



雄激素受体对绵羊卵巢颗粒细胞发育的调控作用

李容青¹, 特日格勒³, 付绍印³, 何小龙³, 达赖³, 王力伟³, 高元帅¹, 张文佳¹, 解志强¹,
杨会国⁴, 王标^{3*}, 刘永斌^{2*}

(1. 内蒙古大学, 呼和浩特 010000; 2. 内蒙古农业大学, 呼和浩特 010000; 3. 内蒙古自治区农牧业科学院,
呼和浩特 010000; 4. 新疆维吾尔自治区畜牧科学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 旨在探究敲低雄激素受体(androgen receptor, AR)后对绵羊卵巢颗粒细胞(granulosa cells, GC)发育的影响机制。本研究选取健康成年绵羊为试验对象, 手术法采集卵巢, 分离并鉴定绵羊卵巢颗粒细胞。敲低绵羊卵巢颗粒细胞的AR, 通过CCK-8法、ELISA法检测绵羊卵巢颗粒细胞的增殖活性和雌二醇(estradiol, E2)的分泌水平。敲低AR后通过转录组测序(transcriptome Sequencing, RNA-seq)筛选影响绵羊卵巢颗粒细胞发育的关键差异表达基因(DEGs), 对其进行功能富集分析, 并利用RT-qPCR和Western blot验证与绵羊卵巢颗粒细胞发育相关的信号通路及其差异基因。结果表明, 本研究成功分离并鉴定了绵羊卵巢颗粒细胞; 敲低AR后会显著降低绵羊卵巢颗粒细胞的增殖活性。当AR被敲低后, 通过转录组测序筛选到1 187个差异基因, 465个基因上调, 722个基因下调。根据这些差异基因筛选出对绵羊卵巢颗粒细胞发育具有重要调控作用的关键信号通路: PI3K-Akt信号通路和雌激素信号通路, 并对关键基因PI3K、AKT、p-AKT、ESR2、CYP19A1、BAX、BAX/BCL2、Caspase3进行验证; 敲低AR后PI3K-Akt信号通路中关键基因PI3K、AKT、p-AKT显著下调($P < 0.05$), 雌激素合成关键基因ESR2、CYP19A1显著下调($P < 0.05$), 而细胞增殖相关基因BAX、BAX/BCL2、Caspase3显著上调($P < 0.05$)。综上所述, 本研究发现敲低绵羊卵巢颗粒细胞AR后, 可能通过PI3K-Akt信号通路和雌激素信号通路来影响绵羊卵巢颗粒细胞的增殖和激素合成, 从而参与细胞的发育过程。

关键词: AR; 颗粒细胞; 增殖; 激素; 发育

中图分类号: S826.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0246-12

The Regulatory Role of Androgen Receptor in the Development of Ovarian Granulosa Cells in Sheep

LI Rongqing¹, TE Rigele³, FU Shaoyin³, HE Xiaolong³, DA Lai³, WANG Liwei³, GAO Yuanshuai¹,
ZHANG Wenjia¹, XIE Zhiqiang¹, YANG Huiguo⁴, WANG Biao^{3*}, LIU Yongbin^{2*}

(1. Inner Mongolia University, Hohhot 010000, China; 2. Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China; 3. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010000, China; 4. Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Animal Science, Urumqi 830011, China)

Abstract: This study aimed to investigate the mechanism by which knockdown of androgen receptor (AR) in sheep affects the development of ovarian granulosa cells (GC). The healthy, adult sheep was selected as experimental subjects, employing surgical procedures to obtain ovarian tissue, from

收稿日期: 2025-05-23

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1300904); 内蒙古自治区揭榜挂帅项目(2022JBGS0012; 2022JBGS0024); 内蒙古自治区科技计划项目(2019GG349; 2021GG0443); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-38)

作者简介: 李容青, 博士, 主要从事绵羊遗传资源与干细胞生物学研究, E-mail: rong-qing.li@mail.imu.edu.cn

* 通信作者: 王标, 主要从事绵羊分子育种与遗传改良研究, E-mail: wangbnd@163.com; 刘永斌, 主要从事绵羊种业科技创新与草食家畜育种理论、生殖发育及表观遗传调控机制研究, E-mail: ybliu117@126.com

which granulosa cells were subsequently isolated and characterized. After silencing *AR* expression in granulosa cells (GCs), cell proliferation and estradiol (E2) production were assessed in sheep ovarian GCs through CCK-8 and ELISA techniques. Furthermore, after *AR* knockdown, key differentially expressed genes (DEGs) affecting ovarian granulosa cell development were identified through transcriptome sequencing (RNA-seq). These genes were subjected to functional enrichment analysis, and signaling pathways involved in granulosa cell development, along with their associated DEGs, were validated using RT-qPCR and Western blot assays. The results demonstrated that the study successfully isolated and identified granulosa cells, and that knockdown of *AR* significantly reduces the proliferation activity of these cells. More importantly, after *AR* was knocked down, 1 187 differentially expressed genes was identified through transcriptome sequencing, with 465 genes upregulated and 722 genes downregulated. Based on these differentially expressed genes, key signaling pathways involved in granulosa cell development were identified, including the PI3K-Akt pathway and the estrogen signaling pathway. The key genes *PI3K*, *AKT*, *p-AKT*, *ESR2*, *CYP19A1*, *BAX*, *BAX/BCL2*, and *Caspase3* were further validated. Following *AR* silencing, the expression levels of critical genes within the PI3K-Akt signaling cascade—specifically *PI3K*, *AKT*, and *p-AKT* were significantly reduced ($P < 0.05$). Similarly, key genes associated with estrogen biosynthesis, *ESR2* and *CYP19A1*, exhibited significant downregulation ($P < 0.05$). Conversely, genes linked to cellular proliferation, including *BAX*, the *BAX/BCL2* ratio, and *Caspase3*, showed a significant increase in expression ($P < 0.05$). In summary, these findings suggest that knocking down *AR* in sheep ovarian granulosa cells may influence cell proliferation and hormone synthesis through the PI3K-Akt signaling pathway and the estrogen signaling pathway, thereby participating in the process of cellular development.

