

# FSH 调节仔猪睾丸支持细胞 GDNF 表达的 信号机制

孙 燕<sup>1,2</sup>, 王鲜忠<sup>1,2</sup>, 吴建云<sup>1,2</sup>, 朱峰伟<sup>1</sup>, 向 阳<sup>1</sup>, 杨炜蓉<sup>1</sup>, 张家骅<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南大学牧草与草食家畜重点实验室, 重庆 400716; 2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400716)

**摘 要:** 本研究旨在阐明 FSH 调节睾丸支持细胞 GDNF 表达的信号机制。以体外培养的仔猪睾丸支持细胞为试验材料, 通过加入不同信号通路因子, 采用 RT-PCR 和 Western blot 等方法研究了 FSH 对支持细胞 GDNF 表达的调节。结果: (1) FSH( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理支持细胞, 可迅速激活 MEK 激酶, 随着 FSH 刺激时间的延长, ERK1/2 活性逐渐升高(0~30 min); (2) dbcAMP( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 同样能迅速激活 MEK 激酶, 诱导 GDNF 蛋白、mRNA 的表达; ERK1/2 活性随 dbcAMP 刺激时间的延长逐渐升高(0~30 min); (3) 加入 MEK1/2 的抑制剂 U0126 和 PKA 的抑制剂 H89, 则显著抑制了 FSH 对 GDNF 的激活作用, GDNF 蛋白、mRNA 和活性明显下降; (4) 加入 PKA 的抑制剂 H89( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 则明显抑制了 FSH 诱导的 ERK1/2 磷酸化的激活作用。结果表明, FSH 可通过 cAMP-PKA 激活 ERK 级联调节支持细胞 GDNF 的表达。

**关键词:** FSH; 支持细胞; GDNF 蛋白; 信号传导

中图分类号: S828.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1351-06

## The Signaling Mechanism of GDNF Expression in Sertoli Cells of Piglet Testis Regulated by FSH

SUN Yan<sup>1,2</sup>, WANG Xian-zhong<sup>1,2</sup>, WU Jian-yun<sup>1,2</sup>, ZHU Feng-wei<sup>1</sup>,  
XIANG Yang<sup>1</sup>, YANG Wei-rong<sup>1</sup>, ZHANG Jia-hua<sup>1,2\*</sup>

(1. Chongqing Key Laboratory of Forage & Herbivore, Southwest University, Chongqing  
400716, China; 2. College of Animal Science and Technology, Southwest University,  
Chongqing 400716, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the mechanism of FSH regulating GDNF expression in Sertoli cells. Different factors (inhibitor or activator) of signal pathway was added to Sertoli cells *in vitro* cultured, RT-PCR and Western blot were used to detect the effect of FSH on GDNF expression. The result showed that: (1) FSH( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) could active ERK1/2 prominently along with a maximum stimulation at 2 h, the ERK1/2 reached a peak activity at 30 min. (2) dbcAMP( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could not only increase the activity of ERK1/2 but also enhance the level of GDNF protein and mRNA with a maximum stimulation at 2 h. (3) While adding U0126 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MEK1/2 inhibitor) or H89 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PKA inhibitor) to culture medium, the results showed that the expression level of GDNF protein, mRNA and activity decreased apparently as compared with that in the cells treated with FSH alone. (4) The FSH-activated ERK1/2 in the cultured SC was time-dependent, with a peak activity at 20 min. The activation of ERK1/2 by FSH was blocked by PKA inhibitor H89. These results indicate that FSH can activate ERK1/2 via cAMP-PKA, which increase the expression of GDNF in Sertoli cell.

