

白藜芦醇对过氧化氢诱导小鼠睾丸间质细胞氧化损伤与凋亡的作用及分子机制

蒙丽舟, 张晓春, 陈指龙, 谷 婷, 袁安文, 杨 青*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128)

摘 要: 试验旨在研究白藜芦醇 (RES) 对过氧化氢 (H_2O_2) 诱导小鼠睾丸间质细胞 TM3 氧化损伤和凋亡的作用及其分子机制。采用 $150\ \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 TM3 细胞 8 h 诱导氧化损伤与凋亡, 以 $5\ \mu\text{mol/L}$ RES 干预 24 h, 采用比色法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH)、细胞中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及丙二醛 (MDA); 通过 DCF-DA 探针法检测活性氧 (ROS) 的产生; 通过流式细胞术分析细胞凋亡, 并利用 ELISA 检测孕酮含量; 进一步通过 real-time PCR 检测基质金属蛋白酶 (MMP)-2/9 mRNA 的表达, 并利用明胶酶谱和 ELISA 检测细胞上清中 MMP-2/9 的水平; 最后通过 Western blot 检测 SIRT1/AMPK 通路部分自噬分子的表达。结果显示: 在 H_2O_2 诱导的 TM3 细胞中, RES 下调其 LDH、MDA 及 ROS 水平, 显著提高 GSH-Px 活性, 减少细胞凋亡, 并促进睾酮的分泌; 同时 RES 显著下调 MMP-2/9 mRNA 的表达及其酶原与活性形式; 此外, RES 通过激活 AMPK 的磷酸化及沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 表达, 促进自噬标志物 LC3-I 向 LC3-II 的转化, 且 SIRT1 和 AMPK 抑制剂均可逆转此效应。综合以上, RES 通过 SIRT1/AMPK 通路调控自噬并抑制 MMP-2/9 活性, 缓解 H_2O_2 诱导的 TM3 细胞氧化损伤与凋亡。

关键词: 白藜芦醇; 小鼠睾丸间质细胞; 氧化损伤; 凋亡; 自噬

中图分类号: S814

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250301-05

氧化损伤是多种疾病发生发展的基础性病理过程, 机体受外界刺激时会产生大量过氧化氢 (H_2O_2)、超级氧离子和羟基自由基等活性氧 (ROS), 过量 ROS 可诱发细胞氧化损伤^[1]。睾丸间质细胞是生精小管间质的主要细胞类型, 负责雄性睾酮合成; 睾丸组织对氧化应激高度敏感, 氧化损伤易导致睾丸间质细胞功能异常, 从而引发精功能障碍^[2]。

白藜芦醇 (3,5,4- 三羟基反式二苯乙烯, RES) 是一种天然植物防御素, 在葡萄、花生、虎杖、决明子等植物中广泛存在, 具有抗炎、抗癌、心血管保护及抗氧

化活性, 可通过清除 ROS、抑制脂质过氧化或增强自噬发挥其保护作用^[3]。已有研究表明, RES 可通过激活 SIRT1/AMPK 通路促进自噬, 缓解大鼠脑缺血再灌注损伤^[4]和入血管内皮细胞的氧化损伤^[5]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一类锌依赖蛋白酶, 参与细胞外基质的降解和重建, 在调节睾丸组织发育中发挥重要作用^[6]。当 MMPs 过度活化时可介导细胞发生凋亡, 促发炎症反应^[7]。研究证实, RES 可通过抑制 NF- κ B 通路下调 IL-1 β 诱导的兔关节软骨细胞 MMPs 表达, 提示其可能通过调控 MMPs 发挥细胞保护作用^[8]。

TM3 细胞系作为常用的小鼠睾丸间质细胞模型, 因易获取且操作方便, 广泛应用于睾丸功能及激素分泌机制研究。前期研究发现在 H_2O_2 诱导 TM3 细胞氧化损伤后, 用 $5\ \mu\text{mol/L}$ 的 RES 处理可在一定程度上提高细胞活力, 减少 ROS 的产生, 通过沉默调节蛋白 1/ 解偶联蛋白 2 (SIRT1/UPC2) 信号通路缓解细胞的氧化损伤^[9], 但 RES 对 TM3 细胞氧化损伤的治疗作用及其潜在的分子机制尚不完全清楚。本研究检测了 RES 对 H_2O_2 诱导的 TM3 细胞中乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛

收稿日期: 2025-03-01; 修回日期: 2025-03-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31772819); 湖南农业发展投资集团有限责任公司科技项目 (XZKJKY20240702)

作者简介: 蒙丽舟 (2000-), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 主要从事动物繁殖障碍机制研究, E-mail: lizhoumeng@stu.hunau.edu.cn; 并列第一作者: 张晓春 (1992-), 女, 辽宁丹东人, 硕士研究生, E-mail: 987052094@qq.com

* 通信作者: 杨青 (1976-), 女, 湖南汉寿人, 博士, 教授, 主要从事家畜繁殖管理及繁殖疾病研究, E-mail: qingyanghn@hunau.edu.cn

