

熊昊,赵月秀,陈大可,等. *Ifitm1* 基因在小鼠卵泡发育与排卵过程中的功能及相关调控机制[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(4): 199-206.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.04.023

Ifitm1 基因在小鼠卵泡发育与排卵过程中的功能及相关调控机制

熊昊, 赵月秀, 陈大可, 陈亚茹, 陈高贵, 李凤娥

华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为深入了解哺乳动物卵泡发育的机制, 对小鼠卵巢颗粒细胞中干扰素诱导的跨膜蛋白1(interferon-induced transmembrane protein 1, *Ifitm1*) 基因进行超表达和抑制表达分析, 通过流式细胞术、荧光定量PCR、EdU 法及 western blot 分析 *Ifitm1* 对小鼠颗粒细胞生长的影响及对小鼠排卵相关基因表达的调控作用, 并用相关通路抑制剂处理颗粒细胞, 探究 *Ifitm1* 影响小鼠卵泡发育及排卵的相关机制。结果显示, 在小鼠卵巢颗粒细胞中成功地超表达和抑制表达了 *Ifitm1* 基因, 干扰 *Ifitm1* 基因表达使细胞周期蛋白 *Ccnd1* 表达降低了 63.5%, G0/G1 期细胞占比也下降, 使细胞阻滞在 G2/M 期, 从而抑制颗粒细胞增殖; 干扰 *Ifitm1* 基因还导致排卵标记基因 *Lhr*、*Ereg*、*Cyp19a1* 表达水平提高了 1.95~6.76 倍 ($P < 0.05$), 并抑制 PI3K/AKT 信号通路上关键蛋白 p-AKT (Ser473) 的表达, 而阻断 PI3K/AKT 信号通路后再抑制 *Ifitm1* 基因表达, *Lhr*、*Ereg* 和 *Cyp19a1* 的 mRNA 水平则未出现明显改变, 说明 *Ifitm1* 基因通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活性影响排卵。以上结果表明, *Ifitm1* 基因通过 PI3K/AKT 通路介导在小鼠颗粒细胞生长以及卵泡排卵过程中发挥重要作用。

关键词 小鼠; *Ifitm1* 基因; 卵泡发育; 排卵; 卵巢颗粒细胞

中图分类号 S852.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)04-0199-08

卵泡发育过程受到如内分泌激素、免疫、代谢信号以及来自颗粒细胞分泌的因子等多种信号分子的调控^[1-2]。原始卵泡启动生长后, 下丘脑-垂体轴释放的卵泡刺激素 (follicular stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 能够促进卵泡的生长成熟以及颗粒细胞的分化^[3], 而 PI3K/AKT 信号通路在控制 FSH 和 LH 介导的卵泡发育过程中起重要的作用。有研究表明, 在小鼠卵巢颗粒细胞 (mouse granulosa cells, mGCs) 中, FSH 能通过 PI3K/AKT 信号通路促进芳香酶、软骨连接蛋白 1 (cartilage link protein 1, *Crtl1*) 和 LH 受体基因表达^[4]。同时, 胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, *IGF1*) 和 *FSH* 基因共同处理能促进牛卵巢颗粒细胞增殖及细胞色素 P450 家族 19 超家族 A 成员 1 (cytochrome p450 family 19 subfamily a member 1, *CYP19A1*) 的 mRNA 表达, 而该过程是通过 *IGF1* 激活 PI3K/AKT 信号通路介导的^[5]。此

外, 对胰腺导管腺癌研究发现, 癌细胞分泌 *Bcl-2* 相关永生基因 3 (Bcl-2-associated athanogene 3, *BAG3*) 与其受体干扰素诱导跨膜基因 2 (interferon-induced transmembrane protein 2, *IFITM2*) 结合, 从而磷酸化 PI3K/AKT 信号通路, 促进胰腺导管腺癌细胞增殖和转移扩散^[6]。

IFITM1、*IFITM2* 和 *IFITM3* 属于小型干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 家族, 其成员能被干扰素 (interferon, IFN) 诱导并且抵抗病毒感染^[7]。IFITM 家族蛋白也能调控原始生殖细胞的分化和发育^[8]。胎盘发育的一个关键步骤是滋养细胞融合成多核合体滋养细胞层, 而干扰素 (interferons, IFNs) 诱导的跨膜蛋白 IFITMs 损害多核合体滋养细胞层的形成并抑制合胞素介导的细胞融合, 从而可能介导了先天性感染和其他 IFNs 诱导的病变中观察到的妊娠并发症^[9]。这些研究表明 IFITM 参与胚胎发育过程中对病原体入侵以及母体免疫系统的

收稿日期: 2022-05-19

基金项目: 武汉市生物育种关键技术攻关及新品种培育科技重大专项 (2022021302024853); 湖北省科技重大专项 (2021ABA005)

