网络出版时间:2025-07-18 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.01.013

抗缪勒管激素对绵羊卵泡颗粒细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制研究

张宇[1,2,3],张宁[1,2,3],宋宇琨[1,2,3],王俊兰[1,2,3],张家新[1,2,3]

(1 内蒙古农业大学 动物科学学院,内蒙古 呼和浩特 010018;2 内蒙古自治区羊遗传育种与繁殖重点实验室,内蒙古 呼和浩特 010018;3 农业农村部肉羊遗传育种重点实验室,内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘 要] 【目的】研究抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)对绵羊有腔卵泡颗粒细胞生长的影响,并探究其作用机制。【方法】收集绵羊不同直径(<3 mm、3~5 mm、>5 mm)有腔卵泡卵泡液与颗粒细胞,利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测颗粒细胞 *AMH* 及其Ⅱ型受体(*AMHR*Ⅱ)mRNA 表达水平,用 ELISA 法检测颗粒细胞和卵泡液中 AMH 蛋白质量浓度;将绵羊有腔卵泡颗粒细胞用含有不同质量浓度 AMH(0(对照组),0.5,5 和 50 ng/mL)的培养基培养 48 h,利用 CCK-8 法检测细胞增殖水平,用流式细胞仪检测培养细胞凋亡率,用 RT-qPCR 检测凋亡相关基因(*Caspase* 3、*BCL*-2、*BAX*)和增殖相关基因(*PCNA*)mRNA 表达水平。用流式细胞仪检测 AMH 对颗粒细胞内 SMAD1/5/8、磷酸化 SMAD1/5/8(P-SMAD1/5/8)、CREB、磷酸化 CREB(P-CREB)蛋白表达水平的影响。通过 EdU 细胞增殖试验,检测 SMAD1/5/8 抑制剂 LDN193189 和 CREB 抑制剂 666-15 对颗粒细胞增殖水平的影响。【结果】随着卵泡直径的增大,颗粒细胞内 AMH 转录水平及蛋白质表达量均显著下降($P<0.05$),*AMHR*Ⅱ mRNA 在直径 3~5 mm 的中腔卵泡颗粒细胞中表达量显著高于小卵泡(直径<3 mm)及大卵泡(直径>5 mm)颗粒细胞($P<0.05$);随着卵泡直径的增大,卵泡液中 AMH 蛋白质量浓度显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,5 和 50 ng/mL AMH 显著抑制了颗粒细胞增殖($P<0.05$),*PCNA* mRNA 相对表达量显著降低。与对照组相比,5 和 50 ng/mL AMH 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),*BCL*-2 mRNA 相对表达水平显著下降($P<0.05$),而 *Caspase* 3、*BAX* mRNA 相对表达水平显著上升($P<0.05$)。经 5 ng/mL AMH 培养的颗粒细胞,SMAD1/5/8 与 CREB 总蛋白水平与对照组无显著差异($P>0.05$),但 P-SMAD1/5/8 蛋白水平显著高于对照组($P<0.05$),P-CREB 蛋白水平显著低于对照组($P<0.05$)。LDN193189 处理显著促进了颗粒细胞内 *PCNA* 表达($P<0.05$),而 666-15 处理显著抑制了颗粒细胞内 *PCNA* 表达($P<0.05$);EdU 检测结果显示,与 AMH 组相比,LDN193189 处理颗粒细胞增殖水平显著提高($P<0.05$),666-15 处理颗粒细胞增殖水平显著降低($P<0.05$)。【结论】绵羊有腔卵泡颗粒细胞中 AMH 分别通过 SMAD1/5/8、CREB 通路调节颗粒细胞增殖和凋亡,进而在卵泡发育过程中发挥重要作用。

[关键词] 绵羊;抗缪勒管激素;颗粒细胞;有腔卵泡

[中图分类号] S826.13 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)01-0132-08

Effects of anti-Müllerian hormone on proliferation and apoptosis of ovine follicular granular cells and its mechanism

ZHANG Yu[1,2,3],ZHANG Ning[1,2,3],SONG Yukun[1,2,3],
WANG Junlan[1,2,3],ZHANG Jiaxin[1,2,3]

(1 *College of Animal Science,Inner Mongolia Agricultural University,Hohhot,Inner Mongolia* 010018,*China*;2 *Inner Mongolia*

[收稿日期] 2024-09-14 [修回日期] 2024-10-25

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金项目(2023MS03001);国家重点研发计划项目(2021YFD1300901)

[作者简介] 张宇(1998-),女,内蒙古呼和浩特人,在读硕士,主要从事动物繁殖生物学与繁殖技术研究。E-mail:15049193532@163.com

[通信作者] 张家新(1970-),男,内蒙古乌兰察布人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物繁殖生物学与繁殖技术研究。E-mail:zjxcau@163.com

