

猪发育期 *NPY-Y1* 和 *GPR54* 受体基因的表达规律研究周春宝^{1,2}, 倪黎纲^{1,2}, 丁家桐³, 韩大勇^{1,2}, 朱道仙^{1,2}

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏姜曲海种猪场, 江苏泰州 225300; 3. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要 [目的]研究猪发育期 *NPY-Y1* 和 *GPR54* 受体基因的表达性变化。[方法]分别选取初生、60、120、初情期、180 日龄的苏姜猪母猪各 3 头, 采集下丘脑、垂体、卵巢组织样品, 提取组织 RNA, 采用荧光定量 PCR 分析 *NPY-Y1*、*GPR54* 受体基因的表达性变化。[结果]下丘脑、垂体与卵巢内 *NPY-Y1* mRNA 从初生到初情期表达量逐渐下降, 在初情期达到最低, 初情期后呈上升趋势。在 3 种组织内, 初情期与其他时期 *NPY-Y1* mRNA 表达量均存在显著差异 ($P < 0.05$); *GPR54* mRNA 从初生到初情期表达量逐渐上升, 在初情期达到最高, 初情期后呈下降趋势。在 3 种组织内, 初情期也与其他时期 *GPR54* mRNA 表达量也均存在显著差异 ($P < 0.05$)。[结论]猪发育期 *NPY-Y1* 基因与 *GPR54* 基因表达存在负相关性。

关键词 猪; *NPY-Y1* 基因; *GPR54* 基因; 发育性变化

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)02-00635-03

Study on the Regularity of *NPY-Y1*, *GPR54* Acceptor Gene Development Expression in Development Stage of Pig

ZHOU Chun-bao et al (Jiangsu Provincial Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract [Objective] To study development expression of *NPY-Y1* and *GPR54* acceptor gene in development stage of pig. [Method] Three female Sujiang pigs were selected in different stages of birth, 60, 120, puberty and 180 days, total RNA extracted from tissue samples of hypothalamus, pituitary and ovaries, development expression of *NPY-Y1* and *GPR54* gene were determined by quantitative RT-PCR. [Result] The results showed that the expression abundance of *NPY-Y1* mRNA was gradually descending from birth to puberty, and after puberty the expression abundance was ascending tendency in all three tissues, and the expression abundance at the stage of puberty was significant difference with the other stage ($P < 0.05$). But the expression abundance of *GPR54* mRNA was gradually ascending from birth to puberty, and after puberty the expression abundance was descending tendency in all three tissues, the expression abundance at the stage of puberty was also significant difference with the other stage ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression abundance of *GPR54* mRNA was associativity with *NPY-Y1* mRNA in development stage of pig.

Key words Pig; *NPY-Y1* gene; *GPR54* gene; Development expression

哺乳动物初情期启动主要是 GnRH 脉冲式释放的调控, 在初情期前 GnRH 神经元脉冲发生器 (GnRH pulse generator) 已具备分泌 GnRH 的能力, 但由于受到上游神经元分泌的抑制性神经递质的作用, 不能有效地脉冲释放 GnRH^[1-2]; 初情期由非类固醇介导的中枢机制调控 GnRH 的释放, 从而引起动物初情期启动, 其中调控因素包括神经肽、神经递质、神经类固醇^[3]。然而, 调控因素之间的相互关系及其对动物初情期启动的具体作用机理, 还有待于进一步研究。

哺乳动物的下丘脑、垂体和卵巢分泌的激素在功能上相互作用, 构成一个完整的神经内分泌生殖调节体系, 即下丘脑-垂体-卵巢轴, 其在生殖活动中起着主要的调节作用^[4]。笔者研究了动物发育期神经肽 NPY 受体 *NPY-Y1* 基因和 G 蛋白偶联受体 *GPR54* 基因在下丘脑-垂体-卵巢轴的变化规律, 并探讨这 2 个基因之间的相互关系与其在动物初情期启动过程中的作用机理。

1 材料与方

1.1 实验动物 初生、60 日龄、120 日龄、初情期、180 日龄的苏姜猪 (暂定名) 母猪各 3 头, 由江苏姜曲海种猪场 (江苏泰州) 提供。试验母猪为同期扩繁纯种苏姜猪母猪。