收稿日期: 2010-10-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2009B036); 西南大学博士启动基金(08BSr03)

作者简介: 孙 燕(1976-), 女, 重庆万州人, 副教授, 博士, 主要从事动物生殖内分泌与生殖调控研究, E-mail: yans76@sina.com.cn

\* 通讯作者: 张家骅, 教授, Tel: 023-68251215, E-mail: j.zhang@swu.edu.cn

**Key words:** FSH; Sertoli cell; GDNF; signal transduction

胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是支持细胞(Sertoli cell, SC)在 FSH 调控下合成分泌的调节雄性动物支持细胞增殖和精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSC)增殖/分化的关键因子<sup>[1-3]</sup>。大鼠的支持细胞和分化的生殖细胞都表达 GDNF mRNA 和蛋白质,表明在这些细胞类型中 GDNF 以旁分泌或自分泌方式调节 SSC 的增殖和分化<sup>[4]</sup>。当支持细胞异常地超表达 GDNF 时,会引起生殖干细胞的积聚和异常扩充<sup>[5]</sup>。我们的前期研究发现,外源性添加 FSH 可以浓度-时间依赖性促进体外培养的 SC 的 GDNF 蛋白表达<sup>[6-7]</sup>,但 FSH 调节 GDNF 表达的分子机制仍不清楚。本研究通过添加信号传导路径中的抑制剂或促进剂,采用半定量 PCR 和免疫印迹对 FSH 调控 GDNF 表达的信号通路机制进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

睾丸采自重庆本地 4 周龄仔猪。

### 1.2 主要试剂

GDNF 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK(E-4)购自 Santa Cruz Biotechnology; DMEM/F-12 购于 Hyclone 公司;dbcAMP、U0126、FSH 为 Sigma 公司产品。GDNF 引物参照人的 GDNF 基因(GenBank 收录号:L19063),用引物设计软件 Primer Premier 5.0 自行设计(上游引物:5' AAACAGACGGCTG-GTAAG3';下游引物:5' CTTCCATCCTGGGCAA-AC3'),GDNF 及  $\beta$ -actin 引物均由上海生物工程公司合成,利用这些引物扩增产物经测序后确定为目的基因的产物。

### 1.3 试验方法

1.3.1 SC 的培养及处理 SC 的分离和纯度鉴定按 Wang 等的方法进行<sup>[8]</sup>。接种密度为:蛋白印迹试验为  $2 \times 10^6$  个·孔<sup>-1</sup>;RT-PCR 试验为  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个·孔<sup>-1</sup>。细胞培养条件为 37 ℃、95% 空气和 5% CO<sub>2</sub>。培养过夜,按试验要求处理细胞。试验使用的培养液均为无血清培养液。

1.3.1.1 FSH 对 ERK1/2 活性的影响:试验中 FSH 的剂量以实验室前期的试验结果<sup>[9]</sup>为基础,在本试验中使用剂量为  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,分别于 0 min、

15 min、30 min、1 h、2 h 收集培养液,每个处理设 3 个重复,提取蛋白,进行免疫印迹。蛋白提取和免疫印迹按 Wang 等的方法进行<sup>[8]</sup>。

1.3.1.2 dbcAMP 对 GDNF mRNA、GDNF 蛋白和 ERK1/2 活性的影响:试验中 dbcAMP 的浓度按照说明书所设定的范围进行预试验,最终的使用浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,试验中用 dbcAMP( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )刺激培养至贴壁的支持细胞,分别于 0 min、15 min、30 min、1 h、2 h 收集细胞,每个处理设 3 个重复,提取蛋白和 RNA,进行免疫印迹和 RT-PCR。p-ERK 的检测方法与 GDNF 蛋白相似,仅将相应的抗体稀释比例调整为 1:350。

1.3.1.3 U0126 和 H89 对 FSH 诱导的 GDNF 蛋白表达的影响:试验中 U0126 和 H89 的浓度按照说明书所设定的范围进行预试验,最终的使用浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。支持细胞培养 48 h 后,加入 U0126( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )或 H89( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),对照用等体积的 DMSO 取代,孵育细胞 1 h。然后加入 FSH( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),刺激 2 h 后收集细胞,提取蛋白,进行免疫印迹和 RT-PCR 检测。