熊昊, E-mail: 1300928242@qq.com

通信作者: 李凤娥, E-mail: lifener@mail.hzau.edu.cn

保护。笔者所在课题组前期对母猪排卵前卵泡组织的转录组测序结果也表明, *IFITM1* 基因对于猪的卵泡发育及排卵可能具有一定的调控作用^[10]。然而, *IFITM1* 是否通过 PI3K/AKT 信号通路介导哺乳动物颗粒细胞生长、卵泡发育以及排卵相关过程仍不清楚。因此, 本研究通过流式细胞术、荧光定量 PCR、EdU 法、Western blot 等实验方法探究 *Ifitm1* 基因对小鼠卵巢颗粒细胞生长以及卵泡排卵的调控作用, 以期深入了解哺乳动物卵泡发育的机制提供新的数据资料。

1 材料与方 法

1.1 小鼠卵巢颗粒细胞的分离与培养

21 日龄雌性昆明小白鼠, 10 IU PMSG 超排处理 48 h 后, 处死取其卵巢, 分离颗粒细胞并进行细胞培养, 待细胞生长至 80%~90% 的汇合度后消化传代, 继续培养, 以用于后续的超表达和抑制表达试验。

1.2 颗粒细胞中超表达和抑制表达 *Ifitm1* 基因

用 T4 DNA 连接酶将目的基因 *Ifitm1* 连接到用 *Xho* I (10 IU/ μ L) 和 *Hind* III (10 IU/ μ L) 酶切后的 pCMV-N-HA 载体上, 16 °C 连接过夜, 转入 DH5 α 感受态细胞中。将得到的单菌落稀释在 400 μ L LB 液体培养基中, 取 1 μ L 菌液作为 PCR 扩增的模板, 对菌落 PCR 扩增产物进行测序。选择测序结果与插入片段符合的菌液进行扩大培养。使用 Omega Bio-tek 公司的无内毒素小量质粒提取试剂盒提取质粒。siRNA 寡核苷酸片段由广州市锐博生物科技有限公司合成(表 1)。

采用 Life Technologies 公司的脂质体 Lipofectamine RNAiMAX 和 Lipofectamine 3000 分别将 siRNA 和 pCMV-HA-*Ifitm1* 转染至 mGCs。将 mGCs 接种于 6 孔板, 细胞生长到 80% 汇合度左右进行转染; 弃去培养液, PBS 清洗后, 每孔分别加入转染试剂 250 μ L、OPTI-MEM 1 750 μ L; 37 °C 5% CO₂ 环境中培养 6 h 后更换为 10% 胎牛血清培养液, 48 h 后收集细胞, 以便于后续总 RNA 和蛋白质的提取。

表 1 寡核苷酸序列

Table 1 Oligo sequences

名称 Name	序列 Primer sequences (5'-3')	用途 Usage
si- <i>Ifitm1</i> -1	CCATCGTCGTCATCGTTGT	降低目的基因表达量
si- <i>Ifitm1</i> -2	ACATCAGCTCCCTGTCTT	Reducing target gene expression
si- <i>Ifitm1</i> -3	CCACAATCAACATGCCTGA	
si-NC	UUCUCCGAACGUGUCACG	对照 Negative control

fectamine RNAiMAX 和 Lipofectamine 3000 分别将 siRNA 和 pCMV-HA-*Ifitm1* 转染至 mGCs。将 mGCs 接种于 6 孔板, 细胞生长到 80% 汇合度左右进行转染; 弃去培养液, PBS 清洗后, 每孔分别加入转染试剂 250 μ L、OPTI-MEM 1 750 μ L; 37 °C 5% CO₂ 环境中培养 6 h 后更换为 10% 胎牛血清培养液, 48 h 后收集细胞, 以便于后续总 RNA 和蛋白质的提取。

1.3 qRT-PCR

采用 Trizol 法对转染后的细胞总 RNA 进行提取^[11], 采用多功能酶标仪 (2030 Multilabel Reader Victor X2) 和琼脂糖凝胶电泳分别对提取的 RNA 纯度及完整性进行检验, 对纯度较高 (200~1 000 ng/ μ L) 的 RNA 反转录以获得 cDNA, 从而进行 qRT-PCR 分析。定量反应体系 20 μ L: Mix 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, 灭菌水 8 μ L。反应过程: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, (53、55、58、59、61) °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 42 个循环; 72 °C 10 min; 25 °C 2 min。采用 qRT-PCR 检测相应基因的表达, 并计算基因相对表达量。目的基因引物序列见表 2。

表 2 定量扩增目的基因的引物

Table 2 qRT-PCR primers for amplifying targeted gene

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	片段长度/bp Length	退火温度/°C Temperature	用途 Usage
mmu-Lhr- qPCR-F	GAAGCGAATAACGAGACG	175	53	表达分析(目的基因) Expression analysis (Target genes)
mmu-Lhr- qPCR-R	GCCAAATCAACACCCTAA			
mmu-Cyp19a1- qPCR-F	ACTTCCCTAAGCCCAATG	168	53	
mmu-Cyp19a1- qPCR-R	TCTTACCTGGAATCGTC			
mmu-Ereg- qPCR-F	ACATGGACGGCTACTGCT	138	53	
mmu-Ereg- qPCR-R	CTTTGCTCAAGGGTTGGT			
mmu-Ifitm1- qPCR-F	GGGTCACCCACATCTCAACTTCTG	180	59	
mmu-Ifitm1- qPCR-R	CGTATCACCCACCATCTTCC			
mmu-Cend1- qPCR-F	GCGTACCCTGACACCAATCTC	183	61	
mmu-Cend1- qPCR-R	CTCCTCTCGCACTTCTGCTC			
mmu- β -actin- qPCR-F	GGCACCACCTTCTACAATG	180	58	表达分析(内参基因) Expression analysis(Internal gene)
mmu- β -actin- qPCR-R	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC			

