

# miR-191 靶向 *BDNF* 基因通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进猪未成熟支持细胞增殖

唐湘薇, 楚丹, 颜赛娜, 尹艳飞, 卞桥, 翁波, 陈斌, 冉茂良

湖南农业大学动物科学技术学院, 畜禽遗传改良湖南省重点实验室, 长沙 410128

**摘要:** 睾丸支持细胞数量是影响精子生成能力的主要因素之一, microRNA (miRNA) 参与调控猪未成熟支持细胞的发育过程, 然而, 大多数被鉴定出的 miRNA 对支持细胞的作用及其机制尚不明确。基于本课题组前期高内涵筛选结果, 本文进一步通过流式细胞术、蛋白免疫印迹和双荧光素酶报告基因等方法, 研究了 *miR-191* 调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的作用机理。结果表明: 过表达 *miR-191* 显著促进细胞周期由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期和 G<sub>2</sub> 期, 细胞增殖能力显著增强, 细胞凋亡率显著降低; 而抑制表达 *miR-191* 则与之相反。双荧光素酶报告基因系统验证 *miR-191* 直接靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR。抑制表达 *BDNF* 基因促进细胞周期进入 S 期, 并促进细胞增殖而抑制细胞凋亡, 与过表达 *miR-191* 的作用一致。共转染试验结果显示, *BDNF* 基因可以拮抗 *miR-191* 对细胞增殖和凋亡的调控作用。此外, 过表达 *miR-191* 和抑制表达 *BDNF* 基因均可显著促进 PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平, 且 *BDNF* 基因同样拮抗 *miR-191* 对 PI3K 和 AKT 蛋白的调控作用。本研究结果证实 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因, 通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进猪未成熟支持细胞增殖且抑制其凋亡, 为进一步解析 *miR-191* 调控猪精子生成的生物学功能提供了理论基础。

**关键词:** *miR-191*; *BDNF* 基因; PI3K/AKT 信号通路; 增殖; 猪睾丸支持细胞

收稿日期: 2021-04-25; 修回日期: 2021-06-02

**基金项目:** 湖南省自然科学基金项目(编号: 2020JJ4348), 湖南省重点研发计划项目(项目编号: 2020NK2024)和湖南省生猪产业技术体系岗位专家项目资助[Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2020JJ4348), the Key Research and Development Plan Projects of Hunan Province(No. 2020NK2024), and the Project from Porcine Industry and Technology System of Hunan Province]

**作者简介:** 唐湘薇, 在读硕士研究生, 专业方向: 猪遗传育种。E-mail: 993808546@qq.com

**通讯作者:** 冉茂良, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: ranmaoliang0903@126.com

陈斌, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: chenbin7586@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-154

网络出版时间: 2021/6/11 17:50:36

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210611.1452.002.html>

## MiR-191 promotes the porcine immature Sertoli cell proliferation by targeting the *BDNF* gene through activating the PI3K/AKT signaling pathway

Xiangwei Tang, Dan Chu, Saina Yan, Yanfei Yin, Qiao Bian, Bo Weng, Bin Chen, Maoliang Ran

Hunan Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement of Domestic Animal, College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

**Abstract:** The number of Sertoli cells in the testis is a major regulator on the sperm production capacity. MicroRNAs (miRNAs) participate in regulating the proliferation and apoptosis of porcine immature Sertoli cells. However, the functions and mechanisms of action of most identified miRNAs in porcine Sertoli cells remain largely unknown. In the present study, based on our previous results from an EdU-based high-content screening assay, we further studied the mechanism of action of *miR-191* on the proliferation and apoptosis of porcine immature Sertoli cells through flow cytometry, Western blotting, and dual-luciferase activity analyses. The results demonstrated that overexpression of *miR-191* promoted cell cycle progression from G<sub>1</sub> phase to the S and G<sub>2</sub> phases, enhanced cell proliferation, and inhibited apoptosis in the porcine immature Sertoli cells, whereas *miR-191* inhibition resulted in the opposite effects. The results from a luciferase reporter assay showed that *miR-191* directly targeted the 3'-UTR of the *BDNF* gene. *BDNF* knockdown also promoted cell cycle progression to the S phase, cell proliferation and inhibited cell apoptosis, which were consistent with the effects of the *miR-191* overexpression. A co-transfection experiment showed that *BDNF* knockdown abolished the effects of *miR-191* inhibition. Furthermore, both *miR-191* overexpression and *BDNF* inhibition elevated the phosphorylation of PI3K and AKT, the key components of the PI3K/AKT signaling pathway, whereas *BDNF* inhibition offset the effects of the *miR-191* knockdown. Overall, these data indicated that *miR-191* promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in porcine immature Sertoli cells by targeting the *BDNF* gene through activating the PI3K/AKT signaling pathway. This study provides a novel scientific basis for further investigation on the biological functions of *miR-191* on porcine spermatogenesis.

**Keywords:** *miR-191*; *BDNF* gene; PI3K/AKT signaling pathway; proliferation; porcine Sertoli cells

睾丸支持细胞作为生精小管内一种体细胞, 不仅通过细胞间的紧密连接形成血睾屏障, 为精子细胞的生长发育提供物理支撑和稳定的微环境, 还分泌多种细胞因子以保障和促进精子细胞的成熟。猪睾丸支持细胞增殖活性的高峰期在出生至 1 月龄与初情期前后两个阶段, 随后睾丸支持细胞增殖活性逐渐丧失, 公猪性成熟后睾丸组织中支持细胞数量保持相对恒定<sup>[1]</sup>。然而, 每个成熟的支持细胞仅能支撑 30~50 个精子细胞的生长发育, 因此支持细胞数量与成年雄性动物睾丸组织大小、精子密度、精子活力、生精小管中生殖细胞数量和间质细胞数量息息相关<sup>[2,3]</sup>。这表明猪睾丸支持细胞的增殖活性决定着性成熟后睾丸支持细胞数量, 进而影响公猪整

个使用年限内的精子发育和成熟以及精液品质。

MicroRNA (miRNA) 作为一类长约 22 nt 的非编码 RNA, 通过靶向蛋白编码基因 3'-非翻译区 (3'-un-translated region, 3'-UTR) 抑制其翻译过程, 从而广泛参与调控细胞增殖、凋亡、分化等多种生物学过程。近年来, 利用 RNA-seq 技术已从不同发育阶段的猪睾丸组织中鉴定出 300 余个 miRNA<sup>[4-6]</sup>, 且经细胞分离后, 相比于生精细胞, 18 个 miRNA 高表达于支持细胞<sup>[7]</sup>。在此基础上, 多个 miRNA 已被证实在猪睾丸支持细胞的生长发育过程中具有重要调控作用。例如: *miR-762*<sup>[8]</sup>、*miR-196a*<sup>[9]</sup> 和 *miR-499*<sup>[10]</sup> 等调控猪睾丸支持细胞增殖; *miR-8-3p*<sup>[11]</sup>、*miR-375*<sup>[12]</sup> 和 *miR-1285*<sup>[13]</sup> 等调控猪睾丸支持细胞氧