Keywords: *AR*; granular cells; proliferation; hormone; development

* **Corresponding authors:** WANG Biao, E-mail: wangbnd@163. com; LIU Yongbin, E-mail: ybliu117@126. com

绵羊是内蒙古地区的主要畜种,其繁殖性能对畜牧业的生产效益至关重要,但绵羊卵巢中的大部分卵泡在排卵前发生闭锁,卵泡利用率较低,家畜的繁殖性能与复杂的卵泡发育过程密切相关^[1]。所以在畜牧生产中对绵羊卵泡发育过程的研究非常关键,卵泡由卵母细胞、卵巢颗粒细胞(GC)与卵泡膜细胞组成,GC围绕着卵母细胞组成卵丘-卵母细胞复合物(COC)^[2],而GC通过自分泌、旁分泌和内分泌作用为卵母细胞提供激素、信号分子、细胞因子和脂肪因子等活性物质^[3-4]。经研究,GC的增殖和分化导致卵泡成熟和排卵,而GC的凋亡和变形导致卵泡闭锁。细胞凋亡进程由Bcl和caspase家族共同执行和调控,Bcl家族中的B细胞淋巴瘤2(BCL2)和BCL2关联X蛋白(BAX)是标志性的促进和抑制细胞增殖的蛋白,Caspase家族可以决定颗粒细胞是否发生凋亡^[5]。其中PI3K/Akt信号通路

也参与了卵泡发育过程中颗粒细胞的生长凋亡过程^[6],因此GC的生长和发育对卵泡的发育至关重要^[7]。所以研究绵羊卵巢颗粒细胞的功能对探究卵泡的发育过程具有重要意义。

在卵泡发育过程中,促卵泡激素(FSH)、雄激素和雌激素等关键激素参与了卵母细胞的发育和颗粒细胞的增殖^[8],在FSH的调控下^[9],细胞色素P450家族19亚家族A成员1(CYP19A1)催化雄激素转化为雌激素,其中雄激素通过与AR相互作用在卵泡发育的不同阶段发挥特定的关键作用^[10],而雌激素可与雌激素受体2(ESR2)结合调控卵泡的发育与排卵。雄激素受体(AR)是类固醇受体,在卵泡发育的大多数阶段均有表达,AR在窦前卵泡中高表达,在排卵前卵泡中表达显著降低^[11]。这意味着,AR对卵巢颗粒细胞的发育具有重要的调控作用。AR的表达与全身多系统疾病高度相关,当AR

表达出现异常,机体会发生病变^[12-14]。早期研究发现,卵巢细胞特异性AR敲除小鼠生殖正常,而GC特异性AR敲除小鼠则表现出低生育率、低产仔数和发情周期延长的症状,因此AR主要在卵泡颗粒细胞中发挥作用^[11]。与之类似的是,灵长类动物中AR的表达与卵泡生长和GC增殖呈正相关,与卵泡闭锁和GC凋亡呈负相关^[15]。AR的表达在哺乳动物卵巢中高度保守,AR主要在人、灵长类动物、小鼠、大鼠、牛、猪、绵羊卵泡的颗粒细胞上表达,调节卵泡的生长发育和排卵过程^[16]。但其对绵羊卵巢颗粒细胞发育的调控机制尚不清楚。

探究AR对卵巢颗粒细胞的影响机制对研究卵泡的发育至关重要,因此本研究希望通过敲低卵巢颗粒细胞AR的表达来探究AR在GC中的关键调控作用机制,为探究AR对卵泡发育以及排卵的影响提供初步理论基础,为研究影响绵羊繁殖的因素提供新的思路和线索。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本研究选取健康的体况相近的18月龄蒙古羊,这些羊均产过一次羔且在采样前表现出发情行为。采样于10月进行,在内蒙古自治区乌兰察布市四子王旗的屠宰场,通过手术法采集卵巢组织样本。

1.2 试验材料

主要试剂:Medium M199培养基(Gibco公司),GP-transfect-Mate转染试剂(苏州吉玛生物公司),全蛋白提取试剂盒(北京索莱宝公司),CCK-8试剂盒(白鲨生物公司),ELISA E2 Kit(睿信科技生物公司),Rabbit Anti-AR antibody抗体、Mouse Anti-

GAPDH antibody(北京博奥森公司),PI3 Kinase p85 Antibody、AKT Monoclonal antibody、Phospho-AKT(Ser473)Polyclonal antibody(Immunoway生物公司)。

主要仪器:CO₂细胞培养箱(Thermor公司),超净台(苏州安泰公司),安全柜、高速冷冻离心机(湖南湘仪公司),酶标仪(Thermor公司),细胞计数仪(Applied Biosystems公司),倒置显微镜、荧光显微镜(OLYMPUS公司),实时荧光定量PCR仪(乐普医疗公司),电泳仪(Bio-Rad公司),移液器(Eppendorf公司)。

1.3 方法

1.3.1 卵巢颗粒细胞的培养与鉴定 手术法采集健康成年绵羊卵巢,含双抗DPBS清洗卵巢,注射器抽取直径小于3 mm卵泡中的颗粒细胞,收集细胞于M199培养液中培养,置37℃,5% CO₂的培养箱中。将原代颗粒细胞接入96孔板,细胞汇合度为60%时,4%多聚甲醛固定,0.2% Triton X-100通透30 min,5% BSA封闭1 h,FSHR、AR一抗(1:1 000)4℃过夜,荧光二抗(1:1 000)避光1 h,DAPI避光5 min,荧光显微镜下观察。

1.3.2 干扰序列的设计与转染 根据NCBI androgen receptor Gene ID: 443042,利用在线工具设计3条siRNA干扰序列(表1),由生物公司合成。将颗粒细胞接种到6孔板中,待细胞汇合度为70%左右,转染干扰序列,OPTI-MEM与GP-transfect-Mate轻混,静置5 min,OPTI-MEM与siRNA溶液轻混,静置5 min,将两种混合物轻混,静置20 min,缓缓滴加到细胞中,置37℃,5% CO₂的细胞培养箱中培养。

表1 siRNA干扰序列

Table 1 siRNA interference sequences

编号 Number	序列(5'→3') Sense	互补序列(5'→3') Antisense
siRNA-1	GCUGCUCACC GAUCUUAATT	UUAAGAUCGGUGGAGCAGCTT
siRNA-2	GCGCCAAGGAGUUGUGUAATT	UUACACAACUCCUUGGCGCTT
siRNA-3	GGAGCUCUCACUUGUGGAATT	UUCCACAAGUGAGAGCUCCTT

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖活性 转染后收集细胞,以9 000个·孔⁻¹接种于96孔板中,6 h后每孔加入10 μL CCK-8溶液,置培养箱中孵育2 h,在450 nm处测定OD值。

1.3.4 ELISA法检测E2分泌水平 收集细胞培养液上清,在包被孔中加入50 μL待测样品,50 μL酶标抗原,50 μL抗体,预包被板上粘上封板膜,孵育1 h,洗涤液洗3次,加50 μL显色A液,

50 μL 显色 B 液混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 加 50 μL 终止反应液, 450 nm 处测定 OD 值, 计算并绘制标准曲线并计算激素浓度。

1.3.5 转录组文库构建与测序 收集 RNA 样品寄送杭州联川生物技术股份有限公司进行处理, Trizol 提取细胞 RNA, 质控、纯化, 以片段化的 mRNA 为模板、加入随机六聚体引物、缓冲液、dNTPs、逆转录酶, 合成 cDNA 链, 双端测序, 获得细胞转录组数据。对测序数据进行过滤, 获得高质量数据, 与绵羊参考基因组 NCBI genome00248 进行比对, 进行基因表达定量、基因差异分析、富集分析。