(MDA) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平的影响, 进一步明确其抗氧化损伤作用, 以及对氧化损伤细胞凋亡和睾酮分泌的影响; 并从细胞自噬、MMPs 及 SIRT1/AMPK 通路探讨了 RES 在缓解小鼠睾丸间质细胞氧化损伤中潜在的分子机制, 为 RES 在改善家畜精液品质中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 细胞系与抗体 TM3 细胞购自中国科学院细胞库 (上海); 多克隆抗 SIRT1 抗体 (ab12193)、单克隆抗 AMPK 抗体 (ab207442)、单克隆抗磷酸化 AMPK 抗体 (ab133448)、多克隆抗 LC3 抗体 (ab51520) 及多克隆抗 β -actin 抗体 (ab8227) 购自英国 Abcam 公司。HRP 标记抗兔二抗 (sc-2305) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 细胞培养与处理 TM3 细胞用 DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司) 培养, 添加 10% 胎牛血清 (美国 Gibco Invitrogen 公司) 和 1% 青 - 链霉素溶液 (上海碧云天生物技术有限公司), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱 (3111, 美国赛默飞世尔科技公司) 中常规培养。采用 150 μ mol/L H₂O₂ 处理细胞 8 h 诱导氧化损伤^[9]。部分实验组预先用 20 μ mol/L 自噬抑制剂羟氯喹 (HCQ)、20 μ mol/L SIRT1 抑制剂 EX527 或 20 μ mol/L AMPK 抑制剂 Compound C 预处理 2 h, 随后以 150 μ mol/L H₂O₂ 处理 8 h, 再以 5 μ mol/L RES (美国 Sigma-Aldrich 公司) 或 0.1% 二甲亚砜 (DMSO) 干预 24 h。处理后收集细胞或上清进行后续检测。

1.3 MDA、GSH-Px 及 LDH 检测 将收集的细胞离心, 用 PBS 进行重悬, 并用超声波细胞粉碎机进行破碎获得细胞悬液, 根据试剂盒说明书检测 MDA 和 GSH-Px, 同时采用 BCA 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 测定细胞样品中的蛋白浓度, 最后计算细胞中每毫克蛋白中 MDA 和 GSH-Px 含量。同时, 待细胞处理

结束后收集上清, 1 000 r/min 离心 10 min, 根据 LDH 试剂盒的说明书进行检测, 最后计算细胞上清中 LDH 活力。所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 ROS 检测 待细胞处理结束后, 采用 DCFH-DA 探针法检测 ROS 的水平, 按试剂盒说明书进行: 去掉培养液, 加入含 10 μ mol/L DCFH-DA 探针的培养基, 37℃ 孵育 40 min, 随后胰酶消化细胞并离心, 用 PBS 洗涤 1 次, 离心收集细胞沉淀, 用 PBS 重悬细胞, 调整细胞密度后为 6 $\times$ 10⁵ 个 /mL, 在荧光显微镜下观察细胞, 并使用荧光酶标仪检测荧光信号。

1.5 细胞凋亡检测 收集胰酶消化后的细胞, 4℃, 1 000 r/min 离心 5 min, 加入 500 μ L Binding buffer 重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀后再加入 5 μ L 碘化丙啶, 轻轻混匀后, 在室温、避光条件下反应 10 min, 随后用流式细胞仪进行检测分析。

1.6 孕酮检测 采用竞争性 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司) 检测细胞培养上清中的睾酮、MMP-2 及 MMP-9 水平, 具体按试剂盒说明书进行。

1.7 RT-qPCR 使用 TransZol Up Plus RNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 提取细胞总 RNA, NanoDrop2000 核酸分析仪 (NP2000, 美国赛默飞世尔科技公司) 测定浓度与纯度。取 500 ng RNA 经 DNase 处理后, 采用 Vazyme HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行反转录。采用 Vazyme ChamQ[™] SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒, 用荧光定量 PCR 仪 (271001835, 美国 Applied Biosystems 公司) 进行扩增, 反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 随后 40 个循环 (95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s)。基因表达量以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算, 以 β -actin 为内参进行校正。所用引物参考 NCBI 提供的相关序列, 应用 Primer 5.0 软件进行设计引物, 由华大基因合成, 具体序列见表 1。

1.8 明胶酶谱 收集细胞培养液离心后, 采用 BCA 法

表 1 引物序列

基因	序列号	引物序列 (5'→3')	长度 ,bp	退火温度 ,℃
MMP-2	NM_008610.3	F: CCCCgATGCTGATACTGA	151	60
		R: TGTCcGCCAAATAAACCC		
MMP-9	NM_013599.4	F: AGCCAACTATGACCAGGAT	247	60
		R: TGCCACCAGGAACAGG		
β -actin	NM_007393.5	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171	60
		R: ATGGAGCCACCGATCCACA		

对上清液的蛋白浓度进行定量。取含等量蛋白的上清与 5× 上样缓冲液按 4:1 混合，用 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶（添加 0.1% 明胶）进行电泳；电泳后将凝胶置于漂洗液中漂洗 2 次，每次 30 min，然后置于 Ca²⁺ 孵育液中 37℃ 孵育 24 h，用考马斯亮蓝 R250 染色 2 h，最后用脱色液脱色至蓝色背景下显现清晰的白色条带。

1.9 Western blot 收集处理后的细胞，用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液（北京索莱宝科技有限公司）提取总蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度。将等量的蛋白样品与上样缓冲液混合，加热变性后用 SDS-PAGE 进行电泳，随后转印至 PVDF 膜（美国 Millipore 公司）。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，随后一抗（封闭液稀释）4℃ 孵育过夜；TBST 洗膜后，用 HRP 标记二抗室温孵育 1 h，ECL 化学发光试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）进行显影，在 Bio-Rad ChemiDoc XRS+ 系统（721BR09592，美国 Bio-Rad 公司）进行成像。