化应激水平; *miR-26a* 调控猪睾丸支持细胞自噬活性<sup>[14]</sup>。本课题组前期采用高内涵筛选技术对 60 个 miRNA 调控猪未成熟支持细胞增殖的作用进行了筛选, 鉴定出包括 *miR-191* 在内的 27 个 miRNA 对猪未成熟支持细胞具有较强的促增殖效应<sup>[15]</sup>, 但 *miR-191* 的作用机制尚不清楚。研究表明, *miR-191* 可以促进多种细胞的增殖, 例如肝癌细胞<sup>[16]</sup>、食管鳞状细胞<sup>[17]</sup>、成纤维细胞<sup>[18]</sup>等。基于 miRNA 序列在物种间的高度保守性, 我们推测 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞增殖具有重要的调控作用。因此, 本研究利用流式细胞术、CCK-8 (cell counting kit-8)、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)、实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)、Western blotting 和双荧光素酶报告基因等技术解析了 *miR-191* 调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的靶基因及信号机制, 为进一步阐明 *miR-191* 调控猪睾丸发育和精子生成的机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

猪睾丸细胞系 (swine testicular, ST) ATCC®CRL-1746™ 和 293T 工具细胞购自上海安为生物科技有限公司, 其中 ST 已被证实为猪未成熟支持细胞<sup>[19]</sup>, 且广泛应用于相关研究<sup>[8,15]</sup>。细胞培养基为 DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 双抗 (Penicillin-Streptomycin, 美国 Gibco 公司) = 10 : 1 : 0.11, 并将细胞置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

### 1.2 细胞转染

设计合成 *miR-191* 模拟物 (mimic) 和抑制剂 (inhibitor) 序列过表达和抑制表达 *miR-191*, 设计合成 *BDNF* 基因 siRNA (5'-GCCAACTGAAGCAGTACTT-3') 抑制表达 *BDNF* 基因。接种细胞于 6 孔板, 在融合度达到 60%~70% 时, 吸弃培养基, 每孔加入 1 mL PBS (美国 Gibco 公司) 洗涤, 重复操作 2 次, 吸弃 PBS。向 DMEM 高糖基础培养基 (每孔 250 μL) 中加入 Lipofectamine 2000 试剂 (每孔 5 μL, 美国 Invitrogen 公司), 充分混匀成试剂①, 室温静置 5 min;

再向 DMEM 高糖基础培养基 (每孔 250 μL) 中分别加入 *miR-191* mimic、mimic NC、*miR-191* inhibitor、inhibitor NC、*BDNF* siRNA、siRNA NC、*miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA、*miR-191* inhibitor + siRNA NC 和 inhibitor NC + siRNA NC (每孔 5 μL, 广州锐博生物科技有限公司), 充分混匀成试剂②, 室温静置 5 min; 将试剂①与试剂②混匀, 静置 30 min 后加入细胞液中。每组至少设置 3 个重复, 转染 6~8 h 后更换为完全培养基继续培养, 以备后续实验使用。

### 1.3 流式细胞周期检测

细胞转染 24 h 后, 胰酶 (美国 HyClone 公司) 消化并收集细胞于 1.5 mL EP 管, 每管加入 250 μL PBS 重悬, 将细胞悬液逐滴加入 750 μL 预冷乙醇中, 4℃ 过夜保存, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每管加入 1 mL 预冷的 PBS, 重悬细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 弃 PBS, 每管加入 150 μL 浓度为 100 μg/mL 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液 (长沙维尔生物科技有限公司), 在 4℃ 避光条件下染色 30 min。使用流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司) 检测细胞周期分布情况。

### 1.4 细胞增殖检测

接种细胞于 96 孔板, 采用 CCK-8 (东仁化学科技 (上海) 有限公司) 和 EdU 试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司) 检测细胞增殖情况。CCK-8 检测方法: 分别转染 24 h 和 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下孵育 1 h, 使用酶标仪于 450 nm 波长下检测每孔细胞的吸光度值, 将 24 h 作为对照, 计算 48 h 的相对增殖率。EdU 检测方法: 转染 24 h 后, 每孔加入 100 μL EdU 培养基, 继续置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下孵育 2 h, 并严格按照 EdU 试剂盒使用说明书进行细胞固定、Apollo 染色和 DNA 染色, 置于荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司) 下拍照, 并使用 Image J 软件对图片中的所有活细胞和有丝分裂细胞计数。

### 1.5 流式细胞凋亡检测

接种细胞于 6 孔板, 采用 Annexin V-FITC/PI 染色法 (南京凯基生物科技发展有限公司) 于流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。流式细胞凋亡检测: 转染

24 h 后,胰酶消化并收集细胞,每管加 100  $\mu$ L  $\times$  Binding Buffer (上海碧云天生物技术有限公司)重悬洗涤,加入 5  $\mu$ L Annexin V-APC 试剂孵育 15 min,加 5  $\mu$ L PI 染色液重悬细胞,置于 4℃ 避光,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

## 1.6 细胞 ATP 水平检测

接种细胞于 6 孔板,转染 24 h 后,弃去培养基,PBS 清洗 2 次,每孔加入 200  $\mu$ L ATP 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),静置裂解 5 min,收集细胞于 1.5 mL EP 管,4℃、15,000 r/min 离心 5 min,使用 ATP 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)按照使用说明检测细胞 ATP 水平。

## 1.7 Western blotting 检测

收集细胞于 1.5 mL EP 管,采用 RIPA lysis buffer (上海碧云天生物技术有限公司)提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)在酶标仪上对总蛋白进行定量。每孔加 10  $\mu$ L 煮沸的蛋白样品于 10%SDS-PAGE 的分离胶和 5%SDS-PAGE 的浓缩胶(上海碧云天生物技术有限公司)中,先 60~80 V、30 min,然后调整为 100~120 V、60 min 进行电泳,观察溴酚蓝至胶板底部即可停止。使用电流 300 mA、40 min 条件进行转膜,随后加入含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液(北京索莱宝科技有限公司),摇床室温封闭条带 1.5 h,加入一抗于 4℃ 孵育过夜。一抗包括: Bcl2 (1 : 1000, 美国 Protein Tech Group 公司)、BAX (1 : 2000, 美国 Protein Tech Group 公司)、Caspase-3 (1 : 100, 英国 Abcam 公司)、p-PI3K (1 : 1000, phospho-Tyr458, 美国 Cell Signaling Technology 公司)、p-AKT (1 : 1000, phosphoSer473, 美国 Affinity Biosciences 公司)和  $\beta$ -actin (1 : 2000, 美国 Protein Tech Group 公司)。最后,加入适量二抗稀释液,室温摇床 2 h。二抗包括: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1 : 1000, 上海碧云天生物技术有限公司)和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (1 : 1000, 上海碧云天生物技术有限公司)。二抗洗涤后,使用 ECL 化学发光液(上海翊圣生物科技有限公司)与膜孵育 1 min,采用保鲜膜完全包裹印迹膜,在暗盒内与 X 胶片曝光 10 min,显影冲洗。