1.3.6 RT-qPCR 根据 NCBI sheep Gene ID: 9940 设计引物(表 2)。提取细胞总 RNA: 转染后加 Trizol 裂解细胞 10 min, 加氯仿, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 12 000 g, 离心 15 min。吸取透明水相, 加异丙醇, 离心 10 min,

弃上清, 加 75% 乙醇, 离心 5 min, 弃上清, 开盖晾干, 加入 DEPC H_2O 溶解。反转录为 2 步法: 第一步去除基因组 DNA, 总体系为 10 μL : 2 μL 5 $\times$ gDNA Eraser Buffer, 1 μL gDNA Eraser, 1 μg RNA, DEPC 水补至 10 μL ; 反应程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。第二步为反转录反应, 总体系为 20 μL : 10 μL 上述混合液, 1 μL PrimeScriptRT Enzyme Mix 1, 1 μL RT Primer Mix, 4 μL 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2, 4 μL RNase Free dH_2O 补至 20 μL ; 反应程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。RT-PCR 总体系为 20 μL : 10 μL TB Green Premix Ex Taq II, 1 μL PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL cDNA, 7 μL DEPC H_2O 补至 20 μL ; 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 39 个循环; 55 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 Quantitative primer sequences for real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequences	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
AR	Forward	TATGGGGACATGCGTTTGGA
	Reverse	TGCTGGCACACAGGTACTTC
GAPDH	Forward	GTTTGTGATGGGCGTGAACC
	Reverse	GCGTGGACAGTGGTCATAAGT
BCL2	Forward	GGGGTCATGTGTGTGGAGAG
	Reverse	TGCAGCTCCACAAAGGCGTC
BAX	Forward	TTCCGACGGCAACTTCAACT
	Reverse	CTGATCAACTCGGGCACCTT
Caspase3	Forward	TTCAGAGGGGACTGTTGCAG
	Reverse	CAGTCCAGTTCTGTGCCTCG
ESR2	Forward	AGAAGATTCCGGGCTTCGTG
	Reverse	GAGCAAAGATGAGCTTGCCG
CYP19A1	Forward	TCGTCCTGGTCACCCCTTCTG
	Reverse	CGGTCTCTGGTCTCGTCTGG

1.3.7 Western blotting 提取细胞总蛋白: 转染后刮刀刮下细胞, 加 Lysis Buffer 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、PMSF 配制裂解液, 冰上裂解 30 min, 离心后上清与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合, 水浴变性。BCA 法蛋白定量: 25 μL 待测样品于 96 孔板, 加 200 μL BCA 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 562 nm 下测定吸光度。根据标准曲线 $y=0.9227x+$

0.1416 , $R^2=0.9998$, 计算样品蛋白浓度, y 为测得样品吸光度, x 为对应蛋白样品浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳: 制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 于 1 $\times$ 电泳缓冲液中, 90 V 电泳 110 min 后, 切胶裁剪 PVDF 膜, 在转膜仪上, 20 V 转 55 min, 封闭 2 h, 一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗 (1:1 000) 孵育 2 h, ECL 显色成像, 用 Image-Pro Plus 6.0 分析条带灰度值。

1.3.8 数据统计分析 每组试验设置3个重复,所有试验结果均以“平均值±标准差”的形式表示,使用 Graph Pad prism 8.0 对对照组和敲低组进行 *t* 检验并绘图,以 $P<0.05$ (*)表示组间差异具有统计学意义, $P<0.01$ (**)表示组间差异极显著。

2 结果

2.1 绵羊卵巢颗粒细胞的鉴定

为了研究 AR 在卵巢颗粒细胞中的定位及功能,选取健康成年绵羊为研究对象,通过手术法采

集卵巢,并分离颗粒细胞。将分离得到的细胞进行培养,并观察其形态变化。如图1所示,发现绵羊卵巢颗粒细胞为贴壁细胞,细胞形态呈梭形。进一步通过免疫荧光染色检测了绵羊特异性蛋白标志物 FSHR 在这些细胞的表达情况,发现 FSHR 呈阳性表达,且荧光信号较强(图1)。这表明分离得到的细胞为绵羊卵巢颗粒细胞且纯度较高。更重要的是,通过免疫荧光发现,AR 主要在卵巢颗粒细胞的细胞质中表达。

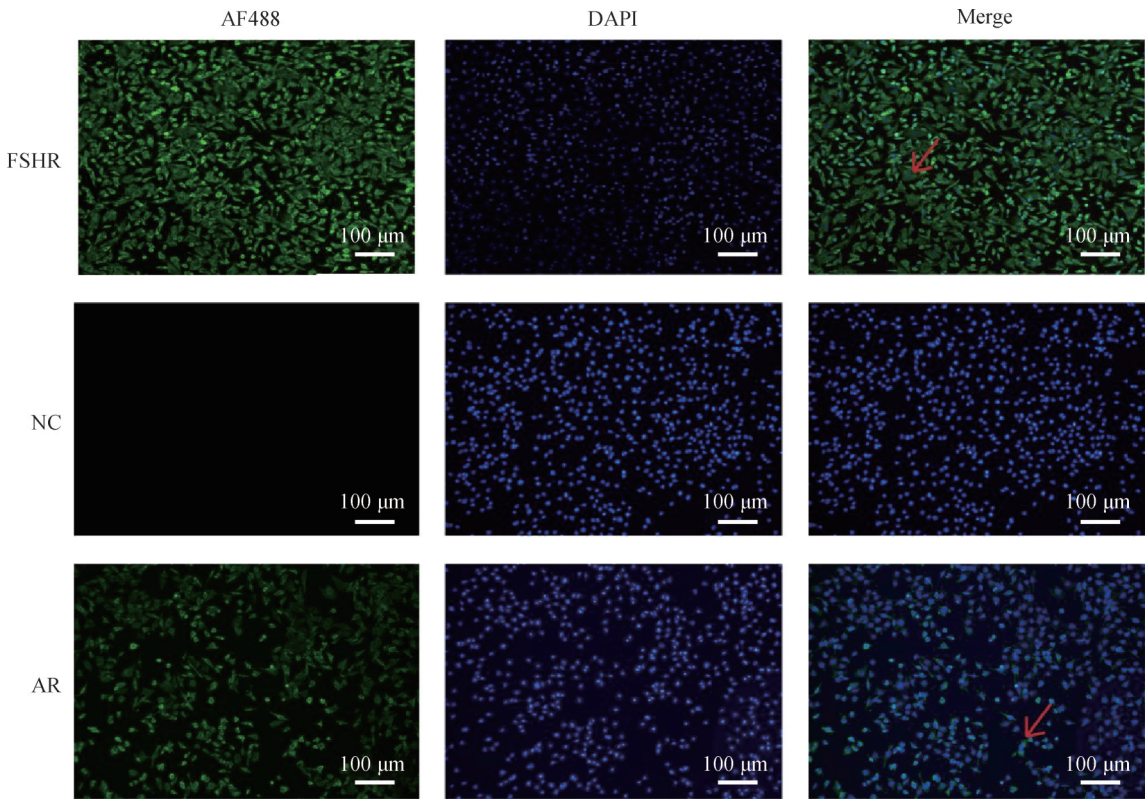


图1 绵羊卵巢颗粒细胞的鉴定与 AR 在颗粒细胞的定位

Fig. 1 Identification of sheep ovarian granulosa cells and localization of AR in granulosa cells