1.10 统计分析 试验数据以平均数 ± 标准差表示，均来自 3 次独立重复实验，利用 SPSS17.0 统计分析软件中的单因素方差分析（One-way ANOVA），两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 RES 对 H₂O₂ 诱导的 TM3 细胞中 MDA、LDH 及 GSH-Px 的影响 由表 2 可知，H₂O₂ 处理 TM3 细胞后，显著升高细胞中 MDA 含量及培养液中 LDH 活性，并显著降低 GSH-Px 活性，提示对细胞造成氧化损伤。当用 RES 干预后，可显著下调氧化损伤细胞中的 MDA 和 LDH，显著上调 GSH-Px 活性。

表 2 RES 对 H ₂ O ₂ 诱导的 TM3 细胞中 MDA、LDH 和 GSH-PX 的影响			
指标	对照组	H ₂ O ₂ 处理组	H ₂ O ₂ +RES 处理组
MDA, nmol/mg 蛋白	5.51±0.27 ^b	9.04±0.37 ^a	6.34±0.33 ^b
LDH, U/L	47.95±1.93 ^b	146.15±1.19 ^a	122.05±0.73 ^a
GSH-PX, U/mg 蛋白	52.54±0.27 ^a	27.13±0.51 ^b	44.41±0.33 ^c

注：同列数据肩标含相同字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。下同。

2.2 RES 抑制氧化损伤 TM3 细胞中 ROS 的产生 DCF-DA 探针法检测显示，H₂O₂ 诱导后，TM3 细胞中呈绿色荧光信号的细胞数显著增多（图 1A），且荧光强度也显著升高（图 1B），说明 ROS 的产生显著增加；当用 RES 干预处理后，ROS 水平显著下降。

2.3 RES 抑制氧化损伤 TM3 细胞的凋亡 由图 2 所知，与对照组比较，H₂O₂ 诱导后，TM3 细胞的凋亡率显著增加；当用 RES 处理后，其细胞凋亡率则显著下降。

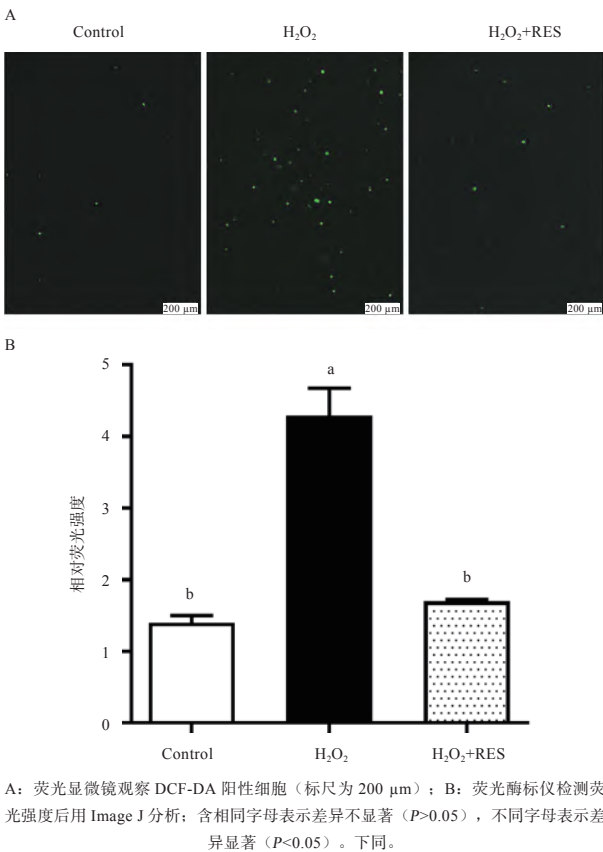
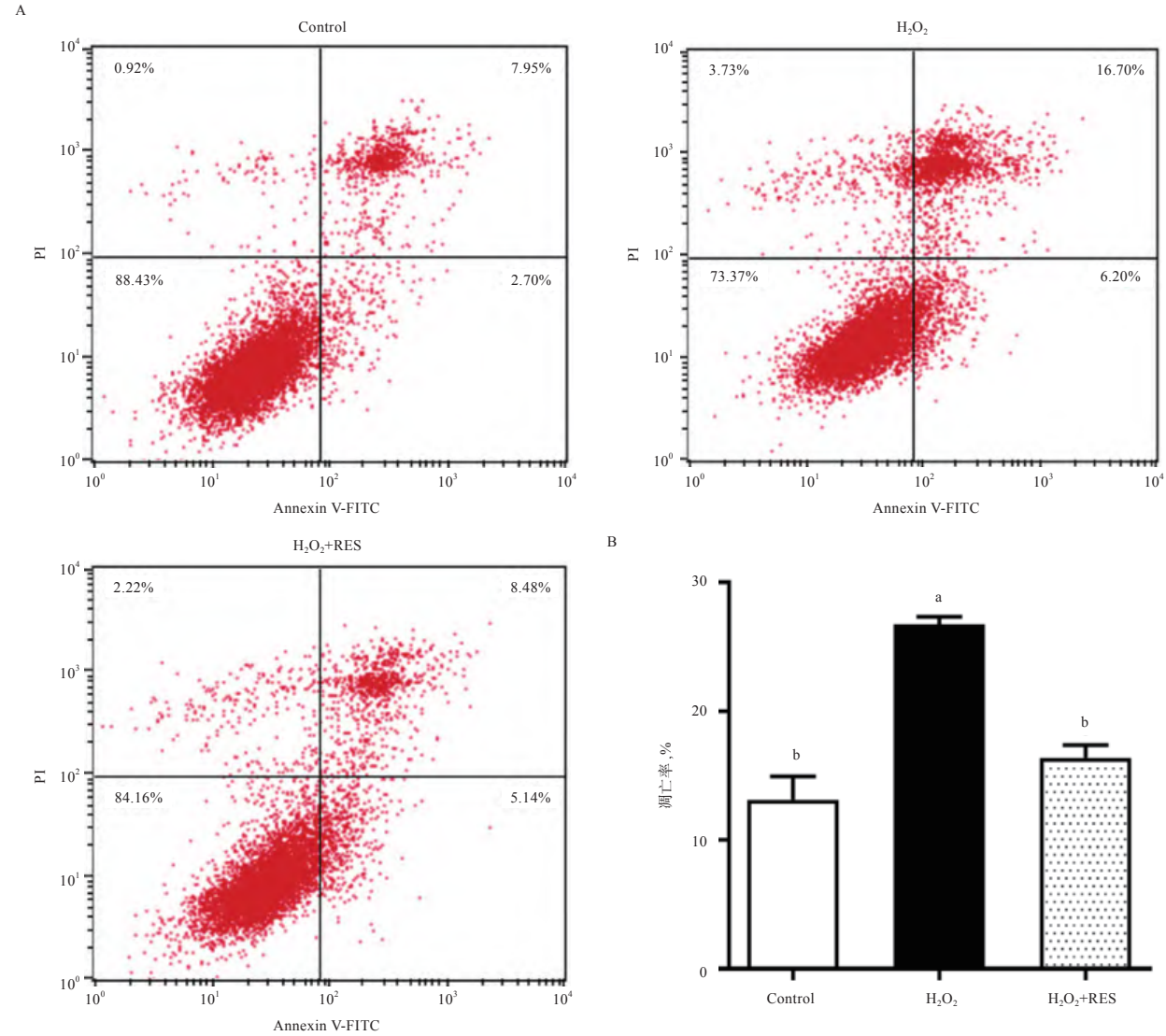