## 1.8 实时荧光定量 PCR

采用 TRIzol 试剂盒(美国 Thermo 公司)提取细胞总 RNA,采用核酸/蛋白浓度测定仪(NanDrop ND-2000,美国 Thermo Scientific 公司)检测总 RNA 质量,合格的总 RNA 使用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)进行 cDNA 逆转录。采用 Oligo 6.0 软件设计实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物信息见表 1。构建 25  $\mu$ L qRT-PCR 反应体系,包括 12.5  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ , 日本 TaKaRa 公司)、1  $\mu$ L 上游引物、1  $\mu$ L 下游引物、2  $\mu$ L cDNA 模板和 8.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应体系置于 IQ-5 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上采用如下程序进行 qRT-PCR 反应: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 55℃ ~95℃ 溶解 30 s, 81 个循环。*pig-TBP* 基因作为内参基因,每组设置 3 个重复。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算各基因的相对表达水平。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因	引物序列(5'→3')
<i>CCND1</i>	F: TACACCGACAACCTCCATCCG R: GCCGCCAGGTTCCACTT
<i>CCNE1</i>	F: CCTGCTGAAGATGCCATAAC R: TGCTCTGCTTCTTACTGCTCG
<i>CDK-4</i>	F: GTGGCCCTCAAGAGCGTAAG R: CAGACATCCATCAGCCGGAC
<i>c-MYC</i>	F: AACCCCTGGCTCTCCACGAG R: ATTCCGACCTTTTGGCAGGG
<i>FGF2</i>	F: ACCAGGTCCTGAGATCCATCCAC R: TTCGGCAACAGCACACCAATCC
<i>BMP4</i>	F: ACCAATCATGCCATCGTTTCAGACC R: TGATTCAGCGCAACCACATCC
<i>GDNF</i>	F: GAGACCGCTGTGTATCGCATTC R: GCCTTCTTCTCTTCTCTCTCTC
<i>PCNA</i>	F: ATTTGGCCATGGGCGTGAAC R: CTAGTGCCAAGGTGTCTGCAT
<i>EGF</i>	F: GCGAGCGATGTCAGCACAGAG R: AGGAGCAGCAGCAGGACCAG
<i>TBP</i>	F: GCGATTGCTGCTGTAATCA R: CCCCACCATGTTCTGAATCT

## 1.9 双荧光素酶活性检测

将合成的 *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor) 基因 3'-UTR-WT 和 3'-UTR-MUT 序列(广州市锐博生物科技有限公司)连接至 psiCHECK2 载体, 筛选阳性克隆并测序确认后, 与 *miR-191* mimic 和 mimic NC 在 DMEM high glucose 基础培养基条件下两两组合共转染至 293 T 细胞, 48 h 后收集细胞, 每孔加 35  $\mu$ L PBS、35  $\mu$ L luciferase reagent (美国 Promega 公司), 震荡 10 min, 移至 96 孔白色细胞培养板中, 采用多功能酶标仪(Spectra max m5e, 美国 Molecular Devices 公司)测定荧光值; 每孔加 30  $\mu$ L Stop reagent (美国 Promega 公司), 震荡 10 min 后, 测定荧光值。

## 1.10 统计分析

采用 IBM SPSS 22.0 软件进行统计分析, 使用 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析, 并采用 Duncan 氏法进行多重比较以评估各组之间的差异。数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

# 2 结果与分析

## 2.1 *miR-191* 促进猪未成熟支持细胞增殖

为明确 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞增殖的作用, 分别转染 *miR-191* mimic、mimic NC、*miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC。流式细胞周期结果表明, 过表达 *miR-191* 后, 处于  $G_1$  期的细胞比例极显著降低( $P<0.01$ ), S 期和  $G_2$  期的细胞比例显著增加( $P<0.05$ ) (图 1A), 抑制表达 *miR-191* 后, 处于 S 期和  $G_2$  期的细胞比例则显著降低( $P<0.05$ ) (图 1C)。采用 qRT-PCR 技术检测细胞周期相关基因的表达, 结果表明, 过表达 *miR-191* 极显著促进 *c-MYC*、*CCNE1*、*CCND1* 和 *CDK4* 基因的表达水平( $P<0.01$ ) (图 1B), 而抑制表达 *miR-191* 则显著抑制以上基因的表达水平( $P<0.05$ ) (图 1D)。以上结果表明, *miR-191* 促进猪未成熟支持细胞周期进程。

采用 qRT-PCR 技术检测细胞增殖相关基因的表达水平。结果表明, 过表达 *miR-191* 显著增加 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 基因的表达水平( $P<$

0.05) (图 1E), 而抑制表达 *miR-191* 则显著降低细胞增殖相关基因的表达( $P<0.05$ ) (图 1F)。CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况, 结果表明过表达 *miR-191* 极显著提高细胞增殖能力( $P<0.01$ ), 而抑制表达 *miR-191* 则极显著降低细胞增殖能力( $P<0.01$ ) (图 1G)。此外, EdU 染色结果表明, 过表达 *miR-191* 显著促进细胞增殖活性( $P<0.05$ ), 而抑制表达 *miR-191* 则极显著降低细胞增殖活性( $P<0.01$ ) (图 1: H 和 I)。

## 2.2 *miR-191* 抑制猪未成熟支持细胞凋亡

为进一步明确 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞凋亡的影响, 本研究采用 Annexin V-FIT/PI 方法检测细胞凋亡情况。结果表明, 过表达 *miR-191* 显著降低细胞凋亡率( $P<0.05$ ) (图 2: A 和 B), 而抑制表达 *miR-191* 则显著增加细胞凋亡率( $P<0.05$ ) (图 2: A 和 D)。细胞 ATP 水平检测结果表明, 过表达 *miR-191* 极显著增加细胞 ATP 水平( $P<0.01$ ) (图 2C), 而抑制表达 *miR-191* 则显著降低细胞 ATP 水平( $P<0.05$ ) (图 2E)。采用 Western blotting 技术检测细胞凋亡相关基因蛋白水平的表达, 结果显示, 过表达 *miR-191* 增加 Bcl2 蛋白表达水平而抑制 BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平(图 2F), 而抑制表达 *miR-191* 则与之相反(图 2G)。综上所述, *miR-191* 抑制猪未成熟支持细胞凋亡。

## 2.3 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR

本研究利用 miRwalk、TargetScan 和 miRanda 在线软件预测了不同物种中 *miR-191* 的靶基因, 根据结合位点保守性分析, 初步筛选出 *BDNF* 基因作为候选靶基因(图 3A)。为进一步确定 *miR-191* 与基因 *BDNF* 之间的靶向关系, 本研究构建了 *BDNF*-WT 和 *BDNF*-MUT 双荧光素酶报告基因载体, 并与 *miR-191* mimic 和 mimic NC 两两组合共转染至 293T 细胞。双荧光素酶活性检测结果表明, *BDNF*-WT + *miR-191* mimic 共转染组的双荧光素酶活性显著低于其他 3 组( $P<0.05$ ) (图 3B)。采用 qRT-PCR 技术检测 *miR-191* 对 *BDNF* 基因 mRNA 表达的影响, 结果表明, 过表达 *miR-191* 极显著降低 *BDNF* 基因 mRNA 表达水平( $P<0.01$ ), 而抑制表达 *miR-191* 极显著增加 *BDNF* 基因 mRNA 表达水平( $P<0.01$ )。综上所述, *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR 并抑制其表达水平。