2.2 敲低 AR 对颗粒细胞活性的影响

为了进一步研究 AR 对卵巢颗粒细胞功能的影响,选取了3条小干扰 RNA 对 AR 敲低后检测卵巢颗粒细胞的活性。在这些 siRNA 序列中, siRNA-3 能够明显降低 AR 蛋白的表达量,因此选用 siRNA-3 进行后续试验(图2A)。通过 siRNA 对颗粒细胞内的 AR 进行不同时间段(0、24 和 48 h)的敲低,并记录了颗粒细胞的生长状态。发现,在 0 h 时,2 组生长状态良好且一致;在 24、48 h 时,对照组细胞生长状态良好,但敲低 AR 组的细胞数明显减少(图2B)。

与之类似的是,通过 CCK-8 法检测了卵巢颗粒细胞的增殖活性(图2C),发现在 24、36、48 h 敲低 AR 细胞组的 OD 值显著低于对照组 ($P<0.05$)。这表明敲低 AR 对卵巢颗粒细胞的增殖具有重要的调控作用,敲低 AR 会显著降低颗粒细胞的活性。

2.3 转录组质控与分析

尽管发现 AR 的敲低会降低卵巢颗粒细胞的活性,但不清楚其具体的分子机制。为了阐明敲低 AR 对卵巢颗粒细胞影响的具体机制,将对照组和敲低组的颗粒细胞进行转录组测序。对照组与敲

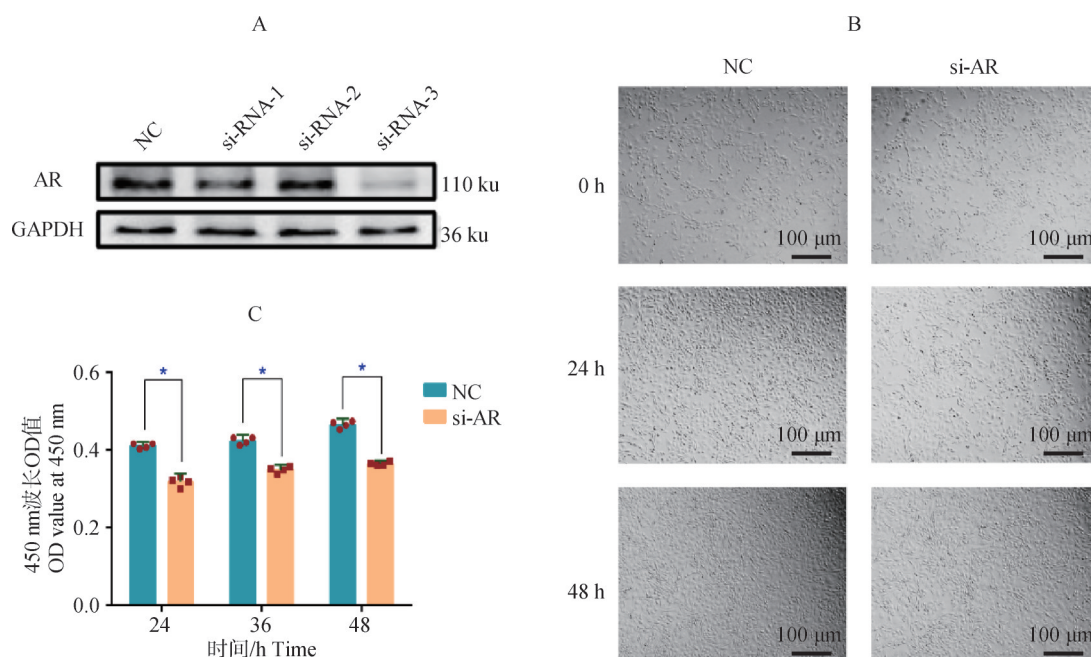


图2 敲低AR对颗粒细胞增殖活性的影响。*。 $P < 0.05$,下同

A. Validation of 3 siRNA sequences; B. State of granulosa cells following AR knockdown; C. Effect of AR knockdown on cell proliferation. *, $P < 0.05$, the same as below

图2 敲低AR对颗粒细胞增殖活性的影响

Fig. 2 Effect of AR knockdown on the proliferative activity of granulosa cells

低组之间的Pearson相关系数大于0.90($P < 0.01$),这表明样品间相关性较好(图3A)。在PCA主成分分析中,对照组与敲低组样品间存在明显分离(图3B)。同时,小提琴图评估样品基因表达水平的分布密度,对照组与敲低组样本的中位数和分布形态无偏移(图3C)。通过分析发现,对照组与敲低组间存在显著差异(图3D)。通过上述差异分析,当 $P < 0.05$ 时,以差异表达量变化超过1.5作为显著上调的变化阈值,小于1/1.5作为显著下调的变化阈值。基于这一前提,与对照组相比,敲低组中筛选出差异基因1 187个,其中上调基因465个,下调基因722个(图3E)。