1.4 细胞蛋白质提取及Western blot分析

细胞转染结束后,使用RIPA裂解液(150 μL /孔)对细胞进行裂解,收集裂解液于1.5 mL离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,收集上清液于PCR管,加入5 \times SDS上样缓冲液稀释至1 \times ,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min。每孔加入等量蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后采用湿转法将蛋白转印至PVDF膜。转膜完成后,在5%的脱脂牛奶中37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,然后4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜。一抗包括 β -actin抗体(AC026, Abclonal, 1:1 000)、LHR抗体(AF9104, Abclonal, 1:1 000)、CYP19A1抗体(A2161, Abclonal, 1:1 000)、EREG抗体(A16372, Abclonal, 1:1 000)、p-AKT-S473抗体(AP0140, Abclonal, 1:1 000)、HA抗体(AB9110, Abcam, 1:4 000)。二抗包括HRP山羊抗小鼠IgG(AS003, Abclonal, 1:3 000)、HRP山羊抗兔IgG(AS014, Abclonal, 1:3 000)。1 \times TBST清洗条带3次,每次10 min,再用1 \times TBST稀释二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后,1 \times TBST清洗条带3次,每次10 min。于扫膜仪(GE ImageQuant LAS4000 mini)中显影成像,用ImageJ软件量化灰度值,目标蛋白的相对表达量=目标蛋白的灰度值/内参蛋白的灰度值。

1.5 细胞增殖和细胞活力检测

调整小鼠卵巢颗粒细胞密度至 $1\times 10^6/\text{mL}$,接种于24孔板,密度达80%左右进行转染,24 h后每孔加入200 μL 配置好的EdU溶液进行孵育,孵育结束后对细胞进行固定。收集细胞后,用Apollo试剂对处于增殖期的细胞进行染色,在相应波长的光下进行荧光检测,若为增殖期细胞则呈红色点状荧光。

按照 $3\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 的细胞密度接种于96孔板,每孔100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养2~4 h至细胞贴壁。去掉原培养液,每孔加入10 μL CCK8和90 μL 培养液于培养箱中1~4 h,以达到最佳状态。吸取等量的混合液于新的96孔板,于450 nm波长下检测OD值。细胞存活率:将各测试孔的OD值减去本底OD值(空白组),各重复孔的OD值取平均数 \pm SD。细胞存活率=(试验组细胞OD值/对照细胞OD值) $\times 100\%$ 。

1.6 细胞周期检测

采用流式细胞术检测细胞周期,步骤如下:转染24 h后,胰酶消化细胞,离心去上清,加70%乙醇,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。PBS清洗细胞后,PI进行染色。用流式细胞仪和Modfit LT软件统计细胞周期百

分比。

1.7 数据分析

收集各处理组的数据,使用Microsoft Excel 2016进行整理挑选,用SPSS 22软件进行ANOVA单因素方差分析,并用LSD法进行多重比较,分析后的数据用“平均值 \pm 标准差”表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