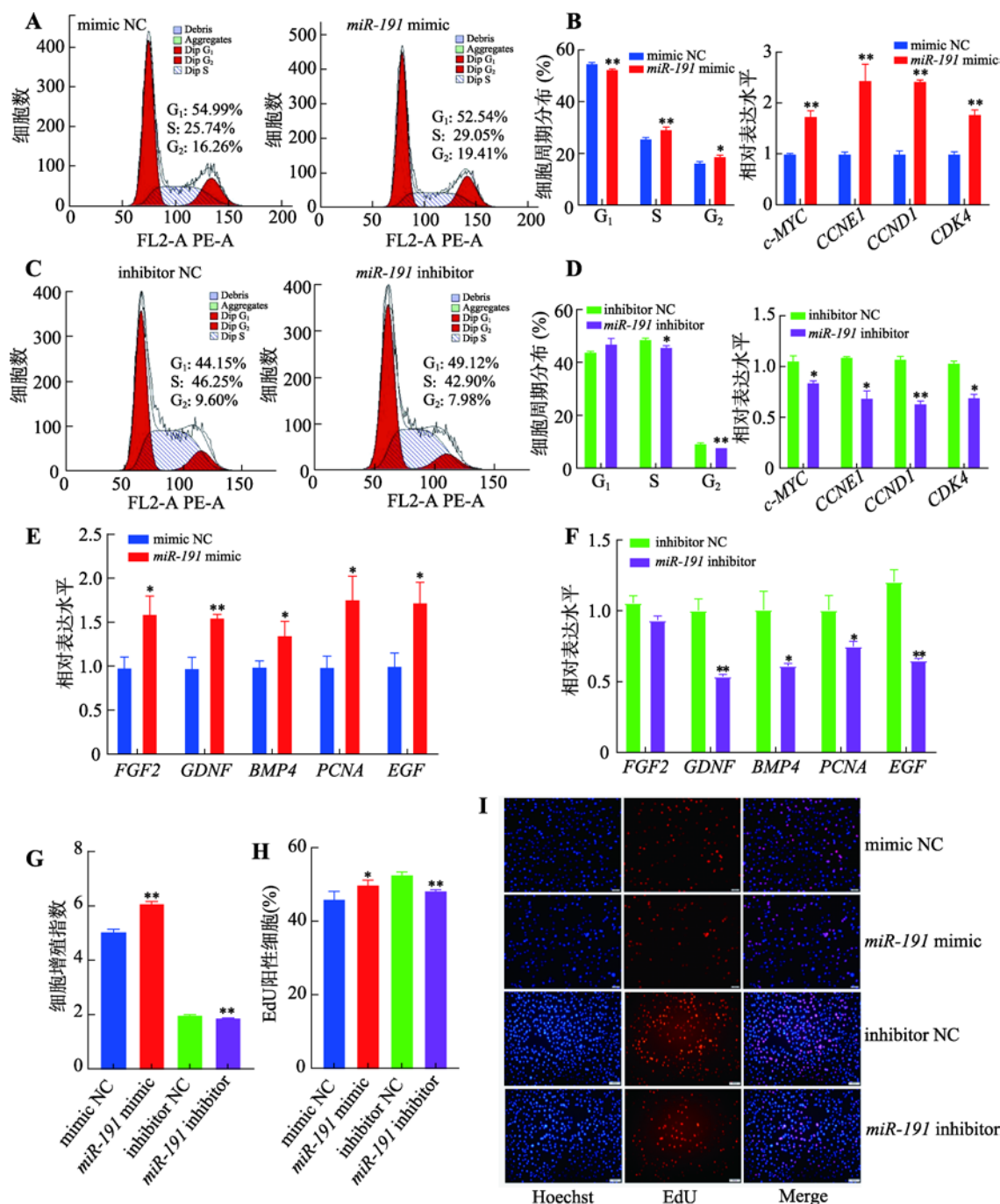


图1 miR-191 促进猪未成熟支持细胞增殖

**Fig. 1 miR-191 promotes the porcine immature Sertoli cell proliferation**

A: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, 流式细胞仪检测流式周期; B: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, qRT-PCR 检测周期相关基因 (*c-MYC*、*CCNE1*、*CCND1* 和 *CDK4*) mRNA 相对表达水平; C: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, 流式细胞仪检测流式周期; D: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, qRT-PCR 检测周期相关基因 (*c-MYC*、*CCNE1*、*CCND1* 和 *CDK4*) mRNA 相对表达水平; E: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, qRT-PCR 检测增殖相关基因 (*FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF*) mRNA 相对表达水平; F: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, qRT-PCR 检测增殖相关基因 (*FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF*) mRNA 相对表达水平; G: 转染 *miR-191* mimic、mimic NC、*miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, CCK-8 试剂检测细胞增殖指数; H: 转染 *miR-191* mimic、mimic NC、*miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, EdU 试剂盒检测增殖细胞比例; I: 细胞 EdU 实验染色图 (蓝色细胞为 Hoechst 染色, 红色细胞为 EdU 染色, Merge 为 Hoechst 和 EdU 染色合并图, 标尺: 50  $\mu$ m)。\* $P$ <0.05 表示差异显著, \*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。