1.2 质粒和菌株 pGEM-T easy 载体购自北京博大泰克生物工程有限公司, DH5 α 大肠杆菌由江苏畜牧兽医职业技术学院实验室保存。

基金项目 江苏省自然科学基金项目 (BK2005050); 江苏省农业三项工程项目 (sx(2007)088)。

作者简介 周春宝 (1973-), 男, 江苏高邮人, 副教授, 博士, 从事动物生殖调控研究与应用。

收稿日期 2012-11-13

1.3 主要试剂 限制性内切酶 *EcoRI*、高保真聚合酶 DNA Polymerase 和反转录试剂盒, 均购自大连宝生物 (TaKaRa) 生物工程有限公司; DEPC 购自 SIGMA 公司; DNA Marker 购自上海申能博彩生物工程公司; Trizol Reagent 和氨苄青霉素 (Ampicillin) 购自上海生工生物工程有限公司; PCR 试剂购自北京博大泰克生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 引物设计 试验用于荧光定量分析的内参基因 β -actin 引物, 根据 GenBank 中登录的 cDNA 序列 (DQ845171) 设计, 根据 GenBank 中登录的猪 *NPY-Y1* 基因的 cDNA 序列 (AF106081) 和猪 *GPR54* 基因的 cDNA 序列 (DQ459346), 采用 Primer 5.0、Oligo 6.0 等引物设计软件各设计 1 对引物, 所用的引物序列如表 1。

表 1 引物序列

基因	GenBank 登录号	片段大小//bp	引物序列
猪 <i>NPY-Y1</i>	AF106081	158	F: 5'-ACCATAACCTCTGTGTCCTGCTC-3' R: 5'-CACCTCATAGTCATCGTCCCG
猪 <i>GPR54</i>	DQ459346	137	F: TGTTCATCTTCGTCATCTGTCCG R: AGCCTGGTAGGGGTAGACTAG
β -actin	DQ845171	302	F: ATGGACTCTGGGGATGGGGT R: TCGTTGCCGATGGTGATGAC

1.5 RNA 提取与检测 苏姜猪 5 个不同日龄段试验母猪颈动脉放血致死, 迅速取出下丘脑、垂体、卵巢组织放入液氮中保存, 并进行组织总 RNA 的提取, 总 RNA 的提取按照 Trizol Reagent 说明书进行操作。

1.6 实时荧光定量标准品的克隆 参照反转录试剂盒说明

书进行反转录,合成 cDNA 第 1 链。然后,以 cDNA 第 1 链为模板,利用 PCR 技术扩增内参 β -actin、猪 *NPY-Y1*、*GPR54*、*Ob-Rb* 的目的基因。将 PCR 产物进行常规的琼脂糖凝胶电泳分析后,使用胶回收试剂盒回收目的片段,与 pGEM-T easy 载体连接后,转化入 DH5 α 感受态细胞,然后使用限制性内切酶 *EcoR*I 单酶切进行鉴定,将经鉴定的阳性菌送交百泰克生物有限公司进行测序分析。

1.7 荧光定量标准曲线的绘制 β -actin、猪 *NPY-Y1*、*GPR54* 目的基因的标准质粒进行 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍稀释作为制备标准曲线的模板。依次加入 1.5 μ l cDNA 模板、9.0 μ l SYBR Green、0.5 μ l 上游引物(10 mmol/L)、0.5 μ l 下游引物(10 mmol/L),加无酶水至总体积 20 μ l,建立荧光定量 PCR 反应体系。

1.8 样品中 β -actin、猪 *NPY-Y1* 与 *GPR54* 基因的检测 β -actin、猪 *NPY-Y1*、*GPR54* 目的基因的标准质粒进行 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍稀释作为模板,样品用试验组和对对照组的组织 RNA 的反转录产物作为模板,分别检测样品中 β -actin、猪 *NPY-Y1*、*GPR54* 目的基因的相对拷贝数。然后,分别计算出 *NPY-Y1*/ β -actin、*GPR54*/ β -actin mRNA 的比值。