Key Laboratory of Sheep & Goat Genetics Breeding and Reproduction, Hohhot, Inner Mongolia 010018, *China*; 3 *Key Laboratory of Genetics and Breeding of Meat Sheep, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot, Inner Mongolia* 010018, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aimed to investigate the effects of anti-Müllerian hormone (AMH) on the growth of granular cells in ovine follicles and its mechanism. 【Method】 The follicular fluid and granular cells of different diameter (small: <3 mm, medium: 3－5 mm, large: >5 mm) antral follicles of sheep were collected, and the expression of *AMH* and its type Ⅱ receptor (*AMHR* Ⅱ) in granular cells were detected by real-time fluorescence quantification PCR (RT-qPCR). The concentration of AMH protein in granular cells and follicular fluid was detected by ELISA. The ovine follicular granular cells were cultured in medium with different mass concentrations of AMH (0 (control group), 0.5, 5 and 50 ng/mL) for 48 h, and the cell proliferation level was detected by CCK-8 assay. The apoptosis rate of cultured cells was detected by flow cytometry, and the mRNA levels of apoptosis-related genes (*Caspase* 3, *BCL*-2, *BAX*) and proliferation-related genes (*PCNA*) were detected by RT-qPCR. The expression levels of SMAD1/5/8, phosphorylated SMAD1/5/8, CREB and phosphorylated CREB proteins in granular cells were detected by flow cytometry. The effects of SMAD1/5/8 inhibitor LDN193189 and CREB inhibitor 666-15 on granular cell proliferation were examined by EdU cell proliferation assay. 【Result】 *AMH* transcription level and protein expression in granular cells were significantly decreased ($P<0.05$), with the increase of follicle diameter, and *AMHR* Ⅱ mRNA expression in medium antral follicle granular cells of 3－5 mm was significantly higher than that in small follicle (diameter<3 mm) and large follicle (diameter>5 mm) granular cells ($P<0.05$). With the increase of follicle diameter, the concentration of AMH protein in follicular fluid significantly decreased ($P<0.05$). Compared with control group, 5 and 50 ng/mL *AMH* significantly inhibited the proliferation ($P<0.05$) of granular cell, the relative expression level of *PCNA* mRNA was significantly decreased. Compared with the control group, the apoptosis rates in 5 and 50 ng/mL AMH groups were significantly increased ($P<0.05$), the relative expression level of *BCL*-2 mRNA was significantly decreased ($P<0.05$), and the relative expression levels of *Caspase* 3 and *BAX* mRNA were significantly increased ($P<0.05$). For granular cells cultured with 5 ng/mL AMH, the total protein levels of SMAD1/5/8 and CREB had no significant difference compared to the control group ($P>0.05$), but the levels of P-SMAD1/5/8 proteins were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). And the levels of P-CREB were significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). LDN193189 treatment significantly promoted the expression of *PCNA* in granular cells ($P<0.05$), while 666-15 treatment significantly inhibited the expression of *PCNA* in granular cells ($P<0.05$). EdU test results showed that compared with AMH group, LDN193189 treatment significantly increased granular cell proliferation level ($P<0.05$), and 666-15 treatment significantly decreased granular cell proliferation level ($P<0.05$). 【Conclusion】 *AMH* regulates granular cell proliferation and apoptosis of ovine antral follicles through SMAD1/5/8 and CREB pathways, which plays an important role in ovine antral follice development.

Key words: sheep; anti-Müllerian hormone (AMH); granular gells; antral follicle

抗缪勒管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）主要在睾丸支持细胞与卵巢颗粒细胞中特异性表达，对动物生殖具有重要作用。在雌性动物中，AMH 由非闭锁性发育的卵泡颗粒细胞分泌[1]，以自分泌的方式发挥调控作用，并且在特定阶段以不同的方式影响卵泡的生长和存活[2]。DURLINGER 等[3]研究发现，AMH 敲除小鼠卵巢中有更多的生长卵泡，这与 AMH 可直接或间接地阻止卵巢中原始卵泡进入生长卵泡池有关。AMH 作为卵泡发育的关键调节因子，可以防止早期卵泡闭锁和腔前卵泡储备的消耗[4]。AMH 也被广泛报道可作为评价生育能力的指标，并与有腔卵泡数量密切相关[5]。同时，AMH 可作为不孕症、多囊卵巢综合征、原发性卵巢缺血等生殖疾病诊断和预后的指标[6-7]。

细胞凋亡是调控动物卵泡闭锁的途径之一。有研究报道，AMH 与 AMH Ⅱ型受体（AMHRⅡ）结

合后又与其Ⅰ型受体 ALK2/3/6 结合,从而激活 SMAD1/5/8,调控卵泡闭锁[8]、基因表达[9]以及下游 Wnt 通路[10]。有研究发现,AMH 通过抑制卵泡颗粒细胞环磷腺苷效应结合原件结合蛋白(cAMP-response element binding protein,CREB)磷酸化,而下调干细胞因子(stem cell factor,SCF)基因的转录[11],并减弱促卵泡生成素(follicle stimulating hormone,FSH)反应性[12],从而调控卵泡发育。LI 等[13]研究发现,CREB 蛋白沉默后胶质瘤细胞分化受到抑制,这可能与磷酸化 CREB(P-CREB)未被激活有关,但其具体的作用机制有待进一步研究。目前,人们对于 AMH 在有腔卵泡发育过程中的作用机制还知之甚少,研究 AMH 对绵羊有腔卵泡颗粒细胞生长的影响及其作用机制,有助于全面阐明 AMH 在动物卵泡发育过程中的调控作用。本研究检测了绵羊有腔卵泡卵泡液及颗粒细胞中 *AMH* 及 *AMHR* Ⅱ基因表达情况,分析了 AMH 对颗粒细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制,旨在为阐明 AMH 对绵羊卵泡发育的调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料 根据本实验室之前的样品处理方法[14],将从屠宰场采集的绵羊卵巢置于含青链霉素的无菌生理盐水中,用保温瓶(温度 30～37 ℃)于 2～3 h 内送回实验室,进行后续试验。

1.1.2 主要试剂 RNeasy kit 样品总 RNA 提取试剂盒 TransZol Up(ET111-01-V2),TRANS 产品;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Cat. No. RR047A)、SYBR® Premix Ex *Taq*™ (Cat. No. RR820A),Takara 产品;TransDetect® Cell Counting Kit 试剂盒(FC101-02)、TransDetect® Annexin V-FITC/PI Cell Apoptosis Detection Kit 试剂盒(FA101-01),北京全式金产品;AMH (1737-MS),美国 R&D Systerm 产品;细胞内固定与透化缓冲液套件(88-8824-00),Thermo Fisher Science 产品;SMAD1/5/9 抗体(货号:AF0614),Affinity Biosciences 产品;Phospho-SMAD1/5/9 抗体(P-SMAD1/5/9 抗体,货号为:＃13820)、CREB 抗体(货号:＃9197)、Phospho-CREB 抗体(P-CREB 抗体,货号:＃9198),美国 Cell Signaling Technology 产品;兔源同型对照多克隆抗体(AB172730),Abcam 产品;兔源同型单克隆抗体(30000-0-AP)、CoraLite488-conjugated 山羊抗兔荧光二抗(SA00013-6),Proteintech 产品;ALK2/3 抑制剂 LDN193189,Adooq 产品;P-CREB 抑制剂 666-15,美国 MCE 产品;通用抗体稀释液(SL1410),酷来博产品。