1.3.2 半定量 RT-PCR 反应 逆转录反应体系:  $2 \mu\text{g}$  RNA 模板,  $1 \mu\text{g}$  oligo(dT)18,  $5 \mu\text{L}$  反转录缓冲液,  $2 \mu\text{L}$  dNTP(A、G、C、T 浓度均为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $30 \text{ U}$  禽源反转录酶(AMV Reverse Transcriptase)(购自 Promega),终体积  $25 \mu\text{L}$ 。37 ℃ 水浴 60 min, 70 ℃ 10 min 终止反应。

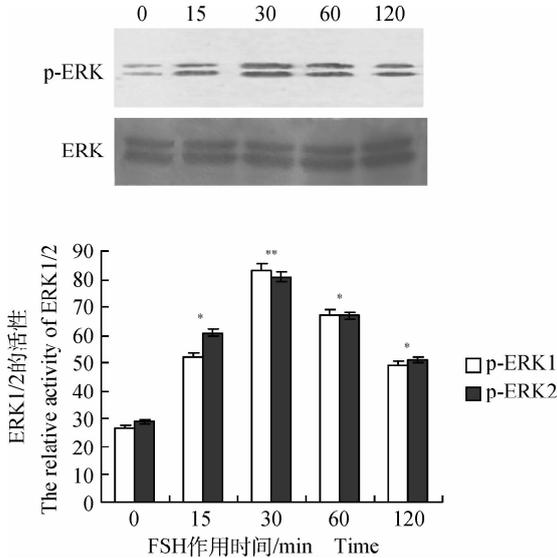
PCR 反应体系  $50 \mu\text{L}$ : 反转录产物  $2 \mu\text{L}$ 、TaqDNA 聚合酶 1.5 U,上下游引物各 20 pmol。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,循环 35 次;72 ℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖水平电泳 45 min。凝胶自动成像及分析系统摄像并测定各条带的灰度。以  $\beta$ -actin 作为内标, GDNF mRNA 的表达按下式进行计算:基因表达值 = GDNF mRNA/ $\beta$ -actin mRNA  $\times 100\%$ 。

1.3.3 统计学分析 用 SPSS 16.0 One way ANOVA 和 Tukey's post hoc test 进行统计分析,所有百分数在进行分析前先进行反正弦转化,  $P < 0.05$  确定为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 FSH 对 ERK1/2 活性的影响

从图 1 可以发现,FSH 能迅速引起 ERK1/2 的磷酸化,而且这种诱导作用具有时间依赖性:FSH 作用 15 min,可检测到磷酸化的 ERK1/2;FSH 作用 30 min,其磷酸化水平达到最高,随后逐渐降低。



\*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ . 下同  
\*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ . The same as below

图 1 FSH 对 ERK1/2 活性的影响  
Fig. 1 Effect of FSH on ERK1/2 activity

### 2.2 dbcAMP 对 GDNF mRNA 和蛋白的影响

图 2 显示,加入 dbcAMP( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )刺激 SC 15 min,GDNF mRNA 的表达与 0 min 时相比,显著升高( $P < 0.05$ ),刺激时间到 30 min 时,极显著升高( $P < 0.01$ ),并且随时间的进一步延长(60、120 min),GDNF mRNA 的表达也进一步增加。

GDNF 蛋白的表达随着 dbcAMP 刺激时间的延长而逐渐增加(图 3):到 15 min 时检测到 GDNF 蛋白,刺激 15 和 30 min,表达显著升高( $P < 0.05$ ),刺激时间延长到 60 min,GDNF 蛋白的表达量进一步极显著增加( $P < 0.01$ ),到 120 min 达到最高。

### 2.3 dbcAMP 对 ERK1/2 活性蛋白的影响

加入 dbcAMP( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )后,迅速检测到 ERK1/2 的磷酸化(图 4),而且这种诱导作用具有时间依赖性:dbcAMP 作用 15 min,可检测到磷酸化的 ERK1/2;dbcAMP 作用 30 min,其磷酸化水平达到最高,随后逐渐降低,但是直到 120 min,ERK1/2 的磷酸化水平仍显著高于 0 min 时刻的水平( $P < 0.05$ )。