1.9 数据处理与分析 试验数据均以“平均值 \pm 标准差”表示。利用 SPSS13.0 软件对试验数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取 将提取的猪下丘脑、垂体、卵巢组织总 RNA 进行电泳检测。从图 1 可以看出,28S、18S RNA 条带清晰,浓度比约为 2:1,并且使用分光光度计检测 RNA 的纯度和含量, A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0,说明提取的组织总 RNA 的完整性良好,可以用于后续试验。

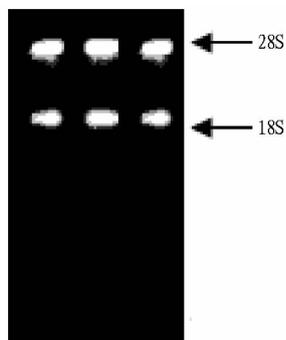
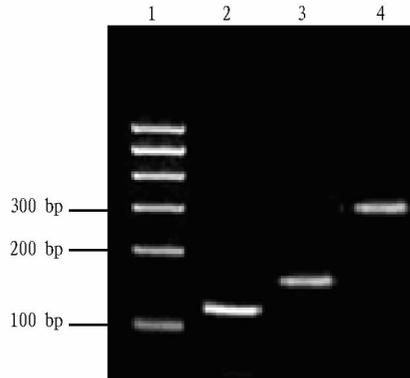


图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 基因扩增与克隆测序 设计的内参 β -actin、猪 *NPY-Y1*、*GPR54* 目的基因引物在猪下丘脑组织中得到了较好的扩增(图 2),测序结果表明猪 *NPY-Y1* 目的基因扩增片段为 158 bp,与引物设计源序列(GenBank, AF106081) 同源性为 100%;猪 *GPR54* 目的基因扩增片段为 137 bp,与引物设计源序列(GenBank, DQ459346)同源性为 100%;内参 β -actin 基因扩增片段为 302 bp,与引物设计源序列(GenBank, DQ845171)的同源性为 100%。

2.3 下丘脑、垂体与卵巢内 *NPY-Y1* mRNA 表达的实时荧光定量检测 由表 2 可知,下丘脑、垂体与卵巢内 *NPY-Y1* mRNA 发育性变化模式基本相同,从初生到初情期表达量逐

渐下降,在初情期达到最低,初情期后呈上升的趋势。下丘脑内各个时期 *NPY-Y1* mRNA 表达量均存在显著差异($P < 0.05$);垂体内 *NPY-Y1* mRNA 表达量 120 日龄与 180 日龄差异不显著($P > 0.05$),其他时期 *NPY-Y1* mRNA 表达量均显著差异($P < 0.05$);初情期与 180 日龄卵巢内 *NPY-Y1* mRNA 表达量差异不显著($P > 0.05$),其他时期 *NPY-Y1* mRNA 表达量均显著差异($P < 0.05$)。



注:M. DNA Marker;1. *NPY-Y1* 的 RT-PCR 产物;2. *GPR54* 的 RT-PCR 产物;3. β -actin 的 RT-PCR 产物。

图 2 RT-PCR 扩增猪 *NPY-Y1*、*GPR54*、 β -actin 基因的电泳图谱
表 2 苏姜猪下丘脑、垂体与卵巢内 *NPY-Y1* mRNA 表达的实时荧光定量检测

时期	下丘脑	垂体	卵巢
初生	3.27 \pm 0.02 a	1.82 \pm 0.01 a	2.76 \pm 0.02 a
60 日龄	2.13 \pm 0.01 b	1.52 \pm 0.02 b	1.32 \pm 0.01 b
120 日龄	1.42 \pm 0.00 c	1.25 \pm 0.01 c	0.94 \pm 0.01 c
初情期	1.14 \pm 0.02 d	1.12 \pm 0.01 d	0.67 \pm 0.00 d
180 日龄	1.56 \pm 0.01 e	1.27 \pm 0.01 c	0.73 \pm 0.03 d