1.1.3 主要仪器设备 流式细胞仪(CytoFLEX),BECKMAN 产品;微量紫外分光光度仪(Nanodrop 2000),Thermo Scienticfic 产品;PCR 扩增仪(Veriti™ 96-Well Thermal Cycler),Applied Biosystems 产品;酶标仪(HIGHL AND PARK),Bio-Tek 产品;Milli-Q Biocel 超纯水系统(Mill-0 Biocel),Millipore 产品。

1.2 试验方法

1.2.1 卵泡液、颗粒细胞的收集 在无菌超净台中剪掉卵巢系膜,使用预热生理盐水清洗干净,用 10 mL 的注射器抽取卵巢表面不同直径(＜3 mm、3～5 mm、＞5 mm)有腔卵泡内容物,1 500 r/min 离心 5 min,收集卵泡液置于－80 ℃冰箱中保存备用;细胞沉淀加入洗卵液涡旋 15 min,于体视显微镜下弃去裸卵,收集颗粒细胞悬液于离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,取细胞沉淀置于－80 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 颗粒细胞的培养 利用注射器抽取直径 3～5 mm 有腔卵泡内容物,涡旋 15 min,于体视显微镜下弃去裸卵,使用基础培养基(DMEM F12＋体积分数 15% FBS＋体积分数 1% PS)将颗粒细胞接种于 25 cm^2 培养瓶,37 ℃培养 24 h 后,换为含有不同质量浓度 AMH(0(对照组,CK),0.5,5 和 50 ng/mL)的培养基培养 72 h,用于相关指标检测。

1.2.3 颗粒细胞 *AMH* 和 *AMHR* Ⅱ基因及凋亡和增殖相关基因表达量的检测 以 *β-actin* 作为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 法(RT-qPCR)对颗粒细胞 *AMH* 和 *AMHR* Ⅱ基因及不同质量浓度 AMH 处理颗粒细胞凋亡相关基因(*BAX*、*BCL*-2、*Caspase* 3)、增殖相关基因(*PCNA*)的表达量进行检测。RT-qPCR 试验引物购自上海生工,序列见表 1。

收集不同质量浓度 AMH 培养 48 h 的卵泡颗粒细胞,使用 RNeasy kit 样品总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,按照 PrimenScript™ RT Master Mix Kit 试剂盒操作说明进行反转录合成 cDNA。RT-qPCR 反应体系为 10 μL:SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ 5 μL,cDNA 1 μL,上下游引物各 0.5 μL,ddH_2O 3 μL。使用 SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ 试剂盒进行 PCR 扩增反应,反应条件为 95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据

进行分析。

表 1　RT-qPCR 试验引物序列

Table 1　Sequence of primers for RT-qPCR

基因名称 Gene name	参考序列登录号 Reference sequence entry number	引物序列(5′→3′) Primer sequence(5′→3′)
BAX	NC_000019.10	F:AGCGAGTGTCTGAAGCG,R:CCAGTTGAAGTTGCCGT
BCL-2	NC_056076.1	F:ATGACTTCTCTCGGCGCTAC,R:CTCCACACACATGACCCCTC
β-actin	NC_040262.1	F:GTCATCACCATCGGCAATGA,R:CGTGAATGCCGCAGGATT
Caspase 3	NC_056079.1	F:TAGCAAGTTTCTTCAGAGGG,R:GTCTCAATACCACAGTCCAG
PCNA	NC_056066.1	F:GTAGCCGTGTCATTGCGACTCC,R:GCTCTGTAGGTTCACGCCACTTG
AMH	NC_056058.1	F:CTATGAGCAGGCCTTCCTGG,R:CCTCCAGGTGCAGGACCACC
AMHR Ⅱ	NC_056056.1	F:AGCTGTGCTTCTCCCAGGTCATA,R:AAAGCGGACAATGTGGTCATGCTG

1.2.4　颗粒细胞和卵泡液中 AMH 蛋白质量浓度的检测　在含有 AMH 抗体的 96 孔预包被板中加入对应标准品 50 μL，加入待测样品 50 μL。除空白孔外，每孔依次加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体(HRP 标记抗体)50 μL，混匀后在 37 ℃温育 60 min。弃去孔内液体，用洗涤液洗涤 3 次，拍干备用。向每孔中加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μL，振荡混匀后，再次置于 37 ℃恒温环境中避光显色 15 min。然后每孔加入终止液 50 μL 终止反应。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度。吸光度值与待测样品中绵羊 AMH 浓度正相关，拟合标准品曲线，用于计算样品中 AMH 蛋白质量浓度。

1.2.5　AMH 对颗粒细胞增殖的影响　采用 CCK-8 法检测不同质量浓度 AMH 培养的颗粒细胞增殖情况。采用 CCK-8 法测定不同处理组颗粒细胞活性，将 CCK8 加入颗粒细胞(10 μL/孔)，之后将细胞在 37 ℃下避光孵育 1 h，取出后立即使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度，根据吸光度计算每组细胞增殖率，绘制增殖曲线。

1.2.6　AMH 对颗粒细胞凋亡的影响　将待检测细胞从培养箱取出，用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化后，将细胞悬液转入 15 mL EP 管内，按照细胞凋亡检测试剂盒说明书，加入 500 μL 结合缓冲液、5 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI，轻轻混匀，室温避光(锡箔纸)孵育 15 min，使用流式细胞仪进行检测，统计不同处理组细胞凋亡率。