图 1 RES 对氧化损伤 TM3 细胞中 ROS 产生的影响

2.4 RES 促进氧化损伤 TM3 细胞的睾酮分泌 ELISA 检测显示，H₂O₂ 显著下调 TM3 细胞培养液中的睾酮水平，RES 处理可显著上调细胞睾酮的分泌（图 3）。

2.5 RES 下调氧化损伤 TM3 细胞中 MMP-2/9 的水平 Real time PCR 结果显示，H₂O₂ 诱导显著促进 TM3 细胞中 MMP-2/9 mRNA 的表达，当用 RES 处理后，2 种 MMPs 的表达显著下降（图 4A）。明胶酶谱结果显示，在 TM3 细胞中，只检测到 MMP-2/9 的酶原形式，在 H₂O₂ 诱导下，细胞培养液中两者的水平均显著升高，而 RES 处理可抑制 H₂O₂ 的诱导作用（图 4B）。进一步采用 ELISA 检测，同样，H₂O₂ 诱导显著上调细胞培养液中 2 种 MMPs 的活性形式，而 RES 处理后可显著下调 2 种 MMPs（图 4C-D）。

2.6 RES 通过 SIRT1/AMPK 通路调控 TM3 细胞的自噬 Western blot 检测结果表明，RES 处理显著促进氧化损伤 TM3 细胞中 AMPK 的磷酸化及 LC3-I 向 LC3-II



A: 流式细胞术分析细胞凋亡; B: 细胞凋亡的定量分析。
图 2 RES 抑制氧化损伤 TM3 细胞的凋亡

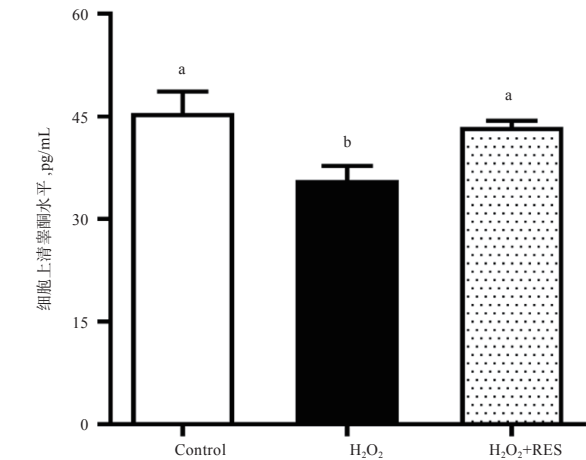


图 3 RES 对氧化损伤 TM3 细胞中睾酮分泌的影响

II 的转化; SIRT1 抑制剂 EX527 可显著下调 RES 的促进作用, 且对 p-AMPK 的下调作用更强 (图 5A-C), 而自噬抑制剂 HCQ 预处理时, 对 RES 诱导的 LC3-I 向 LC3-II 的转化无显著影响 (图 5D 和 E)。此外, AMPK 抑制剂 Compound C 预处理后也显著抑制 RES 诱导的 AMPK 的磷酸化和 LC3-I 向 LC3-II 的转化, 但对 RES 诱导的 SIRT1 的表达无显著影响 (图 5F-I)。