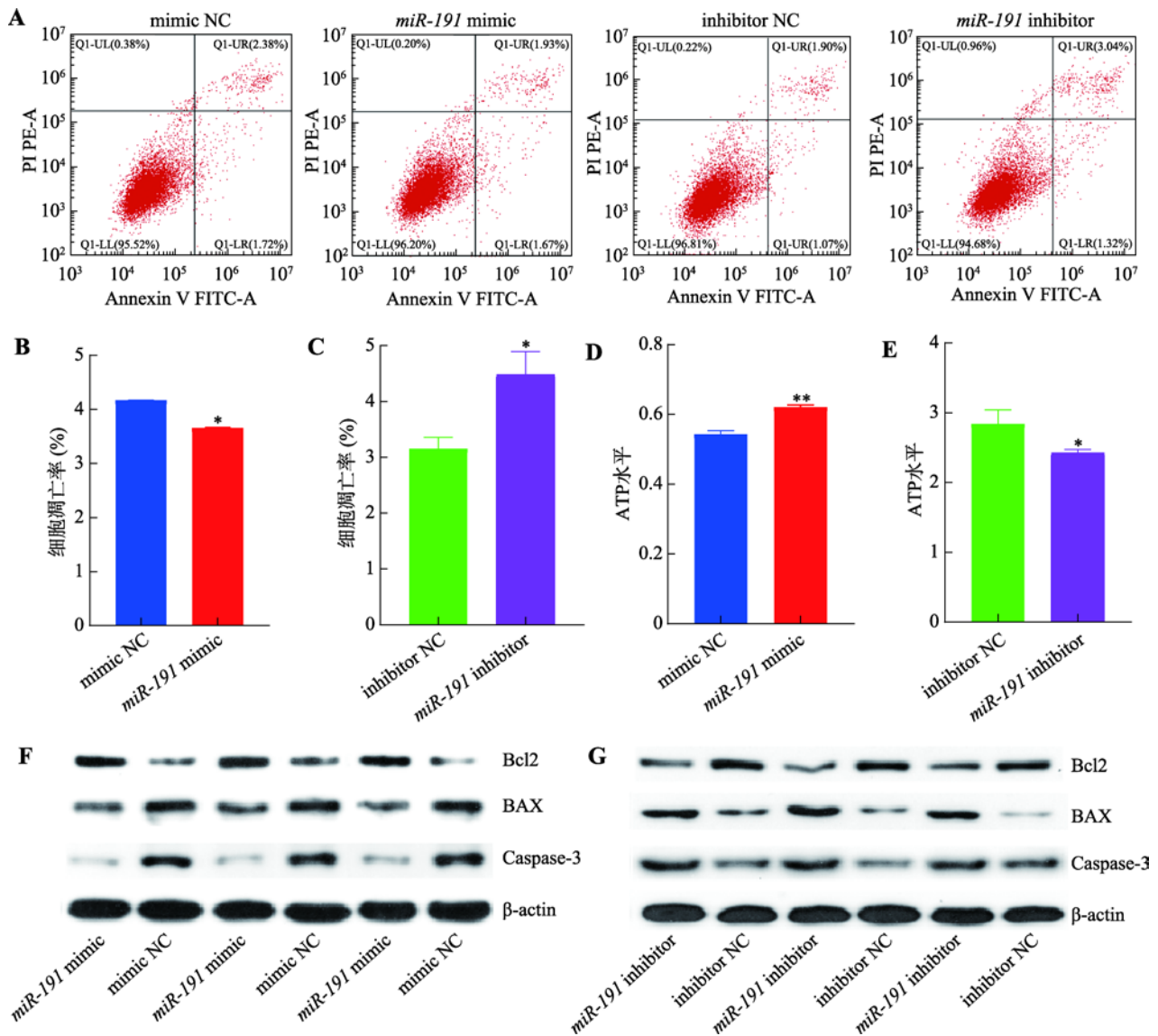


图 2 *miR-191* 抑制猪未成熟支持细胞凋亡

Fig. 2 *miR-191* impedes immature porcine Sertoli cell apoptosis

A: 转染 *miR-191* mimic、mimic NC、*miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; B: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, 细胞凋亡比例统计结果; C: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, 细胞凋亡比例统计结果; D: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, 细胞 ATP 水平; E: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, 细胞 ATP 水平; F: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, Western blotting 检测细胞凋亡标志基因 Bcl2、BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平; G: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, Western blotting 检测细胞凋亡标志基因 Bcl2、BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2.4 *BDNF* 基因抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡

为解析 *BDNF* 基因对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的影响, 针对 *BDNF* 基因序列设计了 *BDNF* siRNA 和 siRNA NC, 并转染至细胞。结果表明, 相较于对照组, 转染 *BDNF* siRNA 后, 处于  $G_1$  期和

$G_2$  期的细胞比例显著下降( $P < 0.05$ ),  $S$  期细胞比例极显著上升( $P < 0.01$ ) (图 4A), *c-MYC*、*CCND1* 和 *CDK4* 基因的表达水平显著增加( $P < 0.05$ ) (图 4B)。此外, 抑制 *BDNF* 基因的表达后, 细胞增殖相关基因 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 基因表达水平显著增加( $P < 0.05$ ) (图 4C); CCK-8 和 EdU 检测结果表明, 抑制 *BDNF* 基因极显著促进猪未成熟支持细胞增殖

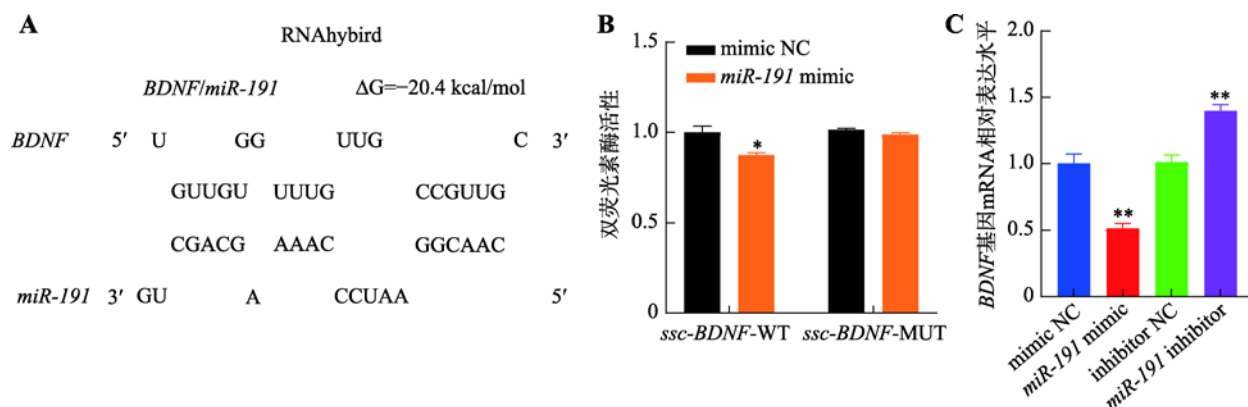


图3 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR

Fig. 3 *miR-191* targets the 3'-UTR region of the *BDNF* gene

A: *miR-191* 与 *BDNF* 基因 3'-UTR 的潜在结合位点; B: 共转染 *BDNF*-WT + mimic NC、*BDNF*-WT + *miR-191* mimic、*BDNF*-MUT + mimic NC 和 *BDNF*-MUT + *miR-191* mimic 后, 检测双荧光素酶活性; C: 转染 mimic NC、*miR-191* mimic、inhibitor NC 和 *miR-191* inhibitor, qRT-PCR 检测 *BDNF* 基因 mRNA 相对表达水平。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

( $P < 0.01$ ) (图 4: D, E 和 F)。细胞凋亡检测结果显示, 抑制 *BDNF* 基因的表达可极显著抑制细胞的凋亡率 ( $P < 0.01$ ) (图 5A), 促进 Bcl2 蛋白的表达而抑制 BAX 和 Caspase-3 蛋白的表达 (图 5B), 增加细胞 ATP 水平 (图 5C)。以上结果表明, 抑制表达 *BDNF* 基因促进猪未成熟支持细胞增殖而抑制其凋亡, 与过表达 *miR-191* 的结果一致。

## 2.5 *BDNF* 基因拮抗 *miR-191* 的调控作用

为进一步明确 *miR-191* 是否通过靶向 *BDNF* 进而调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡, 本研究将 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA、*miR-191* inhibitor + siRNA NC 和 inhibitor NC + siRNA NC 三组共转染于猪未成熟支持细胞。EdU 和 CCK-8 结果表明, 相较于 inhibitor NC + siRNA NC 对照组, *miR-191* inhibitor + siRNA NC 组的细胞增殖活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA 组的细胞增殖活性则极显著升高 ( $P < 0.01$ ) (图 6: A 和 B)。同时, 相较于 inhibitor NC + siRNA NC 对照组, *miR-191* inhibitor + siRNA NC 组的细胞增殖相关基因 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA 组的 *BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 基因表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 6C)。此外, 相比于 inhibitor NC + siRNA NC 对照组, *miR-191* inhibitor + siRNA NC 组的 Bcl2 蛋白表达水平降低且 BAX 和 Caspase-3 蛋

白表达水平增加, 而 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA 组的 Bcl2 蛋白表达水平升高且 BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低 (图 6D)。以上结果表明, 抑制表达 *BDNF* 基因可以拮抗 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的作用。

## 2.6 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR 激活 PI3K/AKT 信号通路

生物信息学分析结果表明, *miR-191* 和 *BDNF* 基因可能作用于 PI3K/AKT 信号通路, 因此, 采用 Western blotting 技术检测了二者对 PI3K/AKT 信号通路中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平。结果表明, 过表达 *miR-191* 极显著增加 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ) (图 7A), 而抑制表达 *miR-191* 极显著抑制 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ) (图 7B); 抑制表达 *BDNF* 基因极显著增加 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ) (图 7C), 与过表达 *miR-191* 一致; 同时, 相比于 inhibitor NC + siRNA NC 对照组, *miR-191* inhibitor + siRNA NC 组的 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA 组的 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的磷酸化水平则显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 7D)。以上结果表明, *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进猪未成熟支持细胞的增殖而抑制其凋亡。