1.2.7　AMH 作用机制检测　1)AMH 对颗粒细胞 SMAD1/5/8、CREB 及其磷酸化蛋白表达的影响。根据 LAL 等[15]，SHI 等[16]的方法，利用流式细胞仪检测颗粒细胞表面 SMAD1/5/8、CREB 及其磷酸化蛋白(P-SMAD1/5/8、P-CREB)的表达情况。在室温条件下将 0(CK)和 5 ng/mL AMH 培养的颗粒细胞洗涤后用固定液固定 30 min，用通透化缓冲液将细胞通透 15 min，用封闭液封闭 30 min 后，在室温下分别将细胞与 SMAD1/5/9(检测 SMAD1/5/8 蛋白)、P-SMAD1/5/9(检测 P-SMAD1/5/8 蛋白)、CREB、P-CREB 一抗抗体与同型抗体在通透化缓冲液中孵育 60 min，使用洗涤液将细胞中非特异性抗体洗涤后，与 CoraLite® Plus488-山羊抗兔二抗抗体(H+L)孵育 30 min。最后，使用 CytoFLEX 流式细胞仪进行流式细胞分析。结果计算方法：对照组目的蛋白表达量＝对照样品组－同型抗体组；实验组目的蛋白表达量＝实验样品组－同型抗体组。

2)SMAD1/5/8、CREB 通路抑制剂对颗粒细胞增殖及 *PCNA* mRNA 水平的影响。为确定 AMH 对颗粒细胞生长的抑制作用是否分别通过 SMAD1/5/8 和 CREB 通路调控，分别使用 ALK2/3/6(SMAD1/5/8 上游 I 型受体)抑制剂 LDN193189(10 μmol/L)和 CREB 抑制剂 666-15(10 μmol/L)与 AMH(5 ng/mL)联合培养 48 h，试验同时设 0 ng/mL AMH 处理为对照(NC)。使用 EdU 检测颗粒细胞增殖情况：AMH 与抑制剂 LDN193189、666-15 培养颗粒细胞后，使用 EdU 试剂盒检测增殖细胞数量，按照说明书添加 EdU 试剂后放入培养箱孵育 2 h，之后按照说明书进行固定、破膜、染色，洗涤后用荧光显微镜观察拍照，细胞增殖率＝增殖细胞数/总细胞数×100%。同时，采用 RT-qPCR 法检测 *PCNA* mRNA 相对表达量。

1.3　统计与分析

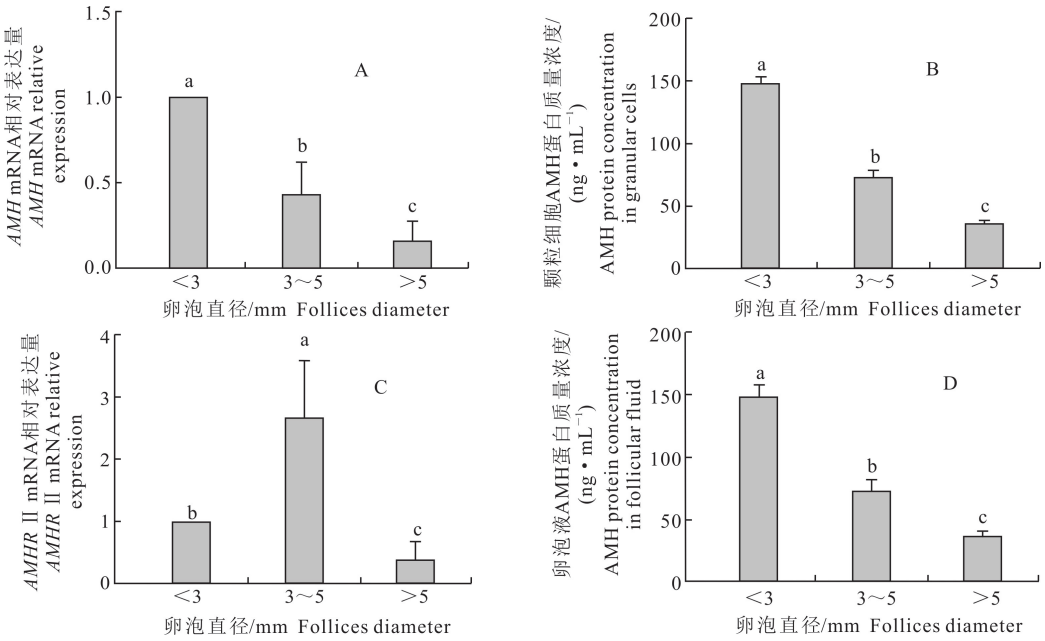
所有试验至少重复 3 次。数据利用 SPSS 统计软件进行差异性分析，所有数据以“平均值±标准差”表示。两组间比较采用 *t* 检验，多组比较采用 ANOVA 检验。

2　结果与分析

2.1　绵羊卵泡中 *AMH* 及 *AMHR* Ⅱ 表达水平

如图 1-A、B 所示，直径＜3 mm 的卵泡颗粒细

胞 *AMH* mRNA 与蛋白表达水平最高,之后随着卵泡的发育,*AMH* mRNA 与蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。如图 1-C 所示,不同直径卵泡颗粒细胞 *AMHR* Ⅱ mRNA 表达量差异显著,表现为直径 3～5 mm 的卵泡颗粒细胞>直径小于 3 mm 的卵泡颗粒细胞>直径大于 5 mm 的卵泡颗粒细胞($P<0.05$)。如图 1-D 所示,不同直径卵泡液中 AMH 质量浓度与颗粒细胞中的变化趋势一致。



图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下图同。

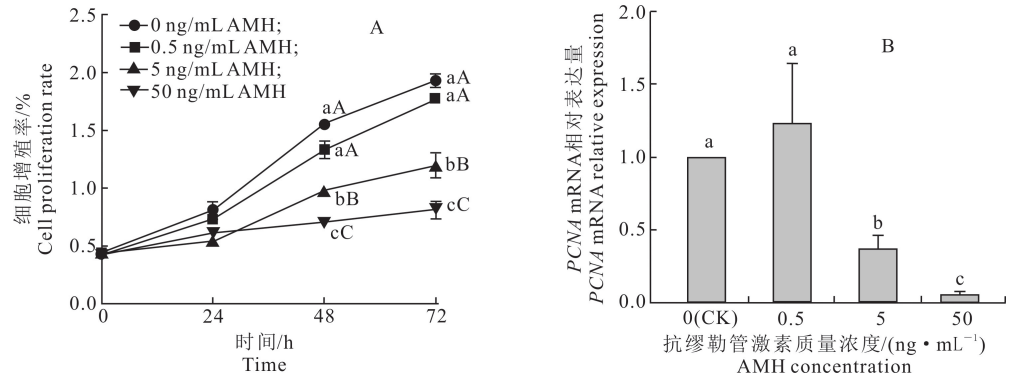
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), while different uppercase letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$). The same below.