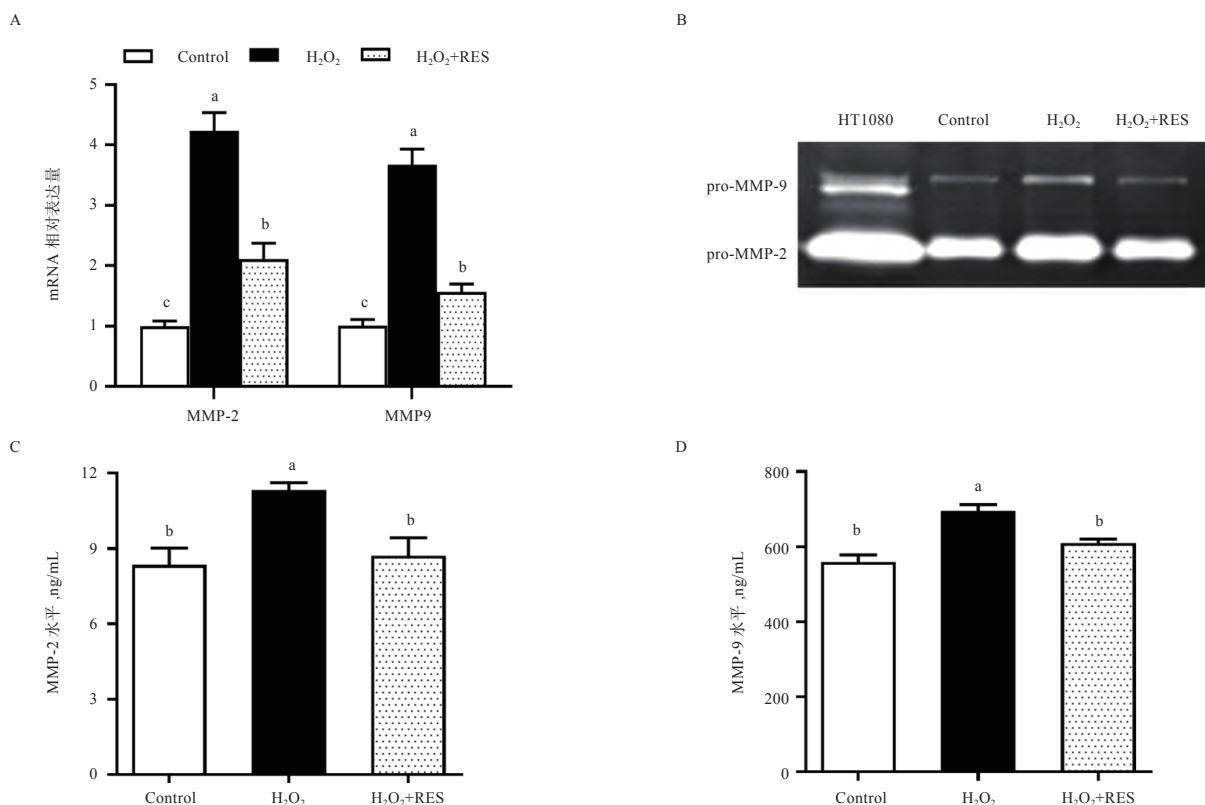
3 讨论

3.1 RES 对氧化损伤睾丸间质细胞的缓解作用 LDH 是一种稳定的细胞质酶, 在细胞发生凋亡、坏死或其他形式的损伤时, 会释放至培养液中, 是细胞膜损伤的重要

指标。此外,多种生化酶活性常被用于评估氧化应激状态,如MDA(脂质过氧化最终产物之一)和抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和抗氧化酶GSH-Px等)。本研究结果表明,RES可有效抑制氧化损伤TM3细胞中LDH释放,降低MDA含量,并增强GSH-Px活性,说明RES通过降低细胞膜的通透性和脂质过氧化程度,发挥其抗氧化能力,保护TM3细胞免受氧化应激损伤。睾酮主要由睾丸间质细胞合成和分泌,对精子发生和其他器官功能的维持发挥着重要作用^[10]。Wang等^[11]研

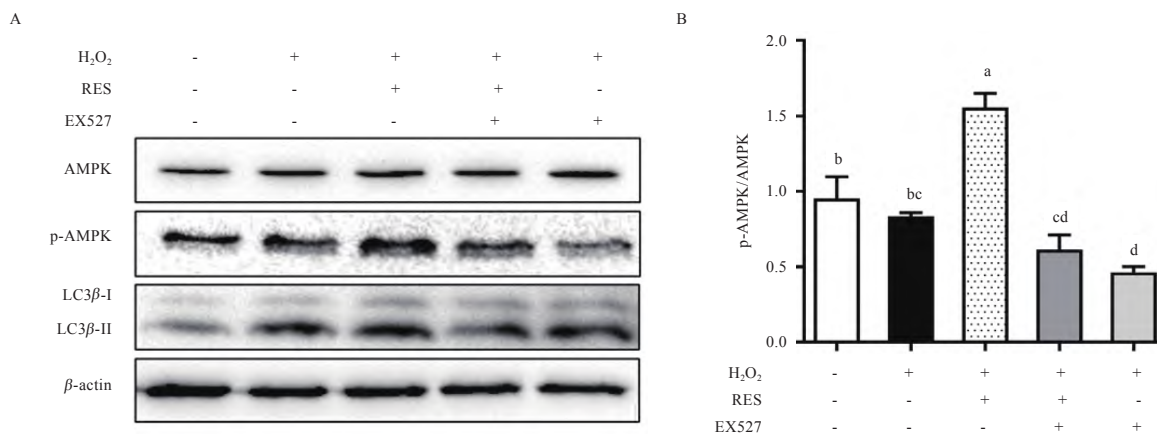
究发现,在氧化应激作用下,小鼠血清中睾酮水平下降,其睾丸组织中类固醇生成酶的表达也显著下降,而补充RES可减轻氧化应激,提高血清中的睾酮水平。而Li等^[12]研究发现,RES可作为3 β -羟基类固醇脱氢酶特异的竞争性抑制剂,潜在干扰大鼠睾丸间质细胞雄激素的生物合成;Svechnikov等^[13]研究也表明RES类似物对睾丸间质细胞类固醇生成有抑制作用。因此,RES对睾丸间质细胞类固醇生成的调控机制还需进一步研究。