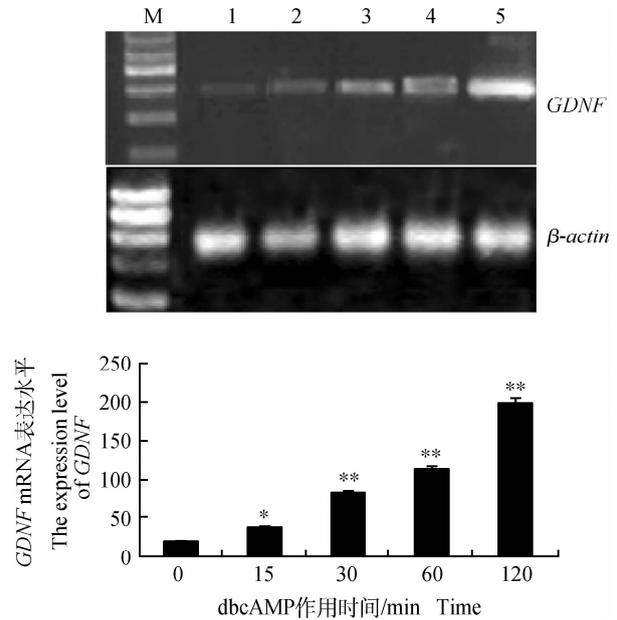
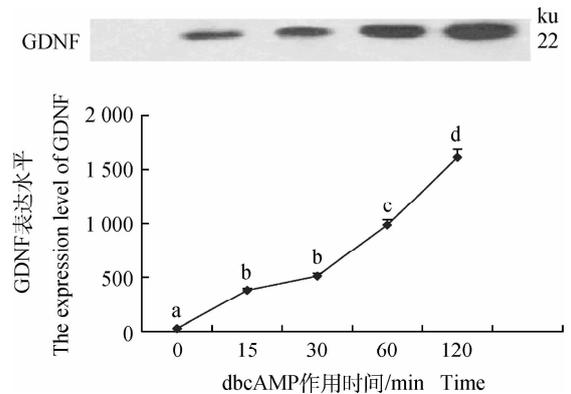


图 2 dbcAMP 对 GDNF mRNA 的影响  
Fig. 2 Effect of dbcAMP on GDNF mRNA



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )  
The different lowercases show the significant difference at  $P < 0.05$  level

图 3 dbcAMP 对 GDNF 蛋白表达的影响  
Fig. 3 Effect of dbcAMP on GDNF expression

### 2.4 U0126 和 H89 对 FSH 诱导的 GDNF 蛋白表达的影响

H89( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )或 U0126( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )均可极显著地抑制 FSH 诱导的 GDNF 蛋白的表达( $P < 0.01$ ,图 5),但二者的抑制效果并不完全相同。结果提示,不仅 cAMP-PKA 路径参与了 FSH 诱导支持细胞 GDNF 的表达,ERK 级联通路也参与了其中。但是还不能明确 ERK 级联影响的 GDNF 表达是否受到 cAMP-PKA 的上级调控。