图 1 绵羊不同直径卵泡中 AMH 蛋白和 mRNA 及 *AMHR* Ⅱ mRNA 水平

Fig. 1 AMH protein and mRNA and *AMHR* Ⅱ mRNA levels in different diameters follicle in sheep

2.2 AMH 对颗粒细胞增殖及增殖相关基因表达量的影响

由图 2-A 可知,与对照组(0 ng/mL AMH)相比,随着 AMH 质量浓度的增大颗粒细胞活力呈降低趋势;在培养 24 h 时,不同质量浓度 AMH 对颗粒细胞活力的影响差异不显著($P>0.05$),在培养 48 和 72 h 时各试验组颗粒细胞活力明显降低,其中 5 和 50 ng/mL AMH 处理颗粒细胞活力极显著降低($P<0.01$),因此后续试验选择培养时间为 48 h。从图 2-B 可以看出,0.5 ng/mL AMH 组颗粒细胞 *PCNA* mRNA 水平与 CK 组无显著差异($P>0.05$),5 和 50 ng/mL AMH 组显著低于 CK 组($P<0.05$)。



A. 不同处理颗粒细胞增殖曲线;B. 不同处理颗粒细胞中 *PCNA* 基因 mRNA 的相对表达量。

A. Granular cell activity curve in different treatment; B. *PCNA* mRNA relative expression in granular cells in different treatment.

图 2 不同质量浓度 AMH 对颗粒细胞增殖及增殖相关基因 *PCNA* mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of AMH on granular cell viability and proliferation-related gene *PCNA* mRNA expression

2.3　AMH 对颗粒细胞凋亡及凋亡相关基因表达量的影响

如图 3 所示，随着 AMH 质量浓度的增加，颗粒细胞的凋亡率增大，其中 5 和 50 ng/mL AMH 组颗粒细胞凋亡率显著高于 CK 组（$P<0.05$）。

用 0，0.5，5 和 50 ng/mL AMH 培养颗粒细胞 48 h，对颗粒细胞凋亡标志基因 *Caspase* 3、*BAX*、*BCL*-2 mRNA 水平进行检测。结果（图 4）表明，5 和 50 ng/mL AMH 显著提高了颗粒细胞 *Caspase* 3、*BAX* mRNA 水平（$P<0.05$），显著降低了 *BCL*-2 mRNA 水平（$P<0.05$）。

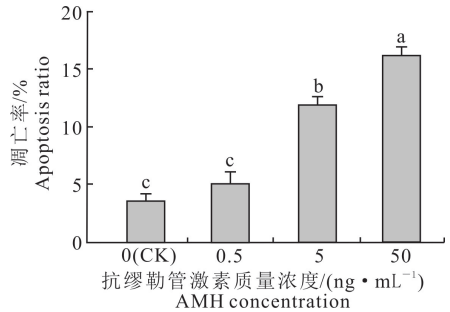


图 3　不同质量浓度 AMH 对颗粒细胞凋亡率的影响

Fig. 3　Effects of different concentrations of AMH on apoptosis rate of granular cells

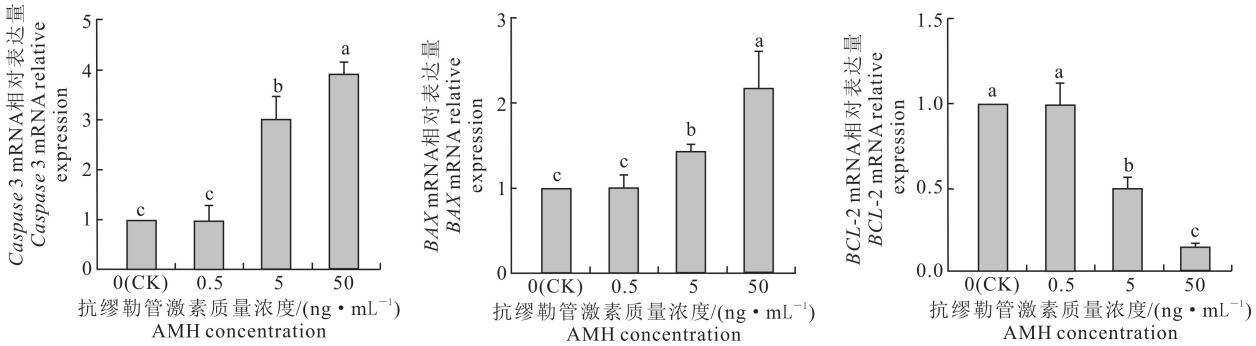


图 4　不同质量浓度 AMH 对颗粒细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig. 4　Effects of AMH mass concentration on apoptosis-related gene expression in granulosa cells

2.4　AMH 作用机制分析

2.4.1　AMH 对颗粒细胞 SMAD1/5/8、CREB 及其磷酸化蛋白表达的影响　通过流式细胞仪对细胞中 SMAD1/5/8 与 P-SMAD1/5/8 进行定量检测，结果如图 5 所示。由图 5 可知，与 CK 组相比，5 ng/mL AMH 对颗粒细胞中的 SMAD1/5/8 蛋白表达量无显著影响（$P>0.05$）；5 ng/mL AMH 显著提高了颗粒细胞中 P-SMAD1/5/8 蛋白表达量（$P<0.05$）。