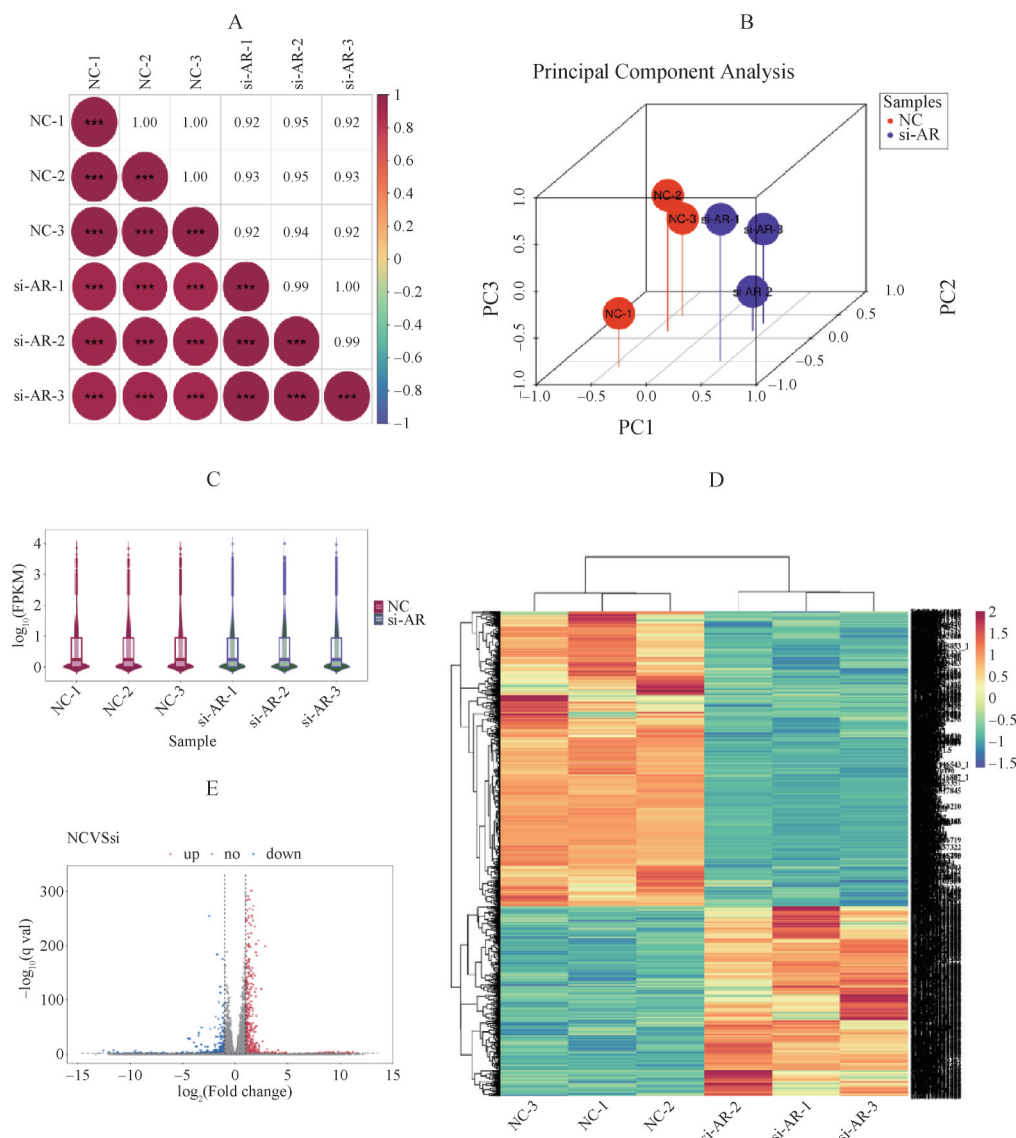
2.4 转录组差异基因富集分析

为了阐明敲低AR后对卵巢颗粒细胞发育影响的可能机制,对差异基因进行GO富集分析,结果显示这些差异基因主要富集在细胞组分中的细胞外基质和细胞表面,参与细胞外基质结构成分的分子功能,并参与了积极调节细胞迁移、细胞粘附的生物过程(图4A)。进一步对这些差异基因进行KEGG富集分析,以 $q < 0.05$ 进行筛选,结果显示这些差异基因显著富集在PI3K-Akt信号通路、FoxO

信号通路和雌激素信号通路上(图4B)。值得注意的是,与对照组相比,敲低AR后,PI3K-Akt信号通路和雌激素信号通路中共同富集且显著下调的TOP关键基因包括PIK3CD、BCL2、ATF6B、CREB3L1、LOC105609336(图4C)。此外,对PI3K-Akt信号通路和雌激素信号通路进行GSEA富集分析,结果显示,敲低组的核心富集基因均显著下调(图4D、E)。这些研究表明,AR的敲低可能通过影响PI3K-Akt信号通路和雌激素信号通路来影响卵巢颗粒细胞的发育。

2.5 转录组差异基因验证

本研究进一步对转录组筛选到的PI3K-Akt信号通路、雌激素信号通路中的关键下调差异基因进行验证。针对共同富集到的关键下调基因PIK3CD、BCL2,通过Western-blot检测发现,敲低AR导致卵巢颗粒细胞中的PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达显著下调($P < 0.05$)(图5A、B)。这表明,敲低AR可能会通过影响PI3K-AKT信号通路来介导卵巢颗粒细胞的发育。众所周知,PI3K-Akt信号通路能够调控细胞的凋亡,因此猜测敲低AR可能会通过影响PI3K-Akt信号通路来影响卵巢颗粒细胞



A. 样本相关性分析, ***, $P < 0.001$; B. 主成分分析; C. 小提琴图; D. 差异基因聚类热图; E. 差异基因火山图

A. Samples correlation analysis, ***, $P < 0.001$; B. Principal component analysis (PCA); C. Violin diagram; D. Differential gene clustering heat map; E. Differential genes volcano map