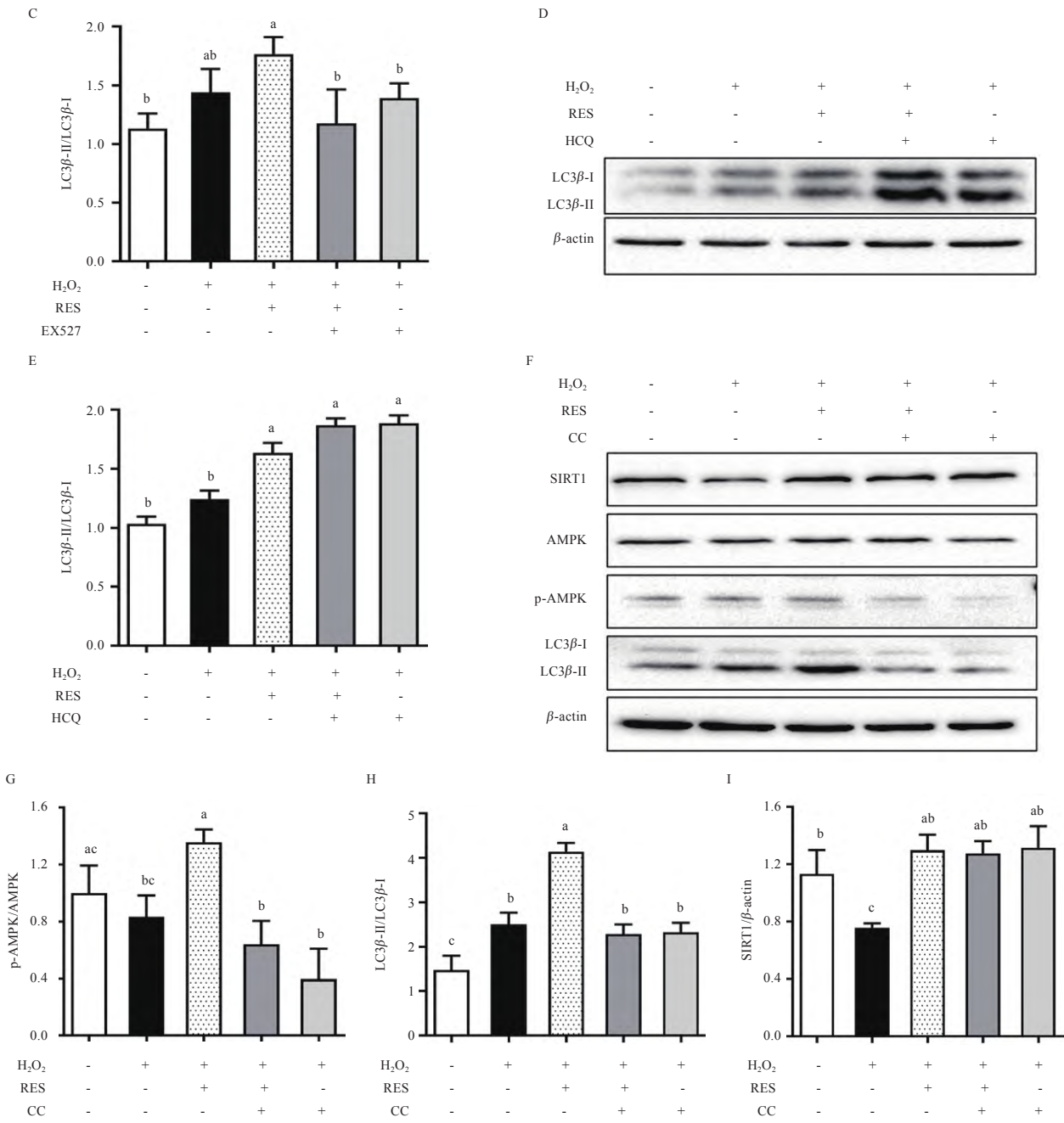
3.2 RES抑制氧化损伤睾丸间质细胞中MMP-2/9活化



A: Real-time qPCR 检测细胞中 MMP-2/9 mRNA 的表达; B: 明胶酶谱法检测细胞培养液中 MMP-2/9 含量; C 和 D: ELISA 法检测细胞培养液中 MMP-2/9 含量。

