKE A L, ODELL W D. Uterine binding sites for LH/hCG can be modulated by hormonal status in rabbits and rats [J]. *Acta Endocrinol*, 1991, 124: 322-330.
- [12] STEPIEN A, SHEMESH M, ZIECIK A J. Luteinizing hormone-receptor kinetic and LH-induced prostaglandin production throughout the estrous cycle in porcine endometrium[J]. *J Reprod Nutr Dev*, 1999, 39: 663-674.
- [13] BEHRMAN H R. Prostaglandins in hypothalamo-pituitary and ovarian function[J]. *Annual Reviews of Physiology*, 1979, 41: 685-700.
- [14] WEEMS Y S, KIM L, HUMPHREYS V, et al. Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on ovine endometrium of the estrous cycle or placental secretion of prostaglandins E2 (PGE2) and F2a (PGF2a) and progesterone in vitro [J]. *Prostaglandins*, 2003, 71: 55-73.
- [15] RAHE C H, OWENS R E, FLEEGER J L, et al. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle[J]. *Endocrinology*, 1980, 107: 498-503.
- [16] 徐 直, 蒋振国, 徐一树, 等. 黑白花奶牛发情周期血液中各种生殖激素含量及其变化[J]. 天津农业科学, 1998, 4: 1-4.
- [17] MICHAEL J, FIELDS, MORDECHAI SHEMESH. Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71: 1412-1418.