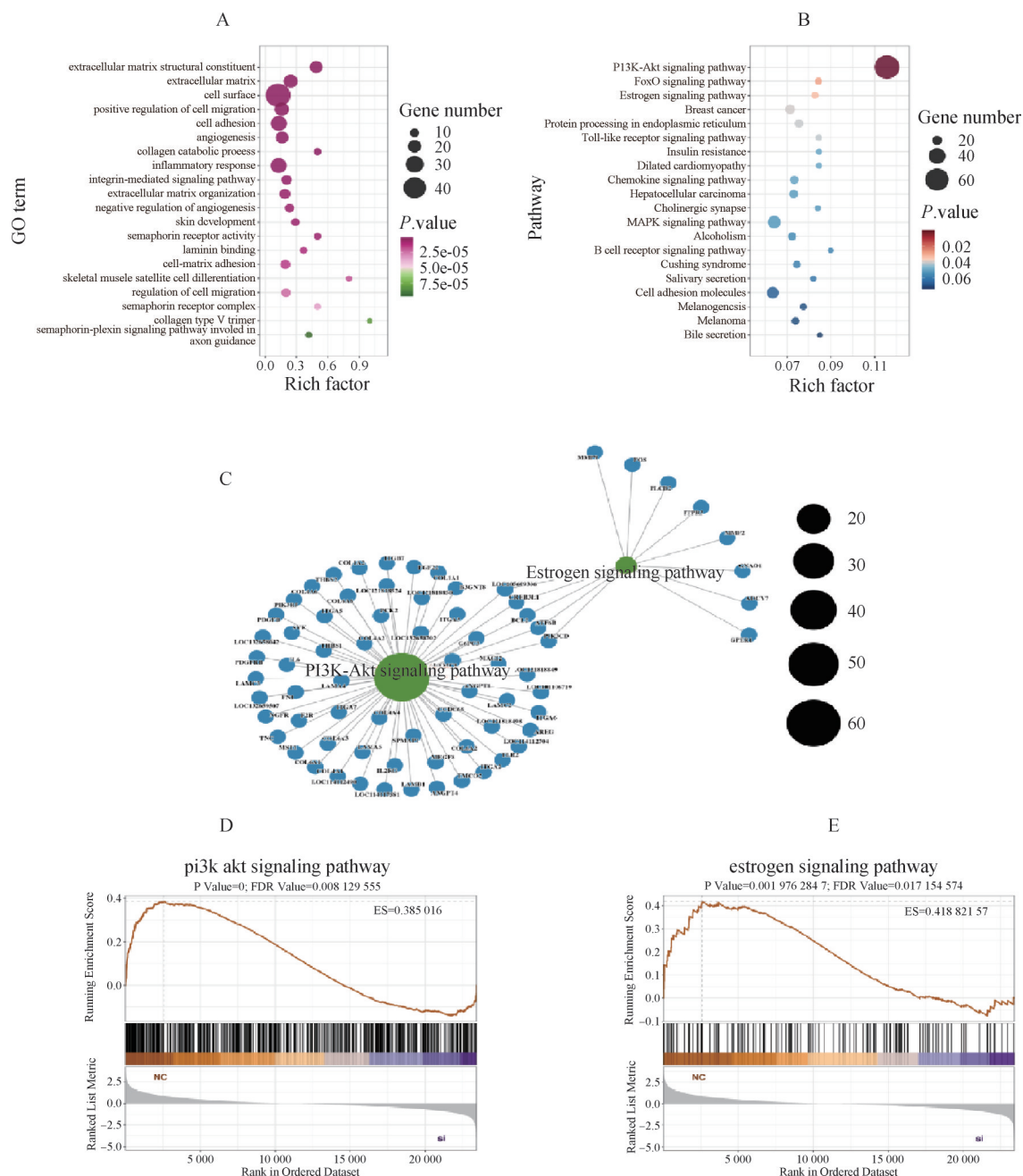
图3 转录组质控与分析

Fig. 3 Transcriptome quality control and analysis

的凋亡。检测了PI3K-Akt信号通路下游抗凋亡基因 *BCL2* 的表达水平,结果显示 *BCL2* 的 mRNA 表达量 ($P < 0.01$) 和蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$)。此外,检测了凋亡相关基因的表达量,结果显示 *BAX/BCL2*、*Caspase3* 的 mRNA 和蛋白表达量均显著上调 ($P < 0.05$) (图 5G、H、I)。

值得注意的是,敲低 AR 后导致雌激素信号通路的核心富集基因显著下调,因此猜测,敲低 AR 可能影响雌激素的分泌及相关基因的表达来调控卵巢颗粒细胞的发育,因此通过 ELISA 法检测了对照

组和敲低组的雌激素 E2 分泌水平。结果显示,敲低 AR 后卵巢颗粒细胞的雌激素分泌量显著降低 ($P < 0.05$) (图 5C)。为了进一步寻找 AR 影响雌激素分泌的具体分子机制,检测了雌激素合成关键酶 CYP19A1、雌激素受体 ESR2 的表达量变化。敲低 AR 后 ESR2、CYP19A1 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$) (图 5D、E、F)。这表明,敲低 AR 可能会通过影响雌激素合成酶的表达来影响雌激素的分泌。



A. 差异基因 GO 富集分析; B. 差异基因 KEGG 富集分析; C. KEGG 富集通路网络图; D、E. KEGG 通路 GSEA 富集分析

A. Differential genes GO enrichment analysis; B. Differential genes KEGG enrichment analysis; C. KEGG enrichment pathways network diagram; D, E. GSEA enrichment analysis of KEGG pathways

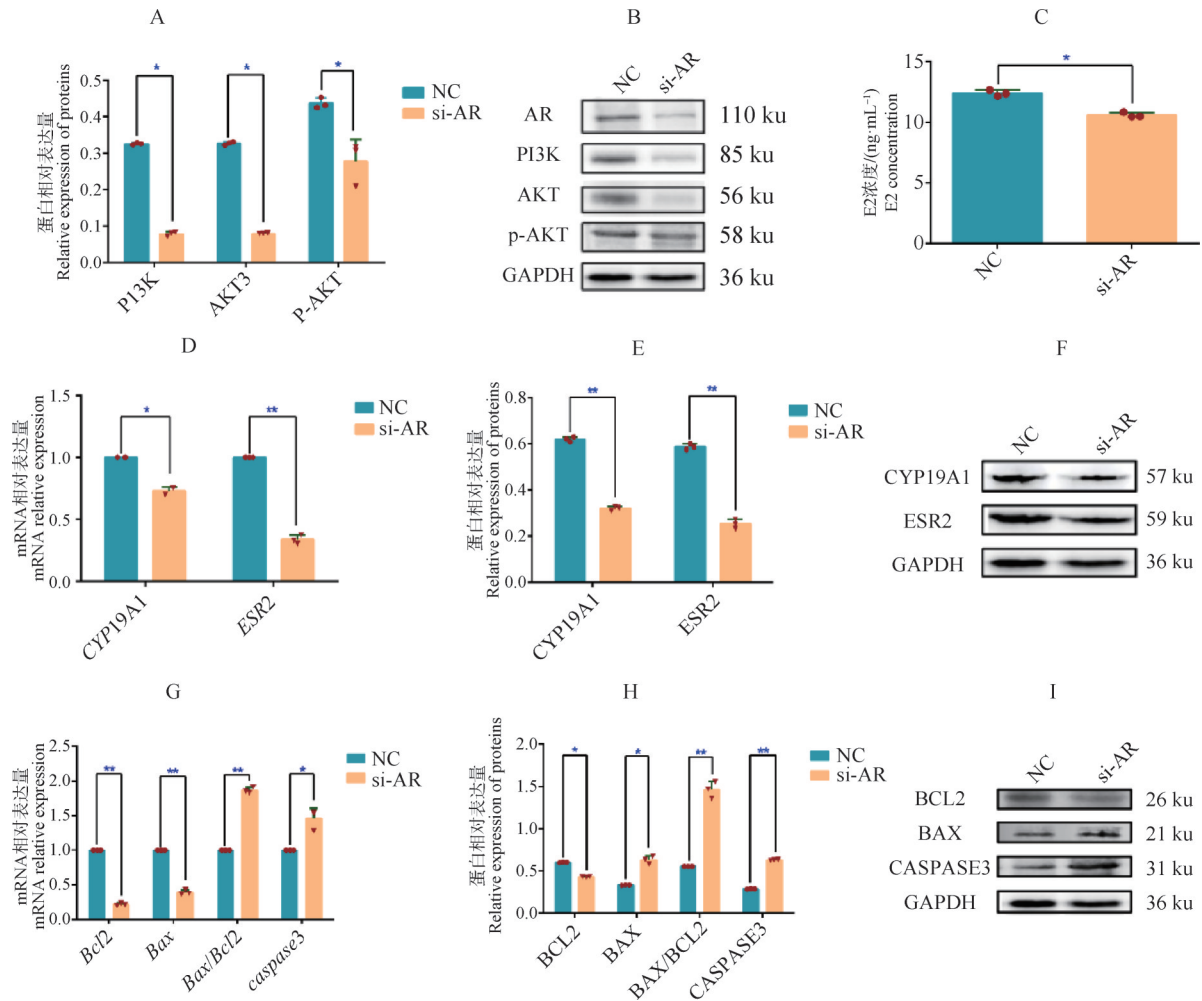
图 4 转录组富集分析

Fig. 4 Transcriptome enrichment analysis

这些结果表明, 敲低 AR 可能会通过影响 PI3K-AKT 信号通路和雌激素信号通路来介导卵巢颗粒细胞的凋亡和雌激素分泌, 从而影响卵巢颗粒细胞的发育。

3 讨论

绵羊卵巢是一个动态的分泌器官, 以卵泡为基本功能单位调控着复杂的生殖过程^[17]。在卵泡中



A、B. PI3K、AKT、p-AKT 的蛋白表达量变化; C. GC 分泌雌激素变化; D. 雌激素相关基因 mRNA 表达量变化; E、F. 雌激素相关基因蛋白表达量变化; G. 凋亡相关基因的 mRNA 表达量变化; H、I. 凋亡相关基因的蛋白表达量变化。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