图 4 RES 对氧化损伤 TM3 细胞中 MMP-2/9 的影响





EX527、HCQ 和 CC 分别为 SIRT1 抑制剂、自噬抑制剂和 AMPK 抑制剂。

图 5 RES 对氧化损伤 TM3 细胞中 SIRT1/AMPK 通路自噬相关蛋白表达的影响

MMPs 是锌依赖性蛋白酶家族，包括胶原酶、明胶酶、基质溶解素、膜型 MMPs 和其他。MMPs 通常以酶原的形式产生，被蛋白酶或其他 MMPs 分解成活性形式，在组织重塑中发挥作用^[14]。成骨细胞中，RES 抑制脂多糖诱导活化的 MMP-2^[15]，在血管平滑肌细胞中，RES 抑制肿瘤坏死因子 α 诱导产生的 MMP-9^[16]。本研究发现，RES 作用氧化损伤的 TM3 细胞后，MMP-2/9

的表达和分泌均被下调，提示 RES 可通过抑制 MMP-2/9 的活化缓解细胞膜损伤，减少 LDH 的释放。MMP-2/9 的抑制可通过减少细胞外基质降解和炎症反应，可能稳定细胞微环境^[17]，从而间接维持激素合成相关膜受体的功能。

3.3 RES 诱导氧化损伤睾丸间质细胞中的自噬 自噬是一种分解代谢机制，可消除有害细胞成分和受损的

细胞器,以应对营养缺乏、病毒感染和毒性应激等多种刺激^[18]。Caliri 等^[1]研究发现,在尼古丁诱导的睾丸间质细胞中,RES 处理通过增强自噬对氧化损伤的细胞具有保护作用。本研究结果显示,H₂O₂ 诱导促进自噬蛋白 LC3-II 的表达,在 RES 的作用下被进一步加强;当自噬抑制剂的预处理后,自噬小体与溶酶体的融合受到抑制,导致自噬体的聚集,使自噬小体膜上的 LC3-II 蛋白相应增加,进而抑制自噬。以上结果提示 RES 可通过诱导自噬改善 TM3 细胞的氧化损伤。研究表明通过 AMP 激活蛋白激酶/SIRT1 (AMPK/SIRT1) 信号通路可调控自噬,且已明确 RES 是 AMPK/SIRT1 信号通路的一种激活剂。Guo 等^[5]研究发现,在氧化低密度脂蛋白诱导的人血管内皮细胞中,RES 通过激活 AMPK/SIRT1 通路上调自噬而保护细胞免受氧化损伤。然而,在氧化损伤的睾丸间质细胞中,RES 是否也可通过 AMPK-SIRT1 通路调节自噬尚不明确。本研究中,在 RES 上调 TM3 细胞中 AMPK 的磷酸化及 SIRT1 蛋白的表达,当用两者抑制剂预处理时,RES 诱导的细胞自噬受到抑制,表明 AMPK-SIRT1 信号在 RES 调控自噬调控中起关键作用。此外,进一步研究了 RES 上调睾丸间质细胞自噬中,SIRT1 和 AMPK 的相互作用,发现下调 SIRT1 时,p-AMPK 的表达受到抑制,但下调 AMPK,SIRT1 的表达无显著变化,这表明 RES 可直接作用于 SIRT1,然后促使 AMPK 磷酸化。SIRT1 通过去乙酰化 AMPK 的上游激酶 LKB1 间接调控 AMPK 活性^[19],因此,其抑制剂对 p-AMPK 的抑制效应更显著。

4 结 论

本试验结果表明,RES 对 H₂O₂ 诱导的 TM3 细胞氧化损伤具有治疗作用,这与维持细胞膜完整性、减少脂质过氧化、促进抗氧化酶活性和减少细胞凋亡有关。RES 通过 SIRT1-AMPK 信号通路调节 MMP-2/9 的活性及上调自噬而发挥其作用。

参考文献:

[1] Caliri A W, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2021, 787: 108365.

[2] Virant-Klun I, Imamovic-Kumalic S, Pinter B. From oxidative stress to male infertility: review of the associations of endocrine-disrupting chemicals (bisphenols, phthalates, and parabens) with human semen quality[J]. *Antioxidants*, 2022,

11(8): 1617.

[3] Liu X, Pei J, Li J, *et al.* Recent advances in resveratrol derivatives: structural modifications and biological activities[J]. *Molecules*, 2025, 30(4): 958.

[4] He Q, Li Z, Wang Y, *et al.* Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 208-215.

[5] Guo H, Chen Y, Liao L, *et al.* Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013, 27(3): 189-198.

[6] Li Y, Chen Y, Wu W, *et al.* MMPs, ADAMs and ADAMTSs are associated with mammalian sperm fate[J]. *Theriogenology*, 2023, 200: 147-154.

[7] Frolova A S, Petushkova A I, Makarov V A, *et al.* Unravelling the network of nuclear matrix metalloproteinases for targeted drug design[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(12): 480.

[8] Kang D D, Lee H I, Lee C I, *et al.* Inhibition of the expression of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes by resveratrol through affecting nuclear factor-kappa B signaling pathway[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(6): 560-567.

[9] 张晓春,陈指龙,方娟,等.白藜芦醇通过沉默调节蛋白 1-解偶联蛋白 2 信号通路降低小鼠睾丸间质细胞 TM3 的氧化损伤[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(7): 2632-2640.

[10] 朱清玉,郭乐薇,刘红羽,等.睾丸间质细胞睾酮合成机制的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(5): 28-33.

[11] Wang P, Lin M, Chen C, *et al.* Autophagy modulation in resveratrol protective effects on steroidogenesis in high-fat diet-fed mice and H2O2-challenged TM3 cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(4): 2973-2983.