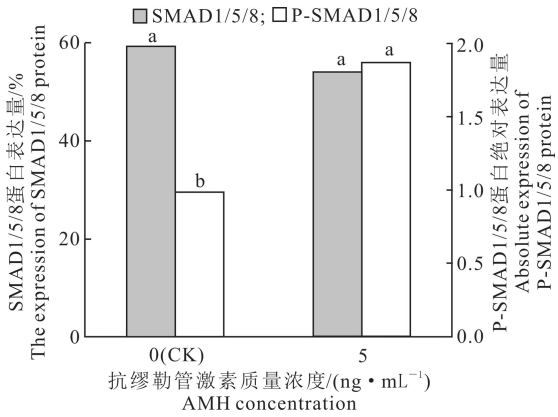


图 5　AMH 体外培养条件下颗粒细胞中 SMAD1/5/8 和 P-SMAD1/5/8 蛋白的表达量

Fig. 5　SMAD1/5/8 protein and P-SMAD1/5/8 protein expression in granular cells cultured with AMH *in vitro*

通过流式细胞仪对细胞中 CREB 与 P-CREB 进行定量检测，结果如图 6 所示。由图 6 可知，与 CK 组相比，5 ng/mL AMH 对颗粒细胞中的 CREB 蛋白表达量无显著影响（$P>0.05$）；5 ng/mL AMH 可显著降低颗粒细胞中 P-CREB 蛋白表达量（$P<0.05$）。

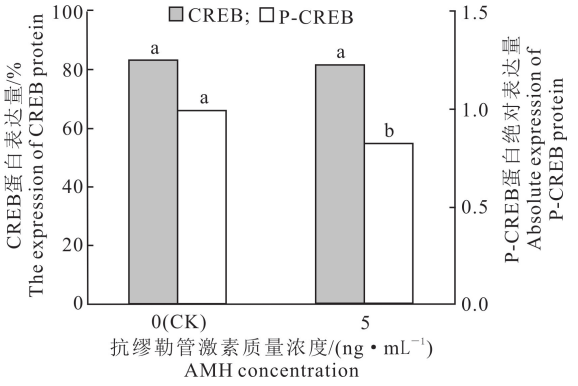
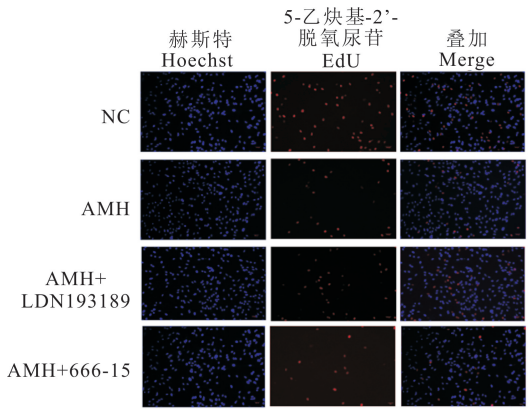


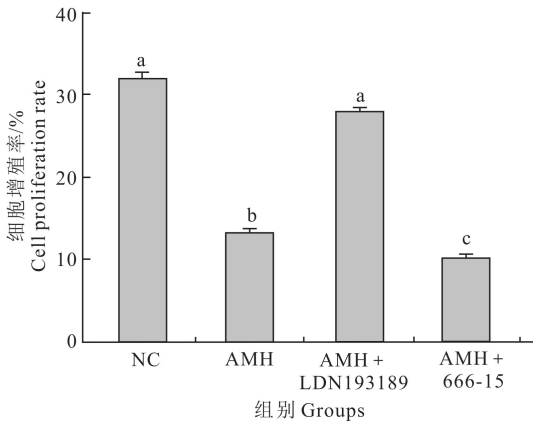
图 6　AMH 体外培养条件下颗粒细胞中 CREB 和 P-CREB 蛋白的表达量

Fig. 6　CREB protein and P-CREB protein expression in granular cells cultured with AMH *in vitro*

2.4.2　SMAD1/5/8、CREB 通路抑制剂对颗粒细胞增殖及 *PCNA* mRNA 表达的影响　如图 7 所示，EdU 检测发现，与 AMH 组相比，AMH +

LDN193189 组 EdU 阳性颗粒细胞显著增加($P<0.05$),AMH+666-15 组 EdU 阳性颗粒细胞显著减少($P<0.05$)。如图 8 所示,与 AMH 组相比,AMH+LDN193189 组颗粒细胞 *PCNA* mRNA 相对表达量显著增加($P<0.05$),AMH+666-15 组颗粒细胞 *PCNA* mRNA 相对表达量显著降低($P<0.05$)。





EdU 阳性细胞为红色;细胞核为蓝色;放大倍数 4×。

EdU positive cells is red; Nucleus is blue; Magnification 4×.

图 7 SMAD1/5/8 抑制剂 LDN193189 和 CREB 抑制剂 666-15 对颗粒细胞增殖的影响

Fig. 7 Effects of SMAD1/5/8 inhibitor LDN193189 and CREB inhibitor 666-15 on granulosa cell proliferation

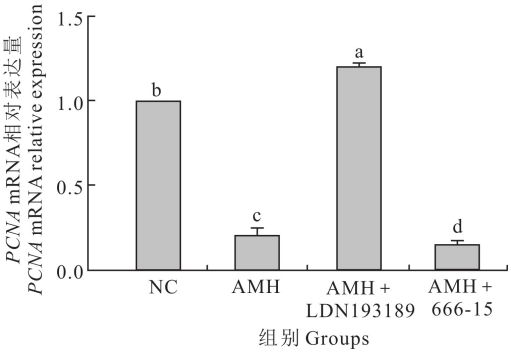


图 8 SMAD1/5/8 抑制剂 LDN193189 和 CREB 抑制剂 666-15 对颗粒细胞中 *PCNA* mRNA 表达的影响

Fig. 8 Effects of SMAD1/5/8 inhibitor LDN193189 and CREB inhibitor 666-15 on granular cell *PCNA* mRNA expression