A, B. Changes in protein expression levels of PI3K, AKT, and p-AKT; C. Alterations in estrogen secretion by granulosa cells; D. Changes in mRNA expression levels of estrogen-related genes; E & F. Changes in proteins expression levels of estrogen-related genes; G. Changes in mRNA expression levels of apoptosis-related genes; H & I. Changes in proteins expression levels of apoptosis-related genes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

图5 转录组差异基因验证

Fig. 5 Transcriptome differential genes validation

颗粒细胞围绕着卵母细胞,通过分泌类固醇,调节卵母细胞的生长和成熟,为卵泡发育提供基础^[4]。类固醇前体,经过 StAR、CYP11A1、HSD3 β 、CYP17A1 转化为雄激素,而雄激素通过与 AR 结合发挥作用,早期研究发现,AR 在大多数哺乳动物卵巢中表达,包括人类、大鼠^[18]、小鼠^[19]、猪^[20]、牛^[21]、绵羊^[22]等,且随着卵泡发育,AR 表达量逐渐降低^[23]。而雄激素在颗粒细胞中可由 CYP19A1 催化转化为雌二醇(E2),E2 可与雌激素受体 ESR2 结合,激活并调控靶基因表达和卵泡发育过程^[24-25]。

随着卵泡的发育,雄激素浓度逐渐降低,而 CYP19A1 活性增强,以此来积累更多 E2^[26]。据研究,CYP19A1 在大多数动物卵巢颗粒细胞中表达,是 E2 生成的关键酶,敲低猪卵巢颗粒细胞 CYP19A1 后,E2 分泌显著下降,而过表达 CYP19A1 后,E2 分泌显著上调。在本研究中,敲低 AR 后,雌激素 E2 分泌量显著降低,可能是因为关键酶 CYP19A1 的表达下调导致。另外有研究表明,低浓度 DHT 作用于绵羊颗粒细胞,可促进 CYP19A1 和 ESR2 的表达,而添加 AR 抑制剂

Flutamide 后,可阻断该过程,下调 *CYP19A1* 和 *ESR2* 的表达^[11]。且与之对应的研究发现,*ESR2* 敲除小鼠,E2 生成减少,抑制卵泡的发育^[27]。这与本研究一致,沉默绵羊卵巢颗粒细胞 *AR* 后,雌激素信号通路的核心富集基因显著下调,而雌激素合成关键酶 *CYP19A1*、雌激素受体 *ESR2* 的表达均显著下调,因此颗粒细胞分泌 E2 量显著降低。猜测 *AR* 可能是通过雌激素信号通路来调控颗粒细胞的发育过程。

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号通路是调节细胞增殖、凋亡、代谢和其他生理过程的关键通路^[28]。最近的研究证实,PI3K/Akt 信号通路参与了卵泡发育过程中卵巢功能的恢复和颗粒细胞的生长凋亡过程^[6],在人和小鼠的卵泡发育过程和颗粒细胞凋亡中,PI3K/Akt 信号通路起到了关键调控作用^[29]。本研究中,敲低 *AR* 后 PI3K-AKT 信号通路核心基因集显著下调,猜测敲低 *AR* 可能影响了颗粒细胞中的该信号通路。经研究,在小鼠输精管上皮细胞中,*AR* 可与 PI3K 的 p85 α 直接相互作用,激活 PI3K/Akt 通路,磷酸化 Akt,抑制上皮细胞凋亡^[30]。本研究敲低颗粒细胞 *AR* 后,PI3K、AKT 表达显著降低,p-Akt Ser473 磷酸化水平显著降低,猜测敲低 *AR* 可能通过影响 PI3K-AKT 信号通路来介导卵巢颗粒细胞的发育。

在哺乳动物卵巢中,细胞增殖与凋亡之间的动态平衡对维持颗粒细胞的稳态至关重要^[31]。据研究,FoxO 是 PI3K/Akt 的下游靶标,p-Akt 磷酸化 FoxO,促进细胞增殖、生长和存活^[32],其中 FoxO1 可上调 PI3K/Akt 下游促凋亡基因的表达,并通过 caspase 家族激活线粒体通路从而诱导 GC 凋亡^[33]。Caspase 家族可以决定颗粒细胞是否发生凋亡^[5],Caspase3 可通过线粒体通路和死亡受体通路,控制颗粒细胞凋亡^[34]。本研究敲低颗粒细胞 *AR* 后,抑制 PI3K-AKT 信号通路,促进 *Caspase3* 的 mRNA 和蛋白表达,它的活化标志着颗粒细胞发生凋亡。细胞凋亡进程由 *Bcl* 和 *caspase* 家族共同执行和调控,*Bcl* 家族中的 *BCL2* 和 *BAX* 是标志性的促进和抑制细胞增殖的蛋白,可通过改变线粒体膜通透性和线粒体功能调节细胞生命活动^[35]。其中 *BCL2* 是典型的抗凋亡基因,是 PI3K-AKT 信号通路下游的关键蛋白,而 *BAX* 是促凋亡基因,*BAX/BCL2* 可决定细胞是否会凋亡^[36, 37]。沉默前列腺癌细胞中 *AR* 的表达,显著上调 *BAX/BCL2*,提高机体抗癌能力^[38]。

我们的研究也发现,敲低颗粒细胞 *AR* 后,显著下调 PI3K-AKT 信号通路的下游关键基因 *BCL2* 的表达,同时 *BAX* 表达上调,*BAX/BCL2* 上调,促进颗粒细胞凋亡。所以猜测敲低 *AR* 可能通过影响 PI3K-AKT 信号通路来介导卵巢颗粒细胞的凋亡进程。

另外有研究发现,在卵巢癌中雌激素通过 GPER 以非基因组方式上调 PI3K 通路,导致肿瘤抑制基因失活^[23]。与之类似的是,E2 可通过抑制 PI3K 和 AKT 磷酸化来抑制 PI3K/Akt 信号通路,阻止成纤维细胞活化^[39]。在本研究中,敲低绵羊卵巢颗粒细胞 *AR* 后,分泌 E2 显著降低,猜测也可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,加速细胞凋亡,抑制颗粒细胞的发育。

4 结 论

本研究发现敲低 *AR* 后,p-Akt Ser473 磷酸化水平显著降低,*BAX/BCL2*、*Caspase3* 表达上调,抑制细胞增殖;*CYP19A1*、*ESR2* 表达下调,雌激素 E2 分泌水平降低。猜想 *AR* 可能通过 PI3K/Akt 信号通路和雌激素信号通路的双重机制来调控绵羊卵巢颗粒细胞的功能,本研究为探究 *AR* 对绵羊繁殖的影响提供了初步理论基础。