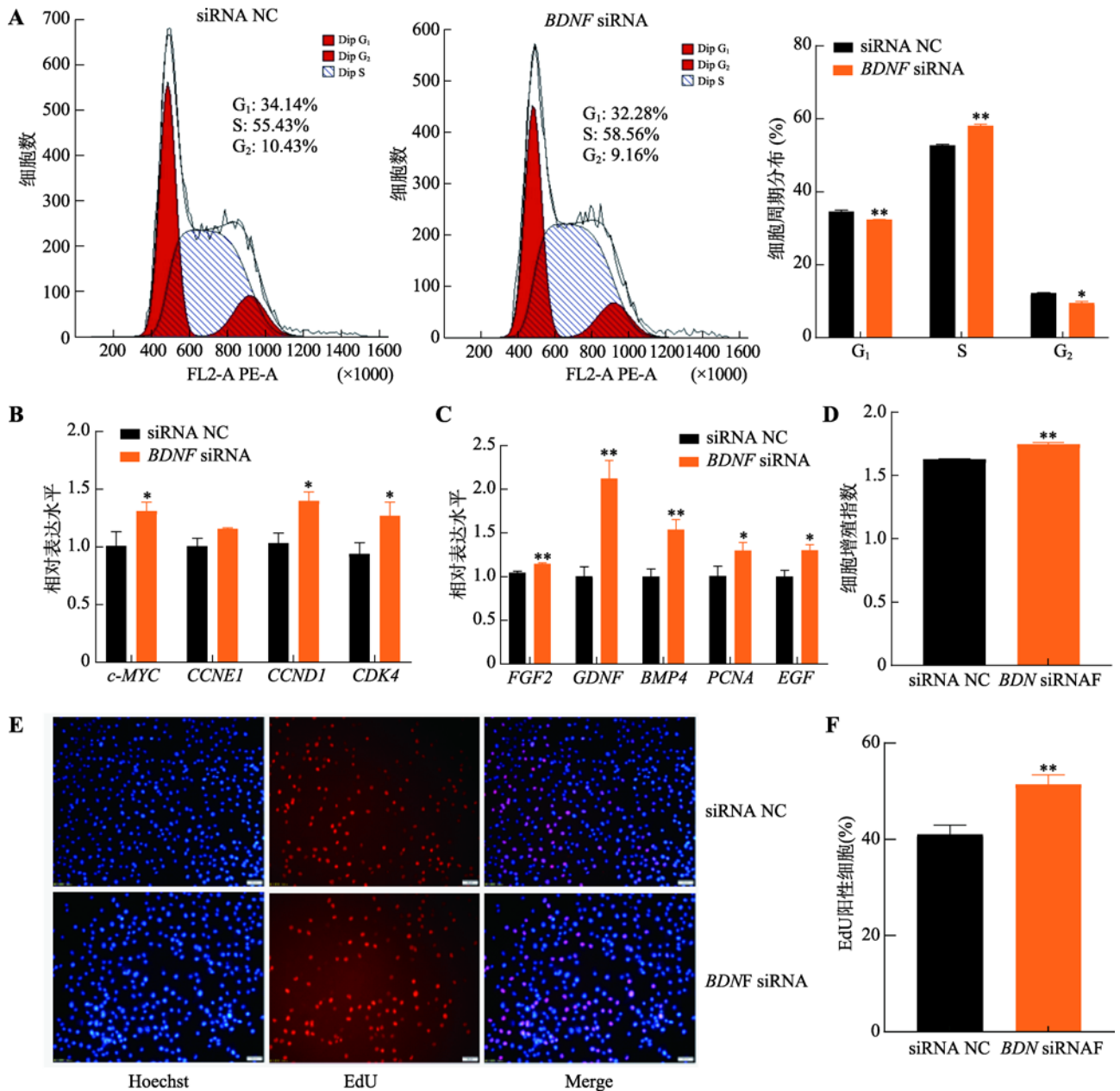


图 4 抑制表达 *BDNF* 基因促进猪未成熟支持细胞增殖

Fig. 4 *BDNF* inhibition promotes porcine immature Sertoli cell proliferation

A: 流式细胞术检测流式周期分布情况; B: qRT-PCR 检测周期相关基因 *c-MYC*、*CCNE1*、*CCND1* 和 *CDK4* 的 mRNA 相对表达水平; C: qRT-PCR 检测增殖相关基因 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 的 mRNA 相对表达水平; D: CCK-8 试剂检测细胞增殖指数; E: 细胞 EdU 实验染色图(蓝色细胞为 Hoechst 染色, 红色细胞为 EdU 染色, Merge 为 Hoechst 和 EdU 染色合并图, 标尺: 50  $\mu$ m); F: EdU 细胞染色统计结果。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

### 3 讨论

支持细胞数量是影响精子生成能力的主要因素, 而提高公猪的精子产量, 对实际生产中提高猪的生

产效率至关重要。但是, 目前关于支持细胞增殖的分子机制尚不清楚<sup>[20]</sup>。研究表明, miRNA 在发育过程中调控许多基因的表达, 且一些特异性的 miRNA 参与了未成熟支持细胞增殖的调控过程, 例如 *miR-130a*<sup>[15]</sup>、*miR-499*<sup>[10]</sup>、*miR-762*<sup>[8]</sup> 和 *miR-1285*<sup>[13]</sup>