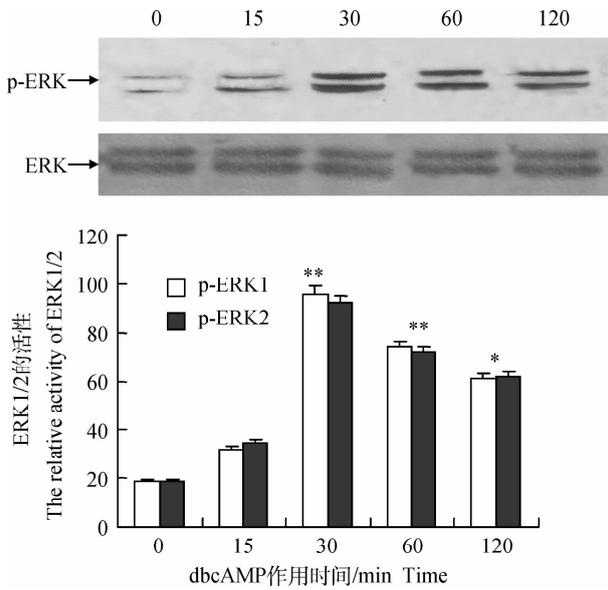


图 4 dbcAMP 对 ERK1/2 活性的影响  
Fig. 4 Effect of dbcAMP on ERK1/2 activity

ERK1/2 的激活是通过 PKA 来实现的。

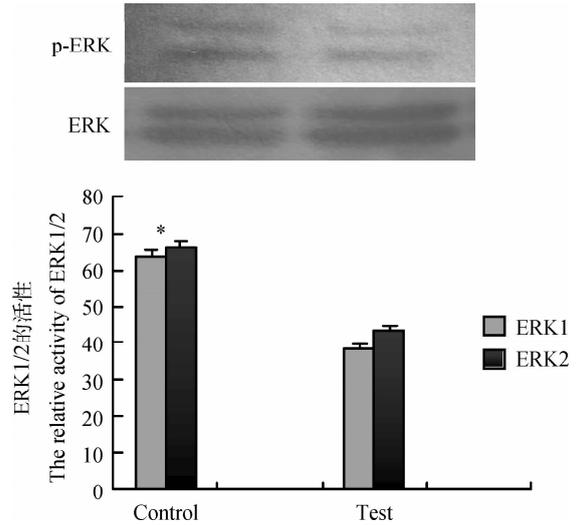


图 6 H89 对 FSH 诱导的 ERK1/2 活性的影响  
Fig. 6 Effect of H89 on the activity of ERK1/2

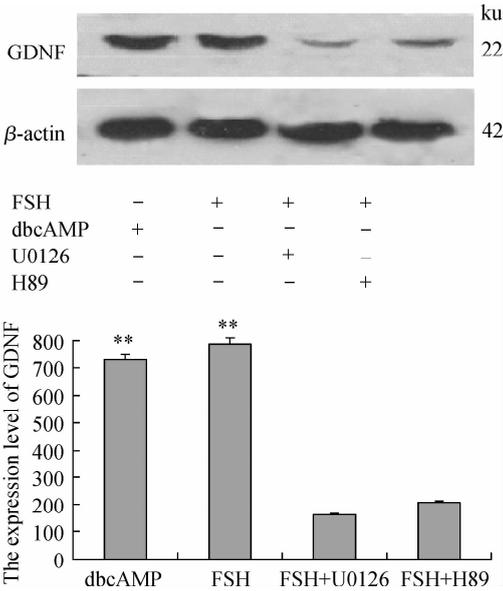


图 5 U0126 和 H89 对 FSH 诱导的 GDNF 蛋白表达的影响  
Fig. 5 Effect of U0126 and H89 on GDNF expression

### 2.5 H89 对 FSH 诱导的 ERK1/2 活性的影响

为了研究 cAMP-PKA 是否激活 ERK1/2, 我们用  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H89 (PKA 的特异性抑制剂) 处理 20 min, 然后再用 FSH ( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理细胞, 分别于 0、30 min 裂解细胞测定 ERK1/2 活性变化, 对照组一直用 FSH ( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理细胞。结果显示: H89 显著抑制了 FSH 诱导的 ERK1/2 磷酸化的激活作用 ( $P < 0.05$ ) (图 6), 表明 FSH 对 SC 中

## 3 讨论

### 3.1 FSH 刺激支持细胞 GDNF 蛋白表达的 cAMP-PKA 途径

cAMP-PKA 途径是第一条被证实的 FSH 促进 SC 增殖的信号通路<sup>[9]</sup>。本试验结果 (图 2 和图 3) 表明, 用 FSH 或 dbcAMP 刺激 SC, 可迅速促进 GDNF mRNA 和蛋白的表达, 并且这种刺激作用具有时间依赖性, 表明 FSH 对 GDNF 基因以及蛋白表达的调节是通过 cAMP 实现的。结果 (图 5 和图 6) 还发现, H89 可显著抑制 FSH 诱导的 GDNF 蛋白的表达, 表明 FSH 是通过 cAMP-PKA 路径实现对 GDNF 蛋白表达的调节。这一试验结果与 McLeand 等人<sup>[10]</sup>的研究结果相吻合, 他们用寡核苷酸芯片发现 20 d 的大鼠睾丸 SC 中的许多基因的转录都受 FSH 调控, Di-butyrilcAMP 能模拟 FSH 对 CREB 的磷酸化作用。