注:同列不同小写字母分别表示不同组织间差异显著($P < 0.05$)。

2.4 下丘脑、垂体与卵巢内 *GPR54* mRNA 表达的实时荧光定量检测 由表 3 可知,下丘脑、垂体与卵巢内 *GPR54* mRNA 发育性变化模式基本相同,从初生到初情期表达量逐渐上升,在初情期达到最高,初情期后呈下降的趋势。下丘脑内初情期与初生、180 日龄的 *GPR54* mRNA 表达量均存在显著差异($P < 0.05$);垂体内初情期与初生、60 日龄、180 日龄的 *GPR54* mRNA 表达量均存在显著差异($P < 0.05$);卵巢内初情期与初生、60 日龄、120 日龄、180 日龄的 *GPR54* mRNA 表达量均存在显著差异($P < 0.05$)。

表 3 苏姜猪下丘脑、垂体与卵巢内 *GPR54* mRNA 表达的实时荧光定量检测

时期	下丘脑	垂体	卵巢
初生	0.26 \pm 0.03 a	0.67 \pm 0.05 abd	0.44 \pm 0.07 a
60 日龄	0.51 \pm 0.07 abc	0.70 \pm 0.02 b	0.72 \pm 0.07 bce
120 日龄	0.62 \pm 0.02 bc	0.72 \pm 0.05 cbd	0.83 \pm 0.07 ce
初情期	0.66 \pm 0.02 b	0.83 \pm 0.04 c	1.38 \pm 0.07 d
180 日龄	0.51 \pm 0.04 c	0.40 \pm 0.06 d	0.62 \pm 0.07 e

注:同列不同小写字母表示不同组织间差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

目前,实时荧光定量 PCR 技术已经广泛用于检测基因的表达水平,通过实时荧光定量 PCR 可以可靠、高灵敏度地

对 mRNA 的表达进行绝对定量^[5-6]。笔者用 SYBR Green I 为荧光染料对苏姜猪初情期前后下丘脑-垂体-卵巢轴中的 *NPY-Y1*、*GPR54* mRNA 表达进行定量分析,并探讨它们在动物发育期的表达规律。

3.1 *NPY-Y1* 的发育性变化 神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 属胰多肽家族,广泛分布于中枢及外周神经组织的神经元中^[7-8]。目前研究表明 NPY 具有血管收缩、摄食、激素分泌以及情绪等多种生理功能的调节^[9-10],并且 NPY 的生理作用主要是通过其分布广泛的特异受体介导,已经确定的至少有 6 种 (Y1 ~ Y6),均属于 G 蛋白受体家族^[11]。*NPY-Y1* 是 NPY 最主要的受体,了解 *NPY-Y1* 在下丘脑-垂体-卵巢轴的发育性变化,将有助于推动对 NPY 发育调节生理功能的进一步研究。该研究表明,苏姜猪从初生到初情期 *NPY-Y1* mRNA 表达量逐渐下降,在初情期达到最低,初情期后呈上升的趋势,说明 *NPY-Y1* 对初情期的启动起负调控作用,这与前人的研究报道相一致。Nanobashvili 等^[12] 研究表明 *NPY-Y1* 在下丘脑的表达水平与 GnRH 呈负相关。Lado-Abeal 等^[13] 研究表明,初情期前表达 NPY mRNA 的细胞明显多于初情期,向雄猴脑室内灌注 NPY-Y1 受体拮抗剂可刺激 LH 的分泌。

3.2 *GPR54* 的发育性变化 目前,国内外关于 *GPR54* 的发育性变化的研究报道较少。Muhammad 等^[14] 研究表明,幼年到初情期阶段雌猴弓状核 *GPR54* mRNA 表达水平逐渐增加,下丘脑 *GPR54* 基因的表达量初情期为初生时的 3 倍。Josephine 等^[15] 研究表明在灰色鲷鱼初情期的早期阶段以 *GPR54* 的高水平表达为特征,而相对于初情期的晚期而言,此时脑部的 GnRH (除 GnRH1 外) 和 *Drd2* 表达量较低;在卵巢中 *GPR54* 和 GnRH1 表达量在初情期晚期显著升高,说明灰色鲷鱼初情期可能受到 *GPR54* 和 GnRH1 的联合调节作用。该研究结果表明,下丘脑-垂体与卵巢内 *GPR54* mRNA 表达量均从初生到初情期表达量逐渐上升,在初情期达到最高,初情期后呈下降趋势。该研究结果与目前已报道的其他物种的研究结果基本相同,同时也进一步证实了 *GPR54* 与初情期发育密切相关。