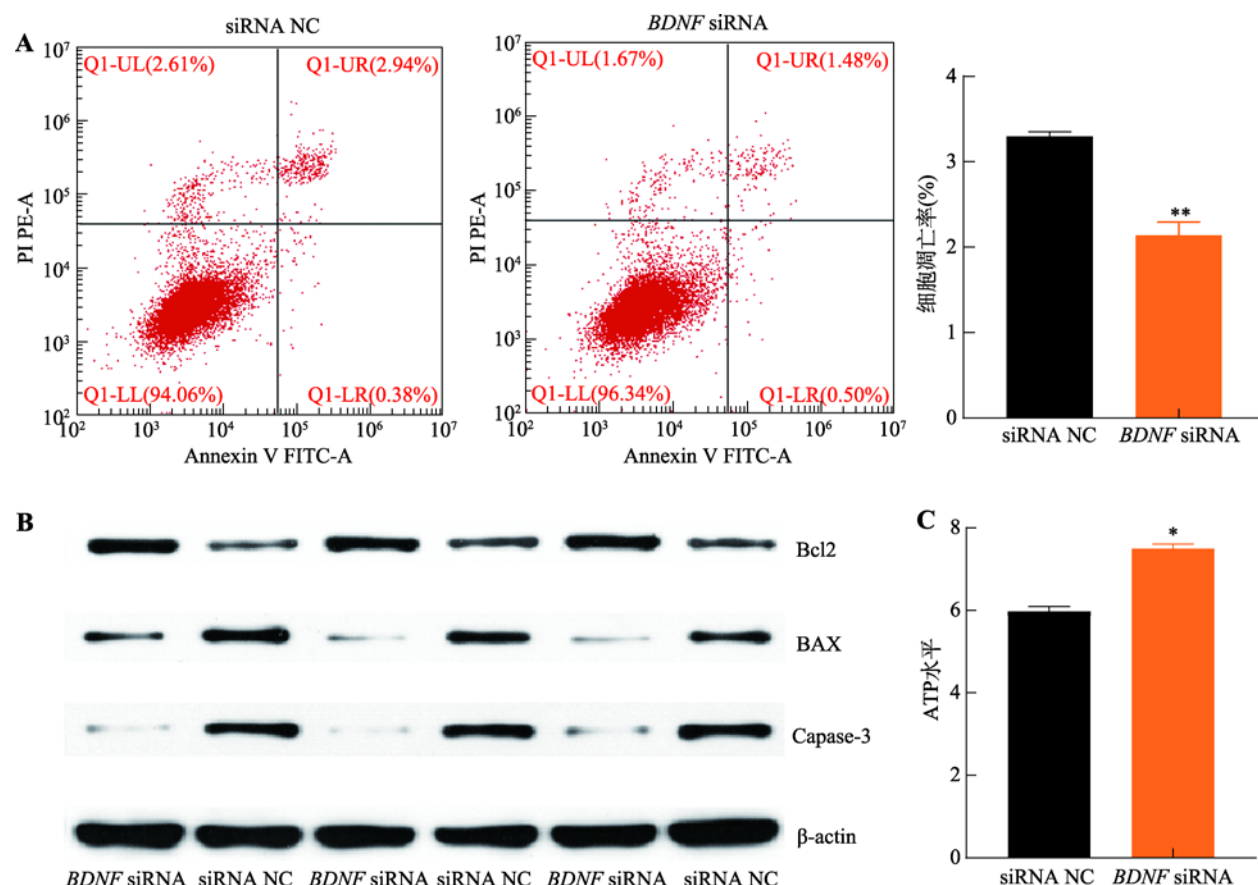


图5 抑制表达 *BDNF* 基因促进猪未成熟支持细胞凋亡

Fig. 5 *BDNF* knockdown inhibits porcine immature Sertoli cell apoptosis

A: 流式细胞仪检测不同凋亡期细胞分布及细胞数统计; B: Western blotting 检测细胞凋亡标志基因 Bcl2、BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平; C: 细胞内 ATP 水平检测。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

等。然而,分析表明,现有的关于 miRNA 调控猪未成熟支持细胞增殖的研究,还不足以解析其潜在的分子调控机制<sup>[21]</sup>。本课题组前期采用高内涵筛选技术鉴定出包括 *miR-191* 在内的 27 个 miRNA 具有促进猪未成熟支持细胞增殖的潜在作用,但其作用的特定分子信号途径有待进一步研究。目前,关于 *miR-191* 的研究主要集中于医学领域,例如,促进肝癌细胞<sup>[16]</sup>、食管鳞状细胞<sup>[17]</sup>和成纤维细胞<sup>[18]</sup>等的增殖,抑制胆管癌细胞<sup>[22]</sup>、乳腺癌细胞(MCF7 和 ZR-75)<sup>[23]</sup>和子宫内膜样癌细胞<sup>[24]</sup>等的凋亡。本研究综合采用流式细胞术、CCK-8、EdU 和 Western blotting 等方法在细胞水平明确了 *miR-191* 促进猪未成熟支持细胞增殖而抑制其凋亡,表明 *miR-191* 广泛参与调控细胞增殖和凋亡,并有可能是调控猪未成熟支持细胞的一个特异性分子。

miRNA 通常靶向结合蛋白编码基因 3'-UTR 以抑制其翻译过程。本研究采用 miRwalk、TargetScan 和 miRanda 软件预测 *miR-191* 的靶基因,并取结果的交集,再根据结合位点的保守性筛选出 *BDNF* 基因为其潜在靶基因。随后,通过双荧光素酶报告基因实验进一步证实 *miR-191* 直接靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR 的预测结合位点。但是,目前尚没有猪 *BDNF* 基因商业化蛋白抗体,导致无法在现有条件下进一步验证 *miR-191* 是否抑制了 *BDNF* 基因的蛋白翻译过程。但是,在成肌细胞和海马神经元细胞中已证实 *miR-191* 可以靶向 *BDNF* 基因并抑制其翻译过程<sup>[25-27]</sup>。基于 *miR-191* 与 *BDNF* 基因结合位点在物种间的高度保守性,因此我们推测 *miR-191* 在猪未成熟支持细胞中同样可以抑制 *BDNF* 基因的翻译过程。同时,本研究明确了抑制表达 *BDNF* 基因

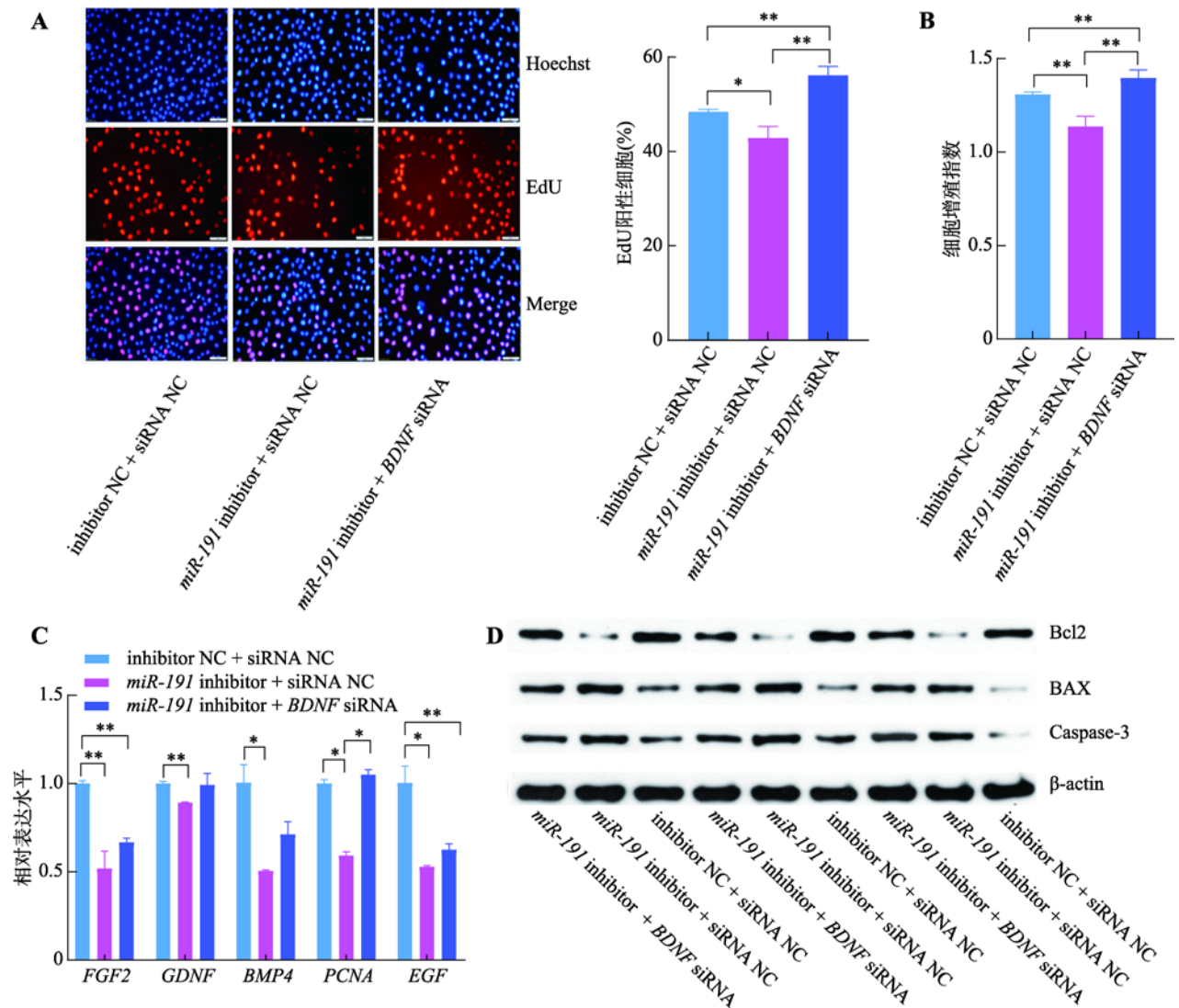


图 6 *BDNF* 基因拮抗 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的调控作用

Fig. 6 *BDNF* gene offsets the effects of *miR-191* on the proliferation and apoptosis of porcine immature Sertoli cells