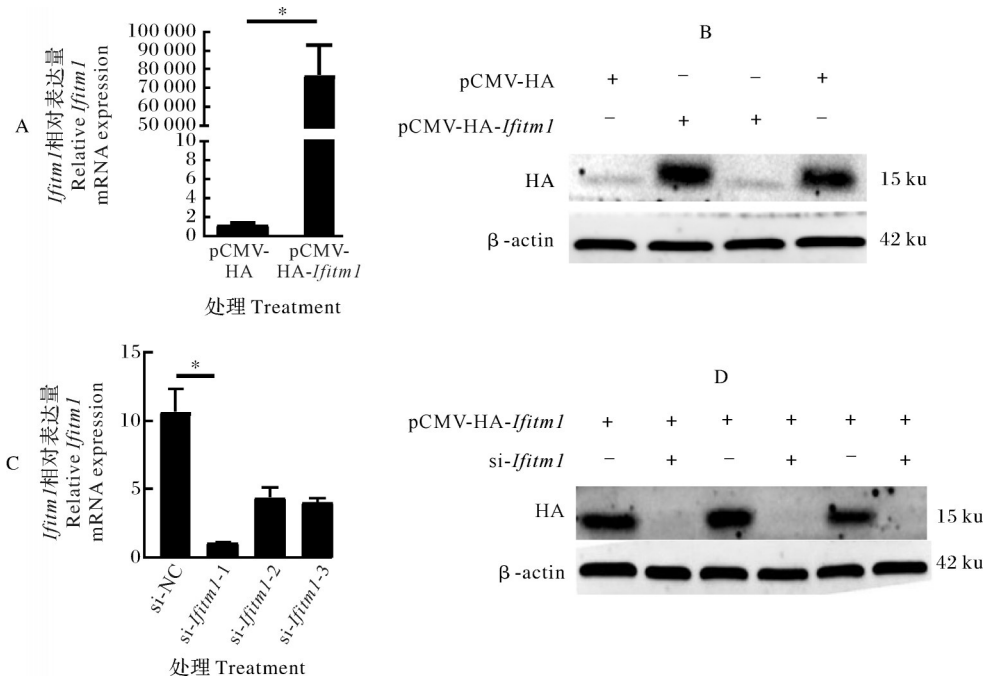
2.1 *Ifitm1* 基因的超表达和抑制表达

通过构建小鼠*Ifitm1*基因的超表达载体pCMV-HA-*Ifitm1*和*Ifitm1*干扰片段转染mGCs,从而研究*Ifitm1*基因在哺乳动物排卵过程中的作用。结果发现,超表达*Ifitm1*基因后,mGCs中*Ifitm1*基因mRNA和蛋白表达水平显著上调($P<0.05$)(图1A, B)。与此相反,与对照组相比,3条si-*Ifitm1*片段转染的mGCs中*Ifitm1* mRNA水平明显下调($P<0.05$)(图1C),其中si-*Ifitm1-1*的干扰效果最佳,以下试验均用si-*Ifitm1-1*(缩写si-*Ifitm1*)。通过单转染pCMV-HA-*Ifitm1*以及共转染pCMV-HA-*Ifitm1*和si-*Ifitm1*于mGCs,发现在si-*Ifitm1*存在的情况下,*Ifitm1*基因的蛋白表达水平显著下调($P<0.05$)(图1D),表明超表达载体和si-*Ifitm1*可以运用于后续试验。

2.2 *Ifitm1* 基因对卵巢颗粒细胞生长的影响

为了进一步确定*Ifitm1*基因对mGCs周期是否具有调控作用,利用流式细胞术等检测了超表达和抑制表达*Ifitm1*基因的卵巢颗粒细胞的周期情况。结果显示,与对照组相比,超表达*Ifitm1*基因的卵巢颗粒细胞各细胞周期占比无明显变化(图2A),而细胞周期蛋白相关基因*Ccnd1* mRNA的表达水平显著升高($P<0.05$)(图2B);抑制表达*Ifitm1*基因后,颗粒细胞S期细胞占比无明显变化,而G0/G1期的细胞占比开始降低($P<0.05$),G2/M期细胞比例显著升高(图2C);此外,干扰*Ifitm1*基因表达后,*Ccnd1* mRNA表达水平显著降低(图2D)。以上结果表明,*Ifitm1*基因通过调控*Ccnd1*基因的表达,进而改变卵巢颗粒细胞周期进程。

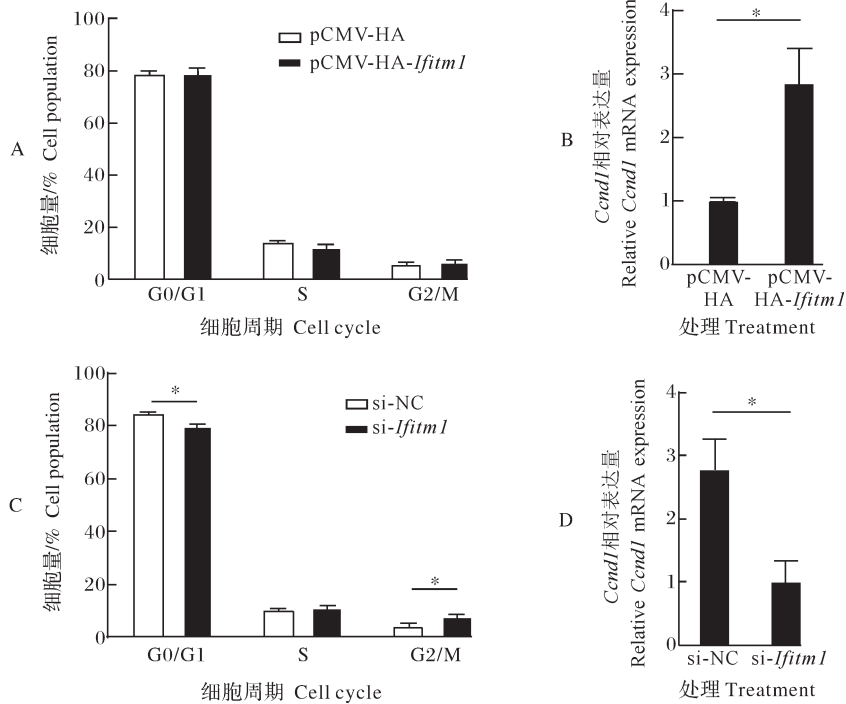
在颗粒细胞中转染siRNA-*Ifitm1*,对其增殖情况进行探究。结果发现,干扰*Ifitm1*基因后,颗粒细胞增殖受到抑制,且细胞活力显著降低(图3A, B)。因此,干扰*Ifitm1*基因表达会抑制*Ccnd1* mRNA的表达,降低G0/G1期细胞占比,将细胞阻滞在G2/M期,从而抑制颗粒细胞增殖。



A、C: *Ifitm1* 的 mRNA 水平 mRNA level of *Ifitm1*; B、D: *Ifitm1* 的蛋白表达水平 Protein level of *Ifitm1*. *: $P < 0.05$.