活化的 PKA 也可使 NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B, 核因子  $\kappa$ B) 磷酸化, 从而使 NF- $\kappa$ B 移位到核内, 调节基因的转录。用 PKA 信号通路的激活剂 Forskolin 或 FSH 刺激 SC, 能增加 NF $\kappa$ B 与 cAMP 调节的基因中增加子序列的结合活性。发现 FSH 与受体结合后能增加细胞内 cAMP 的水平, 并激活 PKA, 活化的 PKA 能磷酸化 AP2 和 NF- $\kappa$ B, 磷酸化的 NF- $\kappa$ B 能将 NF $\kappa$ B 释放出来, NF $\kappa$ B 和 AP2 转移到细胞核内就能加强 AMH 的转录<sup>[11]</sup>。

cAMP-PKA 途径还能激活多个信号通路。cAMP 和 PKA 被认为通过抑制 MAPK 的激活阻断了有丝分裂原的刺激作用,但是用 Forskolin 和 di(But)-cAMP 都能模拟 FSH 诱导出出生后 5 d 的大鼠 SC 中 ERK 的磷酸化,在加入 FSH 前用 PKA 的抑制剂 H89 预处理 SC,FSH 诱导的 ERK 的磷酸化消失了,表明 PKA 参与了 ERK 的激活<sup>[12]</sup>。PKA 也可以激活处于增殖、分化期的 SC 中的 p70S<sup>6K</sup>,但激活机制不同。Lécureuil 等发现 FSH 在培养条件下能通过 PKA 调节分化的大鼠 SC 中 p70S<sup>6K</sup> 的活性,但是在来源于出生不久的大鼠 SC 中,FSH 可能通过 PKA 抑制了 ERK1/2 组成性的磷酸化,使 Thr421/Ser424 去磷酸化,激活 p70S<sup>6K</sup><sup>[13]</sup>。

### 3.2 FSH 刺激 SC 中 GDNF 蛋白表达的 MAPK 途径

促分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein, MAP kinases, MAPK) 是控制胚胎发生、细胞分化、细胞增殖和细胞死亡的主要信号途径。

我们的试验结果显示,50 ng · mL<sup>-1</sup> FSH 能迅速引起 ERK1/2 的磷酸化(图 3),而且这种诱导作用具有时间依赖性。用 50 μmol · L<sup>-1</sup> 的 dbcAMP 处理 SC,也激活了 ERK1/2(图 4),但不影响 ERK1/2 总蛋白表达量。dbcAMP 引起 ERK1/2 的磷酸化效应与 FSH 刺激时相似,提示 FSH 对 ERK1/2 的激活作用依赖于 cAMP。而添加 MAPK (MEK1/2) 抑制剂 U0126 则显著抑制了 FSH 诱导的 GDNF 表达,表明 FSH 通过激活 MAPK 途径刺激 GDNF 的表达(图 5)。

FSH 是否能激活 SC 中的 ERK 级联反应,主要与 SC 是否处于分化期有关。在增殖期的大鼠 SC (5 和 11 d) 中,FSH 通过 FSHR 同时与 Gs 和 Gi 结合,以 PKA 和 Src 依赖的方式激活 ERK,并且通过 ERK 增加 cyclin D1 的表达,促进了 SC 的增殖。但是 FSH 却抑制了处于分化期 (19 d) 大鼠 SC 中 ERK 的激活,说明 ERK 主要参与了 SC 的增殖,而对于精子发生的作用不明显<sup>[12]</sup>。我们的研究发现,FSH 可以通过激活 ERK1/2,进而刺激 SC 表达 GDNF,这与我们选择 4 周龄仔猪睾丸 SC 作为研究对象有关,这个时期的 SC 处于增殖期,这与之前发现 FSH 促进 SC 增殖以及 PCNA 表达的结果相一致<sup>[6]</sup>。最近也有报道称,FGF 对新生仔猪睾丸 SC 增殖具有促进作用,但并不影响其 GDNF 的表