参考文献(References):

- [1] YANG R, WANG Y, YUE S, et al. Identification of novel 58-5p and SREBF1 interaction and effects on apoptosis of ovine ovarian granulosa cell[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(2): 576.
- [2] SABRY R, GALLO F J, ROONEY C, et al. Genetic and epigenetic profiles of polycystic ovarian syndrome and in vitro bisphenol exposure in a human granulosa cell model[J]. *Biomedicine*, 2024, 12(1): 237.
- [3] SANTOS G C, CANDIDO K C, SILVAA D C F, et al. Granulosa cells and follicular development: a brief review[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2023, 69(6): e20230175.
- [4] SPICER J L, MAYLEM S R E, SCHUTZ F L. Granulosa cell function in domestic animals: a review on the in vitro effects of FSH, insulin and insulin-like growth factor 1[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2025, 91: 106919.
- [5] SELENE C L D G, LOURDES M. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death.

- Focus on caspase-12 [J]. *Apoptosis*, 2016, 21 (7) : 763-777.
- [6] YAN G, SHAN L, PING F, et al. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1):121.
- [7] JINBI Z, YINXUE X, HONGLIN L, et al. MicroRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17(1):9.
- [8] DIDIER D, GEOFFROY R, MAELISS P, et al. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(6):709-724.
- [9] OLGA A, NMB M, RS H. Physiological and pathological androgen actions in the ovary [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(5):1166-1174.
- [10] BOSDOU K J, VENETIS C A, ANAGNOSTIS P, et al. Association of basal serum androgen concentration with follicles number on the day of triggering final oocyte maturation in low responders according to the bologna criteria: A prospective cohort study [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(4):1656.
- [11] HONGWEI D, WENBO G, SHANSHAN Y, et al. Dihydrotestosterone regulates oestrogen secretion, oestrogen receptor expression, and apoptosis in granulosa cells during antral follicle development [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 207:105819.
- [12] KALYANARAMAN H, CHINA P S, CASTEEL E D, et al. Crosstalk between androgen receptor and protein kinase G signaling in bone: implications for osteoporosis therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2025, 46(3):279-294.
- [13] CHENG B, WU J, CHEN K, et al. Association of 5 α -reductase inhibitor prescription with immunotherapy efficacy in metastatic renal cell carcinoma: a multicenter retrospective analysis [J]. *J Immunother Cancer*, 2025, 13(2):e011154.
- [14] NEDELJKOVIĆ M, VULETIĆ A, MARTINOVIĆ K. Divide and conquer-targeted therapy for triple-negative breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(4):1396.
- [15] WEIL S J, VENDOLA K, ZHOU J, et al. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(7):2479-2485.
- [16] WALTERS K A, HANDELSMAN D J. Role of androgens in the ovary [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017 (4):36-47.
- [17] SONG Y, HAI E, ZHANG N, et al. Oocyte transcriptomes and follicular fluid proteomics of ovine atretic follicles reveal the underlying mechanisms of oocyte degeneration [J]. *BMC Genomics*, 2025, 26(1):97.
- [18] CHEN D, YU Q, SHENG S, et al. Transcriptomic analysis of the effects exerted by curcumin on dihydrotestosterone-induced ovarian granulosa cells [J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16:1522269.
- [19] LU H, JIANG H, LI C, et al. Dissecting the impact of maternal androgen exposure on developmental programming through targeting the androgen receptor [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(36):e2309429.
- [20] COSTERMANS N G J, KEIJER J, VAN SCHOTHORST E M, et al. In ovaries with high or low variation in follicle size, granulosa cells of antral follicles exhibit distinct size-related processes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2019, 25(10):614-624.
- [21] AZUMAH R, LIU M, HUMMITZSCH K, et al. Candidate genes for polycystic ovary syndrome are regulated by TGF β in the bovine foetal ovary [J]. *Hum Reprod*, 2022, 37(6):1244-1254.
- [22] DUAN H, GE W, YANG S, et al. Dihydrotestosterone regulates oestrogen secretion, oestrogen receptor expression, and apoptosis in granulosa cells during antral follicle development [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 207(1):105819.
- [23] ZHENG M, ANDERSEN C Y, RASMUSSEN F R, et al. Expression of genes and enzymes involved in ovarian steroidogenesis in relation to human follicular development [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:1268248.
- [24] PALERMO R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(3):326-337.
- [25] SIMPSON E R, CLYNE C, RUBIN G, et al. Aromatase—a brief overview [J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64(1):93-127.
- [26] TETSUKA M, NANCARROW C D. The levels of 5 α -dihydrotestosterone in follicular fluid in healthy and atretic ovine follicles [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2007, 33(3):347-357.
- [27] COUSE J F, BUNCH D O, LINDZEY J, et al.

- Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor- α knockout mouse[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12):5855-5865.
- [28] CHENG J, HUANG Y, ZHANG X, et al. TRIM21 and PHLDA3 negatively regulate the crosstalk between the PI3K/AKT pathway and PPP metabolism [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1880.
- [29] JOHN G B, SHIDLER M J, BESMER P, et al. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation[J]. *Dev Biol*, 2009, 331(2):292-299.
- [30] BARON S, MANIN M, BEAUDOIN C, et al. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH Kinase in androgen-sensitive epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15):14579-14586.
- [31] WANG C L, FAN Y C, TSENG C H, et al. Salmonella enteritidis infection slows steroidogenesis and impedes cell growth in hen granulosa cells [J]. *Avian Dis*, 2014, 58(4):511-517.
- [32] ZHANG X, TANG N, HADDEN T J, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(11):1978-1986.
- [33] GONG Y, LUO S, FAN P, et al. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1):121.
- [34] YANG D, JIANG T, LIN P, et al. Knock-down of apoptosis inducing factor gene protects endoplasmic reticulum stress-mediated goat granulosa cell apoptosis [J]. *Theriogenology*, 2017, 88:89-97.
- [35] TANG Z R, ZHANG R, LIAN Z X, et al. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease[J]. *Cells*, 2019, 8(10):1123.
- [36] CHENG H M, GONZÁLEZ R G. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis[J]. *Metabolism*, 1986, 35(4):10-14.
- [37] SRIVASTAVA S, ANSARI N, BHATNAGAR A, et al. Activation of aldose reductase by nonenzymatic glycosylation[J]. *Prog Clin Biol Res*, 1989, 304:171-184.
- [38] ROUILLIER P, MATTON P, DUFOUR M, et al. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an *in vitro* model to study estradiol production [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 50(2):170-177.
- [39] WANG Z, LI X, LIU X, et al. Mechanistic insights into the anti-fibrotic effects of estrogen via the PI3K-Akt pathway in frozen shoulder[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2025, 249:106701.

(编辑 郭云雁)