图1 小鼠颗粒细胞 *Ifitm1* 基因超表达和抑制表达

Fig. 1 Overexpression and suppression of *Ifitm1* gene in mGCs



A、C: 细胞周期的细胞量 Cell population of the cell cycle; B、D: 周期调控蛋白基因 *Ccnd1* mRNA 水平 mRNA level of *Ccnd1*. *: $P < 0.05$.

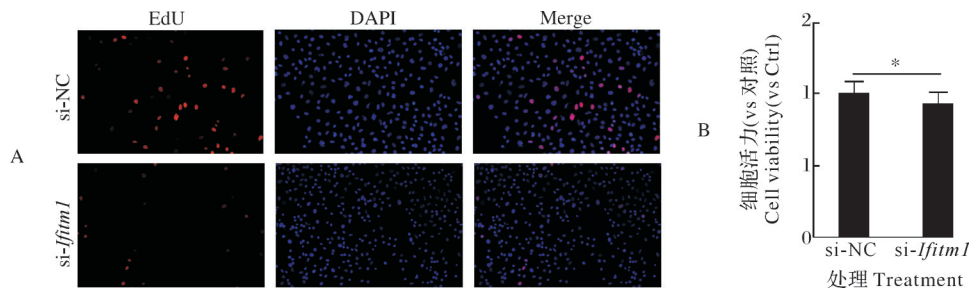
图2 *Ifitm1* 基因超表达或抑制表达后小鼠卵巢颗粒细胞周期

Fig. 2 Cell cycle of mGCs with overexpression or suppression of *Ifitm1* gene

2.3 *Ifitm1* 基因对排卵相关基因表达的影响及相关机制

在发现 *Ifitm1* 会影响颗粒细胞生长的基础上,对

mGCs 进行超表达或抑制表达 *Ifitm1* 基因,随后检测排卵标记基因的 mRNA 和蛋白质的表达水平。结果发现,干扰 *Ifitm1* 基因表达后,排卵标记基因 *Lhr*、



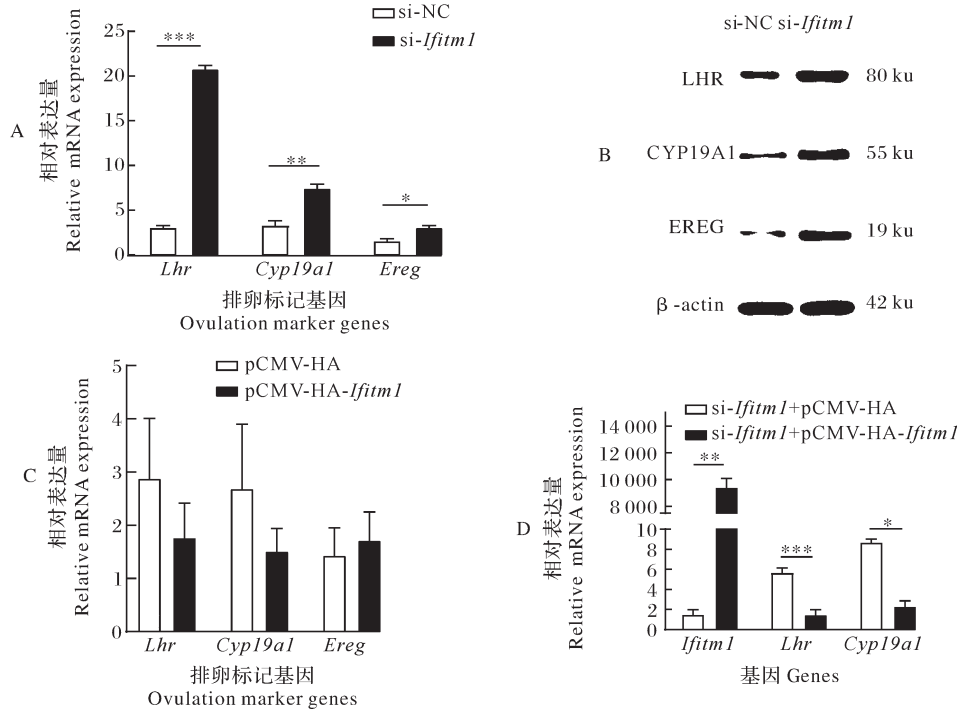
A:细胞增殖情况 Cell proliferation;B:细胞活力 Cell viability;*: $P < 0.05$.