3 讨 论

在哺乳动物中,卵泡生长与发育受多种因素共同调控,包括类固醇激素、酶以及局部生长因子。其中 AMH 作为颗粒细胞来源的抑制性生长因子在腔前卵泡发育中发挥着重要的作用[3],但是在有腔卵泡发育中的作用研究较少。

作为转化生长因子-β 超家族的关键成员,AMH 在卵泡发育过程中具有至关重要的作用。本研究揭示了 AMH 在绵羊有腔卵泡发育中的表达模式及其对颗粒细胞生长的影响,结果表明 AMH 在绵羊小腔卵泡中高水平表达,这与 EILSØ 等[17]的研究结果一致;另外本研究还发现,AMH 通过下调 *PCNA*、*BCL-2* 的表达量及上调 *BAX*、*Caspase* 3 的表达量而调节颗粒细胞的生长与凋亡过程[18]。在有腔卵泡发育的早期阶段,AMH 的高水平表达可能有助于抑制颗粒细胞的过度增殖与分化[18],并降低卵泡对促卵泡激素的反应性[19],从而有效防止卵泡过早进入选择阶段。本研究结果显示,卵泡发育至直径>5 mm 时,AMH 在颗粒细胞中的表达水平显著降低,这一变化可能与雌二醇分泌持续增加有关[9]。AMH 在绵羊中的表达模式与前人对牛卵巢组织的研究结果[20]相吻合,提示 AMH 在卵泡选择过程中发挥着重要作用。在本研究中,*AMHR* Ⅱ mRNA 在直径为 3~5 mm 的绵羊卵泡颗粒细胞中的表达量最大,这与前人对牛卵泡的研究结果[21]不一致,其原因可能与物种差异有关,不同物种卵泡发育存在不同的调控模式。

外源 AMH 可以显著促进绵羊颗粒细胞中 P-SMAD1/5/8 蛋白的表达,并伴随 *PCNA* mRNA 水平的下调,这表明 AMH 可能通过激活 SMAD1/5/8 信号通路影响颗粒细胞的增殖。另外,联合使用 ALK2/3/6 的抑制剂 LDN193189[22]与 AMH,促进了 *PCNA* mRNA 表达,这一发现与 DILAVER 等[9]的研究结果相似,表明 AMH 通过与Ⅰ型和Ⅱ型受体结合,激活 SMAD1/5/8 途径,从而在有腔卵泡发育中发挥调控作用。本研究还深入探讨了 CREB 在 AMH 调控绵羊卵泡发育中的作用,结果显示,AMH 可显著抑制 P-CREB 蛋白的表达,并下

调 *PCNA* mRNA 水平及细胞增殖率。这一发现与前人的研究结果[23-24]一致，表明 CREB 作为关键的转录因子，其磷酸化状态对多种靶基因的转录具有直接调控作用。联合使用 AMH 与 CREB 抑制剂 666-15[24]可显著增强 AMH 对颗粒细胞中 P-CREB 表达的抑制作用，同时也进一步降低了 *PCNA* mRNA 水平和细胞增殖率。SOMERS 等[25]的研究也表明，卵巢颗粒细胞的数量会随着 CREB 表达的下降而减少。

本研究初步表明 AMH 通过促进 SMAD1/5/8 通路激活和抑制 CREB 的磷酸化，间接下调 PCNA 转录活性，从而调控颗粒细胞增殖，这为了解绵羊有腔卵泡发育中 AMH 生理功能及调控信号机制提供了新的试验证据，但其详细的调控机制仍需深入研究。

4　结　论

在绵羊有腔卵泡发育过程中，AMH 表达降低且 AMHRⅡ在中腔卵泡（直径 3～5 mm）颗粒细胞表达最高；在绵羊颗粒细胞中，AMH 通过促进 SMAD1/5/8 磷酸化与抑制 CREB 磷酸化影响 *PCNA* 表达和细胞增殖。

[参考文献]

[1] CHANG H M, KLAUSEN C, LEUNG P C K. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells[J]. Fertility and Sterility, 2013, 100(2): 585-592. e1.

[2] XU J, BISHOP C V, LAWSON M S, et al. Anti-Müllerian hormone promotes pre-antral follicle growth, but inhibits antral follicle maturation and dominant follicle selection in Primates [J]. Human Reproduction, 2016, 31(7): 1522-1530.

[3] DURLINGER A L L, GRUIJTERS M J G, KRAMER P, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary[J]. Endocrinology, 2002, 143(3): 1076-1084.

[4] MONNIAUX D, DROUILHET L, RICO C, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals[J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2012, 25(1): 1-16.

[5] IRELAND J J, SMITH G W, SCHEETZ D, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle [J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2011, 23(1): 1-14.

[6] FALLAT M E, SIOW Y, MARRA M, et al. Müllerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis[J]. Fertility and Sterility, 1997, 67(5): 962-965.

[7] PIGNY P, MERLEN E, ROBERT Y, et al. Elevated serum level of anti-Mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003, 88(12): 5957-5962.

[8] SEIFER D B, MERHI Z. Is AMH a regulator of follicular atresia? [J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2014, 31(11): 1403-1407.

[9] DILAVER N, PELLATT L, JAMESON E, et al. The regulation and signalling of anti-Müllerian hormone in human granulosa cells: relevance to polycystic ovary syndrome[J]. Human Reproduction, 2019, 34(12): 2467-2479.

[10] CATE R L. Anti-Müllerian hormone signal transduction involved in Müllerian duct regression[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 905324.

[11] 胡蓉. 抗苗勒氏管激素对干细胞因子负调控分子机制的研究[D]. 郑州：郑州大学，2014.
HU R. Study on the molecular mechanism of negative regulation of anti-Müllerian hormone on stem cell factor[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014.