[12] Li L, Chen X, Zhu Q, *et al.* Disrupting androgen production of Leydig cells by resveratrol via direct inhibition of human and rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 226(1): 14-19.

[13] Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, *et al.* Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro[J]. *J Appl Toxicol*, 2009, 29(8): 673-680.

[14] Mukherjee A, Das B. The role of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in the progression of osteoarthritis[J]. *Biomater Biosyst*, 2024, 13:100090.

[15] Yu Y, Li X, Mi J, *et al.* Resveratrol suppresses matrix metalloproteinase-2 activation induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via interactions with ampk-activated protein kinase and suppressor of cytokine signaling 1[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2327.

[16] Lee B, Moon S K. Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells[J]. *J Nutr*, 2005, 135(12): 2767-2773.

[17] Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, *et al.* Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating

和田羊 *ESR2* 基因启动子克隆分析及其活性分析

谷若怀, 黄巧艳, 李 伟, 孙慧萍, 朱乐潇, 邢 凤*

(塔里木大学动物科学与技术学院, 农业农村部环塔里木富草资源利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300)

摘要: 雌激素受体 β 基因 (Estrogen Receptor Beta, *ESR2*) 参与了绵羊的卵泡发育, 但其调控机理尚不清楚。本研究以和田羊为试验对象, 以 NCBI 数据库中绵羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列为模板进行克隆测序, 通过在线软件预测 *ESR2* 启动子区转录因子结合位点、CpG 岛和调控元件, 并以 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列为模板构建 6 个连续缺失的荧光素酶载体, 利用双荧光素酶报告基因系统筛选 *ESR2* 核心启动子区。本研究成功克隆了和田羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 的序列, 通过软件预测发现, 和田羊 *ESR2* 基因启动子区存在 4 个潜在的转录起始位点、67 个转录因子结合位点、1 个 TATA-box 以及 2 个 CpG 岛。双荧光素酶活性检测结果表明 *ESR2* 基因启动子区位于 L7 (-527~-156)。本研究结果为进一步探究绵羊 *ESR2* 基因启动子对绵羊卵泡发育的调控提供了新线索。

关键词: *ESR2*; 和田羊; 启动子; 序列分析; 核心启动子

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250328-02

雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER) 是类固醇激素受体超家族的成员之一, 是一种配体依赖性转录因子^[1], 其主要包括雌激素受体 α (Estrogen Receptor alpha, ER- α)、雌激素受体 β (Estrogen Receptor beta, ER- β) 以及近年来新发现的 G 蛋白耦联雌激素受体 (G Protein-Coupled Estrogen Receptor), 由于 ER- α 和 ER- β 的发现时间较早, 其在全球范围内得到了广泛而深入的研究。ER- α 可以和雌激素结合并迁移至细胞内^[2], 对胚胎、乳腺和雌性繁殖周期中卵泡的生长发育都发挥着重要作用^[3-4]。ER- β 由 *ESR2* 基因编码, 其位于绵羊 7 号染色体, 对调控动物繁殖力具有关键作用。已有研

究表明 *ESR2* 基因的表达水平与动物的繁殖性能密切相关, *ESR2* 基因缺失导致大鼠卵泡颗粒细胞对促性腺激素的反应性降低^[5], 雌激素的产生减少^[6]、卵泡成熟受损^[7]、排卵失败^[8]。*ESR2* 基因还参与繁殖性状调控, 如家禽卵巢中 *ESR2* 基因的表达量与产蛋性能之间存在显著的关联性^[9], 同时 *ESR2* 基因还确定是调控猪高产仔数的关键基因之一^[10]。*ESR2* 基因也是绵羊高产的候选基因之一^[11]。

尽管 *ESR2* 基因在调控繁殖力方面的作用已被广泛研究, 但对其启动子区域的研究相对较少。启动子区域位于基因的 5' 端上游, 对基因的转录调控有着关键作用^[12]。本研究以和田羊为研究对象, 基于 NCBI 数据库中绵羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列设计特异性 PCR 引物。通过 PCR 扩增、克隆测序成功获取 *ESR2* 基因启动子序列, 并运用生物信息学软件对其进行系统分析。研究初步解析了和田羊 *ESR2* 基因启动子区的序列特征和结构组成, 并成功鉴定了该基因的核心启动子区域, 为后续探究绵羊 *ESR2* 基因启动子对绵羊卵泡发

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-07-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31660652); “强南”科技创新人才计划 (2022CB001-04); 塔里木大学校长基金 (TDZKC X202401); 塔里木大学研究生科研创新项目 (TDGRI2024040)

作者简介: 谷若怀 (1999-), 男, 黑龙江鹤岗人, 在读硕士研究生, 主要从事动物繁殖育种研究, E-mail: a18346865515@163.com

* 通信作者: 邢凤, 女, 教授, 主要从事动物繁殖育种研究, E-mail: xingfeng2001@126.com

matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 746: 96-105.

[18] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(3): 377-388.

[19] Fathy N, Labib M A, Essam R M, et al. The interplay between

MiR-134/BDNF and LKB1/AMPK/SIRT1 accentuates the antidepressant efficacy of empagliflozin in ovariectomized rats[J/OL]. ACS Chem Neurosci, 2024, DOI: 10.1021/acschem-neuro.4c00313.

(责任编辑: 周会会)