图3 *Ifitm1* 基因抑制表达后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖和活力

Fig. 3 Cell proliferation and viability in mGCs treated with si-*Ifitm1*

Cyp19a1 和 *Ereg* 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高 (图 4A、B)。超表达 *Ifitm1* 基因后, 排卵标记基因的 mRNA 和蛋白表达量没有明显变化 (图 4C)。进一步进行补偿试验, 即干扰 *Ifitm1* 基因表达后超表达 *Ifitm1* 基因, 发现 *Ifitm1* 的 mRNA 水平得到显著升高

($P < 0.01$), 而 *Lhr* 和 *Cyp19a1* 的 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 4D)。以上结果表明, *Ifitm1* 基因对排卵标记基因 *Lhr*、*Cyp19a1* 和 *Ereg* 表达起到一定的调控作用。



A、C: 排卵标记基因 mRNA 水平 mRNA levels of ovulation marker genes; B: 排卵标记基因的蛋白水平 Protein levels of ovulation marker genes; D: 相关基因 mRNA 水平 mRNA levels of related genes.***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.

图4 超表达或抑制表达 *Ifitm1* 基因后卵巢颗粒细胞中排卵相关基因表达

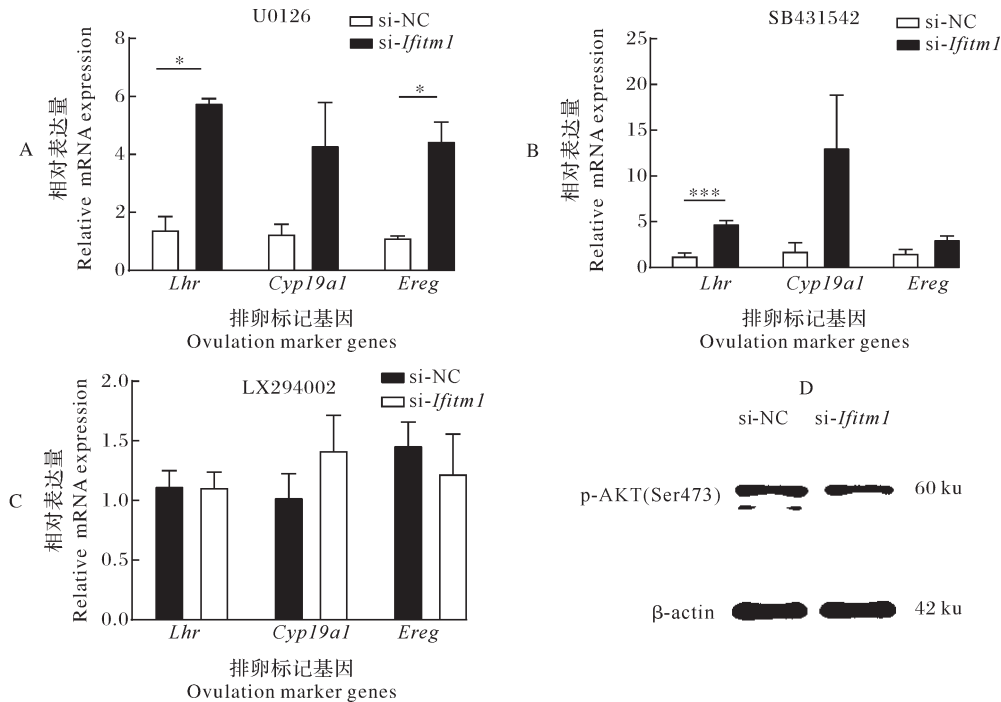
Fig. 4 Ovulation-related gene expression in mGCs treated with pCMV-HA-*Ifitm1* or si-*Ifitm1*

本研究发现干扰 *Ifitm1* 基因表达, p-AKT (Ser473) 蛋白水平显著降低, 而该蛋白在 PI3K/AKT 信号通路上起到关键作用 (图 5D)。为了探究 *Ifitm1* 基因是否通过 PI3K/AKT 信号通路介导排卵标记基因表达, 分别用相应的细胞信号通路抑制剂 U0126、SB431542 和 LY294002 阻断 ERK1/2、TGF- β 和 PI3K/AKT 信号通路, 进而检测排卵相关基因的

表达。结果显示, 加入 ERK1/2、TGF- β 信号通路抑制剂 U0126、SB431542 处理 mGCs 后干扰 *Ifitm1* 基因表达, 排卵标记基因 *Cyp19a1*、*Ereg* 和 *Lhr* 的 mRNA 水平仍有明显升高 (图 5A、B), 表明 *Ifitm1* 并非通过以上 2 种信号通路影响排卵标记基因表达。而加入 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 后干扰 *Ifitm1* 基因表达, 排卵标记基因的 mRNA 水

平均未出现明显变化(图5C)。因此,*Ifitm1*基因主要以PI3K/AKT信号通路介导排卵标记基因的表达,

而不是通过ERK1/2、TGF- β 信号通路来介导。



A、B、C: 排卵标记基因 mRNA 水平 mRNA levels of ovulation marker genes; D: p-AKT(Ser473) 的蛋白质水平 Protein level of p-AKT in mGCs transfected with si-*Ifitm1*. ***: $P < 0.001$, *: $P < 0.05$.