[12] KANAKKAPARAMBIL R, SINGH R, LI D F, et al. B-vitamin and homocysteine status determines ovarian response to gonadotropin treatment in sheep[J]. Biology of Reproduction, 2009, 80(4): 743-752.

[13] LI Y, YIN W, WANG X, et al. Cholera toxin induces malignant glioma cell differentiation via the PKA/CREB pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(33): 13438-13443.

[14] 王兆琛. AREG 对绵羊卵丘细胞葡萄糖代谢及卵母细胞体外成熟影响的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2020.
WANG Z C. Effects of AREG on glucose metabolism of sheep cumulus cells and oocyte maturation *in vitro*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.

[15] LAL R, RITCHIE J, RICHMOND L, et al. Detecting endogenous TRIB2 protein expression by flow cytometry and Western blotting[J]. Methods in Enzymology, 2022, 667: 59-77.

[16] SHI X S, FAN W, MEHRPOUYAN M, et al. Flow cytometry analysis of protein expression using antibody-derived tags followed by CITE-Seq[J]. Cytometry Part A, 2024, 105(1): 62-73.

[17] EILSØ NIELSEN M, RASMUSSEN I A, FUKUDA M, et al. Concentrations of anti-Müllerian hormone in fluid from small human antral follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells[J]. Molecular Human Reproduction, 2010, 16(9): 637-643.

（下转第 147 页）

southern Italy[J]. Pathogens，2022，11(11)：1254.

[24] SILVA M L，CAIAFFA M G，DA COSTA A L M，et al. Canine distemper virus and canine adenovirus type 1 co-infection in a free-living hoary fox (*Lycalopex vetulus*) from Brazil [J]. Brazilian Journal of Microbiology，2023，54(1)：587-595.

[25] BALBONI A，TERRUSI A，URBANI L，et al. Canine circovirus and canine adenovirus type 1 and 2 in dogs with parvoviral enteritis[J]. Veterinary Research Communications，2022，46(1)：223-232.

[26] ZHU Y Z，XU J F，LIAN S Z，et al. Difference analysis between canine adenovirus types 1 and 2[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology，2022，12：854876.

[27] BALBONI A，TRYLAND M，MØRK T，et al. Unique genetic features of canine adenovirus type 1 (CAdV-1) infecting red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway and Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard[J]. Veterinary Research Communications，2019，43(2)：67-76.

[28] CANUTI M，FRY K，DEAN CLUFF H，et al. Co-circulation of five species of dog parvoviruses and canine adenovirus type 1 among gray wolves (*Canis lupus*) in northern Canada[J]. Transboundary and Emerging Diseases，2022，69(5)：e1417-e1433.

[29] 温书坤，周爱军，崔言顺. PCR 检测犬传染性肝炎病毒方法的建立[J]. 山东畜牧兽医，2007，28(5)：1-2.
WEN S K，ZHOU A J，CUI Y S. Establishment of PCR method for detecting canine infectious hepatitis virus[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine，2007，28(5)：1-2.

[30] 曹丙蕾，凌宗帅，邱洪凯. LAMP 快速检测犬传染性肝炎方法的建立及应用[J]. 中国动物检疫，2014，31(8)：73-76.
CAO B L，LING Z S，QIU H K. Establishment and application of LAMP for the rapid detection of infectious canine hepatitis[J]. China Animal Health Inspection，2014，31(8)：73-76.

[31] LI X G，JIN J C，GUO Z Y，et al. Evolution of plasmid-construction[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，209(Pt A)：1319-1326.

[32] 高睿，徐伟，罗艳，等. 4 种致牛腹泻病毒多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2023，51(10)：20-28.
GAO R，XU W，LUO Y，et al. Establishment and application of multiple fluorescent quantitative PCR for detection of 4 bovine diarrhea viruses[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2023，51(10)：20-28.

[33] KIYOKAWA K，YAMAMOTO S，MORIGUCHI K，et al. Construction of versatile yeast plasmid vectors transferable by Agrobacterium-mediated transformation and their application to bread-making yeast strains[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2023，136(2)：142-151.

(责任编辑：马秋明)

(上接第 139 页)

[18] DURLINGER A L，GRUIJTERS M J，KRAMER P，et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary[J]. Endocrinology，2001，142(11)：4891-4899.

[19] VISSER J A，THEMMEN A P N. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity[J]. Molecular and Cellular Endocrinology，2014，382(1)：460-465.

[20] POOLE D H，OCÓN-GROVE O M，JOHNSON A L. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type Ⅱ expression and AMH activity in bovine granulosa cells[J]. Theriogenology，2016，86(5)：1353-1360.

[21] UMER S，SAMMAD A，ZOU H Y，et al. Regulation of AMH AMHR-II and BMPs (2，6) genes of bovine granulosa cells treated with exogenous FSH and their association with protein hormones[J]. Genes，2019，10(12)：1038.

[22] DANG T T H，YUN J W. BMP10 positively regulates myogenic differentiation in C2C12 myoblasts via the SMAD1/5/8 signaling pathway[J]. Molecular and Cellular Biochemistry，2021，476(5)：2085-2097.

[23] FU Y X，WANG F M，OU-YANG X E，et al. Anti-Müllerian hormone regulates stem cell factor via cAMP/PKA signaling pathway in human granulosa cells by inhibiting the phosphorylation of CREB[J]. Reproductive Sciences，2020，27(1)：325-333.

[24] 张超思. PKA-CREB 介导食欲素 A 调节绵羊卵巢黄体化颗粒细胞分泌孕酮的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2019.
ZHANG C S. PKA-CREB mediates orexin A to regulate progesterone secretion from ovine luteinized granulosa cells[D]. Hohhot：Inner Mongolia Agricultural University，2019.

[25] SOMERS J P，DELOIA J A，ZELEZNIK A J. Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely affects the survival，but not the differentiation，of rat granulosa cells [J]. Molecular Endocrinology，1999，13(8)：1364-1372.

(责任编辑：马秋明)