达<sup>[14]</sup>。

任何一种信号传入细胞的过程中,都是不断接受其它信号的调节,通过不断地调控,从而形成一种混合式的控制模型,从而保证信号的精确性。我们的研究发现,FSH 在调节 SC 中 GDNF 蛋白表达的过程中,既通过 cAMP-PKA 调节 GDNF 基因的表达促进 SC 中 GDNF 蛋白的表达,又可通过 cAMP-PKA 激活 ERK 级联反应,促进 GDNF 基因的表达。是否还有其它信号调节通路参与这一调节以及各条信号通路的交互作用还需进一步研究。

## 4 结 论

ERK1/2 的抑制剂 (U0126) 以及 PKA 的抑制剂 (H89) 可抑制 FSH 刺激的 SC 中 GDNF 的表达,表明外源性 FSH 通过激活 cAMP-PKA 进而活化 ERK1/2 的级联反应,即通过 MAPK 信号通路调节体外培养的仔猪睾丸 SC 中 GDNF 的表达。

### 参考文献:

- [1] MENG X, LINDAHL M, HYVONEN M, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF [J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1489-1493.
- [2] KYLE C, JOHNATHAN B, DEREK M. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells [J]. *J Endocrinology*, 2010, 205: 133-145.
- [3] OATLEY J M, AVARBOCK M R, BRINSTER R L. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25842-25851.
- [4] FOUCHECOURT S, GODET M, SABIDO O, et al. Glial cell-line-derived neurotrophic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis [J]. *J Endocrinol*, 2006, 190: 59-71.
- [5] YOMOGIDA K, YAGURA Y, TADOKORO Y, et al. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1303-1307.
- [6] 孙 燕, 王鲜忠, 吴建云. 等. FSH 对仔猪睾丸支持细胞增殖和 GDNF 表达的调节 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(11): 982-987.

- [7] 孙 燕,王鲜忠,吴建云,等. FSH 通过激活 ERK1/2 调节仔猪睾丸支持细胞 GDNF 的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2008,39(8):1040-1044.
- [8] WANG X Z, ZHAO B C, ZHOU Y L, et al.  $17\beta$ -estradiol regulates boar Sertoli cell proliferation via the cAMP-ERK1/2 pathway and the  $\beta$  estrogen receptor [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(8): 1201-1210.
- [9] 王鲜忠,周玉兰,赵伯川,等. FSH 通过 cAMP、 $Ca^{2+}$  调节仔猪睾丸支持细胞的增殖[J]. 畜牧兽医学报, 2010,41(10):1245-1249.
- [10] McLEAND J, FRIELP J, POUCHNIK D, et al. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle stimulating hormone treated rat sertoli cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16:2780-2792.
- [11] CROISIER L C, LASALA C, NICAUD J, et al. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-müllerian Hormone (AMH) Production through Sertoli Cell Proliferation and a Nonclassical Cyclic Adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene [J]. *Mol Endocrinol*, 2003,17(4):550-561.
- [12] CREPIEUX P, MARION S, MARTINAT N, et al. The ERK-dependent signalling is stage specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation[J]. *Oncogene*,2001, 20:4696-4709.
- [13] LÉCUREUIL C, TESSERAUD S, KARA E, et al. FSH activates p70 ribosomal protein S6 kinase by protein kinase A mediated dephosphorylation of Thr 421/ Ser 424 in primary Sertoli cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(7):1812-1820.
- [14] KUIJK E W, BEN C, BERNARD A J. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells[J]. *Reproduction*,2009,138(2):721-731.

(编辑 郭云雁)