图5 *Ifitm1* 基因通过 PI3K/AKT 通路影响卵巢颗粒细胞中排卵相关基因表达

Fig.5 *Ifitm1* gene affects ovulation-related gene expression via PI3K/AKT pathway in mGCs

3 讨论

3.1 *Ifitm1* 基因对小鼠卵巢颗粒细胞生长的影响

颗粒细胞(granulosa cells, GCs)作为卵泡中最重要体细胞,参与多种激素及生长因子的合成,对卵泡生长发育和成熟起关键作用。GCs 增殖和凋亡的改变都可以破坏卵母细胞的成熟和胚胎发育,从而降低妊娠率^[12]。小分子同源蛋白家族 IFITM 在细胞增殖、同型细胞黏附和生殖细胞发育等方面同样发挥着重要作用。研究发现,在斑马鱼中,*ifitm1* 参与早期卵子发生,此外,在原始生殖细胞中特异表达的 *ifitm3* 在原始生殖细胞增殖和迁移过程中起关键作用^[13]。在本研究中课题组前期通过对太湖猪和大白猪排卵前卵泡组织进行转录组测序,筛选到差异表达基因 *IFITM1*^[10]。本研究中通过 EdU、CCK-8、流式细胞术等试验发现抑制表达 *Ifitm1* 基因,会降低处于 G0/G1 期的小鼠颗粒细胞占比,而 G2/M 期细胞出现阻滞现象,细胞占比明显升高,说明细胞有丝分裂受到抑制。此外,干扰 *Ifitm1* 基因表达后,抑制颗粒细胞增殖。因此,*Ifitm1* 基因对卵巢颗粒细胞生

长具有调控作用。

3.2 *Ifitm1* 基因对小鼠排卵相关基因表达的影响

LHR 作为卵泡发育及排卵过程中重要的信号转导分子,与配体 LH 结合后激活 cAMP/PKA 信号通路,进而调控成熟卵泡的破裂及排卵。研究表明,女性的 *Lhr* 基因突变失活后,表现出闭经,没有成熟卵泡或黄体等现象。敲除 *Lhr* 基因的雌性小鼠卵泡发育停滞在有腔卵泡阶段,无法继续向后发育,最终导致不孕^[14]。*CYP19A1* 基因编码合成的芳香化酶 P450arom 是雌激素产生的前体,活性较低的 *CYP19A1* 导致雄激素向雌激素转变过程受阻,会诱发多囊卵巢综合征,严重阻滞排卵。此外,抑制 *CYP19A1* 的活性,还会抑制原始卵泡向初级卵泡的转变。同样,表皮生长因子 EREG 被 LH 激增后,可作为主要的次级信号将排卵信号传递到卵丘卵母细胞复合体,促进卵泡排卵^[15]。本研究基于 *IFITM1* 基因在高产仔数的太湖猪排卵前卵泡中的表达量显著低于大白猪,从而探究 *Ifitm1* 基因对小鼠排卵标记相关基因表达的影响。研究结果表明,在小鼠卵巢颗粒细胞中抑制 *Ifitm1* 基因,显著上调排卵标记相关基

因(*Lhr*、*Ereg*和*Cyp19a1*)的表达水平;而超表达*Ifitm1*基因后,对排卵标记基因的表达水平无明显影响,原因可能是卵巢颗粒细胞中*Ifitm1*基因表达水平较高,导致超表达效果不明显。随后进行补偿试验,结果显示先干扰后超表达*Ifitm1*基因,发现*Lhr*和*Cyp19a1*的mRNA表达水平显著降低。综上所述,*Ifitm1*基因能通过调节小鼠排卵标记基因的表达抑制卵泡过程。

3.3 *Ifitm1*- PI3K/AKT 信号通路对卵泡发育的影响

PI3K/AKT 信号通路能调控细胞内多种生物学进程,包括卵泡发育成熟与排卵过程等。FSH独立地激活PI3K/AKT通路,并招募14-3-3适配蛋白,影响颗粒细胞的生存和增殖^[16]。通过AKT途径,FSH还增加了低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的转录,从而诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等的表达,而VEGF是排卵/黄体化过程中血管生成的关键介质^[17]。有研究表明,PI3K/AKT信号还参与细胞抗病毒免疫反应,如IFITM3能通过PI3K/AKT信号通路抑制寨卡病毒(zika virus, ZIKV)诱导的人类细胞死亡^[18]。本研究表明,干扰*Ifitm1*基因表达后,p-AKT(Ser473)蛋白水平显著下调。此外,通过PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002处理后,干扰*Ifitm1*基因表达,*Lhr*、*Cyp19a1*和*Ereg*的mRNA水平均未出现明显改变。因此,*Ifitm1*是通过PI3K/AKT信号通路介导排卵标记相关基因的表达。

综上所述,抑制小鼠*Ifitm1*基因表达,颗粒细胞增殖比例显著降低;而*Ifitm1*基因通过抑制PI3K/AKT细胞信号通路活性影响排卵标记基因的表达。本研究揭示小鼠*Ifitm1*基因调控卵泡排卵的分子机制,可为解析干扰素刺激基因在繁殖过程中的复杂调控机制提供新见解。