3.3 *NPY-Y1* 与 *GPR54* 的表达相关性 目前,关于 *NPY-Y1* 基因与 *GPR54* 基因表达相关性的研究报道还未见报道,已有研究表明 *GPR54* 和 GnRH 可能联合调节垂体,刺激释放 LH 和 FSH 作用,而 NPY 对 GnRH 释放的影响是复杂的^[16],据报道 NPY 对 GnRH 既有兴奋作用又有抑制作用^[12,17]。该研究表明在动物发育早期 *NPY-Y1* 表达较多,而 *GPR54* 释放较少,在发情期 *GPR54* 大量释放,而检测的 *NPY-Y1* 表达较少。

这可能与 NPY 对 GnRH 的释放抑制作用相关。由此可见, *NPY-Y1* 基因与 *GPR54* 基因表达存在负相关性。

参考文献

- [1] KUNEKE G, PARVIZI N, ELSAESSER F. Effect of maloxone and pulsatile luteinizing - hormone - releasing hormone infusions on oestradiol - induced luteinizing hormone surges in immature gilts [J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 395 - 401.
- [2] EVANS A C O, ODOHERTY J V. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts [J]. *Livestock Production Science*, 2001, 68: 1 - 12.
- [3] 崔毓桂, 徐智策, 王兴海. 神经肽 Y 与发育的启动 [J]. *国外医学 (计划生育分册)*, 2003, 22(2): 111 - 114.
- [4] 王凌燕, 王树迎, 侯衍猛, 等. 哺乳动物下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2005, 26 (7): 8 - 11.
- [5] BUSTIN S A. Absolute quantification of mRNA using real - time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169 - 193.
- [6] MORRISON T, WEISJ J, WITTWER C T. Quantification of low - copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification [J]. *Bio Techniques*, 1998, 24(6): 954 - 962.
- [7] GENAZZANI A R, BERNARDI F, MONTELEONE P, et al. Neuropeptides, neurotransmitters, neurosteroids, and the onset of puberty [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 900(1): 1 - 9.
- [8] PELLIEUX C, SAUTHIER T, DOMENIGHETTI A, et al. Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine - induced mitogen - activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y5 receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1595 - 1600.
- [9] CHRONWALL B M, DIMAGGIO D A, MASSARI V J, et al. The anatomy of neuropeptide - Y - containing neurons in rat brain [J]. *Neuroscience*, 1985, 15(4): 1159 - 1181.
- [10] COLMERS W F, BLEAKMAN D. Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons [J]. *Trends Neurosci*, 1994, 17(9): 373 - 379.
- [11] LARHAMMAR D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide [J]. *Regulatory Peptides*, 1996, 65 (3): 165 - 174.
- [12] NANOBASHVILI A, AIRAKSINEN M S, KOKAIA M, et al. Development and persistence of kindling epilepsy are impaired in mice lacking glial cell line - derived neurotrophic factor family receptor $\alpha 2$ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 12312 - 12317.
- [13] LADOABEAL J, HICKOX J R, CHEUNG T I, et al. Neuroendocrine consequences of fasting in adult male macaques: Effects of recombinant rhesus macaque leptin infusion [J]. *Neuroendocrinology*, 2000, 71(1): 197 - 208.
- [14] MUHAMMAD S, CLAUDIO M, STEPHANIE B, et al. Increased hypothalamic *GPR54* signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 2129 - 2134.
- [15] NOCILLADO J N, LEVAVI SIVAN B, CARRICK F, et al. Temporal expression of G - protein - coupled receptor 54 (*GPR54*), gonadotropin - releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (*drd2*) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus* [J]. *Genral and Comparative Endocrinology*, 2007, 150: 278 - 287.
- [16] PARHAR I S, OGAWA S, SAKUMA Y. Laser captured single digoxigenin - labeled neurons of gonadotropin - releasing hormone types reveal a novel G protein - coupled receptor (*Gpr54*) during maturation in cichlid fish [J]. *Endocrinol*, 2004, 145(8): 3613 - 3618.
- [17] HAROLD G S, PAU K Y, YANG S P. Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and Rhesus Monkeys [J]. *Bio Repro*, 1997, 56: 310 - 321.