参考文献 References

- [1] YOSHINO T, SUZUKI T, NAGAMATSU G, et al. Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells[J/OL]. *Science*, 2021, 373(6552): eabe0237 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1126/science.abe0237>.
- [2] GRIVE K J, FREIMAN R N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve [J]. *Development (Cambridge, England)*, 2015, 142(15): 2554-2563.
- [3] YU F Q, HAN C S, YANG W, et al. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially [J]. *The journal of endocrinology*, 2005, 186(1): 85-96.
- [4] SUN G W, KOBAYASHI H, SUZUKI M, et al. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I synergistically induce up-regulation of cartilage link protein (Crtl1) via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/Akt in rat granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(3): 793-801.
- [5] MANI A M, FENWICK M A, CHENG Z R, et al. IGF₁ induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2010, 139(1): 139-151.
- [6] ROSATI A, BASILE A, D' AURIA R, et al. BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages [J/OL]. *Nature communications*, 2015, 6: 8695 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1038/ncomms9695>.
- [7] MARTENSEN P M, JUSTESEN J. Small ISGs coming forward [J]. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 2004, 24(1): 1-19.
- [8] HANAGATA N, LI X L, MORITA H, et al. Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice [J]. *Journal of bone and mineral metabolism*, 2011, 29(3): 279-290.
- [9] BUCHRIESER J, DEGRELLE S A, COUDERC T, et al. IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise [J]. *Science*, 2019, 365(6449): 176-180.
- [10] WANG L, TANG J, ZHOU J, et al. N-Acetyl-L-cysteine restores reproductive defects caused by Ggt1 deletion in mice [J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(8): e510 [2022-05-19]. <https://doi.org/10.1002/ctm2.510>.
- [11] RODGERS K P, HULBERT A, KHAN H, et al. A TRIZOL-based method for high recovery of plasma sncRNAs approximately 30 to 60 nucleotides [J/OL]. *Scientific reports*, 2022, 12: 6778 [2022-05-19]. <https://www.nature.com/articles/s41598-022-10800-0>. DOI: 10.1038/s41598-022-10800-0.
- [12] HENNET M L, COMBELLES C M H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation [J]. *The international journal of developmental biology*, 2012, 56(10/11/12): 819-831.
- [13] XUE W W, WANG H N, WANG Z M, et al. Cloning and characterization of *ifitm1* and *ifitm3* expression during early zebrafish development [J]. *Zygote (Cambridge, England)*, 2016, 24(1): 149-158.
- [14] THEMEN A P N, HUHTANIEMI I T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function [J]. *Endocrine reviews*, 2000, 21(5): 551-583.
- [15] PARK J Y, SU Y Q, ARIGA M, et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 682-684.
- [16] COHEN B D, NECHAMEN C A, DIAS J A. Human follitropin receptor (FSHR) interacts with the adapter protein 14-3-3 τ [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2004, 220(1/2): 1-7.
- [17] ALAM H, MAIZELS E T, PARK Y, et al. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain

(Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation [J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279 (19):19431-19440.

[18] MONEL B, COMPTON A A, BRUEL T, et al. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells [J]. The EMBO journal, 2017, 36 (12): 1653-1668.

Function and related regulatory mechanisms of *Ifitm1* gene in murine follicular development and ovulation

XIONG Hao, ZHAO Yuexiu, CHEN Dake, CHEN Yaru, CHEN Gaogui, LI Feng'e

College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the regulatory mechanisms of the interferon-induced transmembrane protein 1 gene (*Ifitm1*) in mammalian follicle development, *Ifitm1* was overexpressed and suppressed in mouse granulosa cells (mGCs). The effects of *Ifitm1* on the growth of mGCs were detected by flow cytometry, qRT-PCR and EdU method, the effects of *Ifitm1* on the expression of ovulation-related genes in mice were detected by qRT-PCR and Western blot, and the mGCs were treated with related pathway inhibitors to investigate the mechanisms by which *Ifitm1* affects follicle development and ovulation in mice. The results showed that the *Ifitm1* gene was successfully overexpressed and suppressed in mGCs. Further studies revealed that interference with *Ifitm1* gene expression reduced the expression of cell cycle protein *Ccnd1* by 63.5%, decreased the percentage of cells in G0/G1 phase, blocked the cells in G2/M phase, thus inhibiting the proliferation of granulosa cell. *Ifitm1* interference also resulted in 1.95-6.76 fold increase in the expression levels of the ovulation marker genes *Lhr*, *Ereg* and *Cyp19a1* ($P < 0.05$), and inhibited the expression of p-AKT (Ser473), a key protein in the PI3K/AKT signalling pathway, blocked the PI3K/AKT signalling pathway, and then inhibited the expression of *Ifitm1* gene, but the mRNA levels of *Lhr*, *Ereg* and *Cyp19a1* remained unchanged in mGCs, suggesting that the *Ifitm1* gene affects ovulation through inhibiting the activity of PI3K/AKT signalling pathway. In summary, *Ifitm1* plays an important role in mGC growth and follicular ovulation through the PI3K/AKT pathway.

Keywords mouse; *Ifitm1* gene; follicular development; ovulation; ovarian granulosa cell

(责任编辑:边书京)