A: 细胞 EdU 实验染色图(蓝色细胞为 Hoechst 染色, 红色细胞为 EdU 染色, Merge 为 Hoechst 和 EdU 染色合并图, 标尺: 50 μm); B: CCK-8 试剂检测细胞增殖指数; C: qRT-PCR 检测增殖相关基因 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 的 mRNA 相对表达水平; D: Western blotting 检测细胞凋亡标志基因 Bcl2、BAX 和 Caspase-3 蛋白表达水平。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

可促进猪未成熟支持细胞增殖并抑制细胞凋亡的, 其调控作用与过表达 *miR-191* 一致。在此基础上, 本文进一步设计了关于 *miR-191* 与 *BDNF* 基因的共转染试验, 结果表明 *BDNF* 基因可以拮抗 *miR-191* 对猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的调控作用。综上所述, 本文基本确定 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因 3'-UTR 并调控了其表达。

细胞周期是一个受多个因子调控的复杂过程, 主要参与生物的生长和发育, *c-MYC* 作为细胞进

中一个重要的调节因子, 活化后可以缩短  $G_1$  期的时间, 是从  $G_1$  期转化至 S 期必不可少的调节因子之一<sup>[28]</sup>, *c-MYC* 还可以通过活化细胞周期蛋白 *CCND1*、*CCNE1* 和 *CDK4* 而促进周期进程, 若抑制 *c-MYC* 的表达时, 细胞周期的  $G_1$  期向 S 期的转化将受到抑制, 进而抑制细胞周期进程<sup>[29]</sup>。本研究发现, 过表达 *miR-191* 和抑制表达 *BDNF* 基因后, 支持细胞由  $G_1$  期进入 S 期的比例均显著增加, 且 *c-MYC*、*CCND1*、*CCNE1* 和 *CDK4* 的表达水平显著增加。此外, 本研



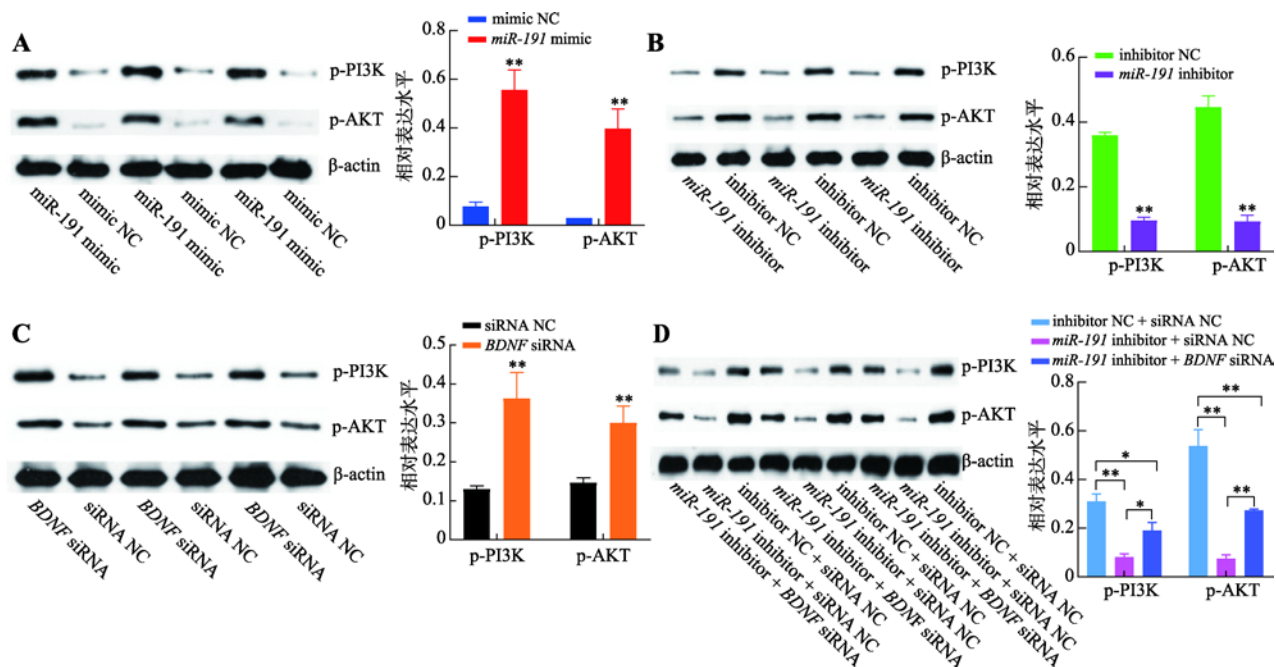


图7 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因激活 PI3K/AKT 信号

Fig. 7 *miR-191* activates PI3K/AKT signaling pathway by targeting the *BDNF* gene

A: 转染 *miR-191* mimic 和 mimic NC, Western blotting 检测 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白相对表达水平及结果分析; B: 转染 *miR-191* inhibitor 和 inhibitor NC, Western blotting 检测 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白相对表达水平及结果分析; C: 转染 *BDNF* siRNA 和 siRNA NC, Western blotting 检测 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白相对表达水平及结果分析; D: 共转染 inhibitor NC + siRNA NC、*miR-191* inhibitor + siRNA NC 和 *miR-191* inhibitor + *BDNF* siRNA, Western blotting 检测 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白相对表达水平及结果分析。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

究还发现, 过表达 *miR-191* 和抑制表达 *BDNF* 基因可显著增加 *FGF2*、*GDNF*、*BMP4*、*PCNA* 和 *EGF* 的表达水平。研究表明, 支持细胞本身表达以上细胞增殖相关基因, 且 *EGF* 和 *FGF2* 基因可通过激活 MAPK 信号通路促进细胞增殖<sup>[30]</sup>, *PCNA* 基因则可以通过调控细胞周期相关基因的表达促进细胞周期的进程以及促进 DNA 复制进而促进细胞增殖<sup>[31]</sup>, *BMP4* 基因则可以通过激活 *SMAD* 基因家族促进细胞增殖<sup>[32]</sup>。此外, 本研究采用 CCK-8 和 EdU 实验进一步证实 *miR-191* 和 *BDNF* 基因可以调控猪睾丸支持细胞增殖。

细胞凋亡是由内源性或外源性通路引起的细胞程序性死亡的过程, 多个基因参与到细胞凋亡调控过程中, 但 *Bcl2* 基因在整个过程起决定性作用, 细胞凋亡基因调控的方式分为促进细胞凋亡和抑制细胞凋亡两种<sup>[33]</sup>。*BAX* 是促细胞凋亡基因, *Bcl2* 是抑细胞凋亡基因, 二者都是通过激活下游基因以调节细胞凋亡。*Bcl2* 对各种因素引起的凋亡都有抑制作

用, 但 *BAX* 能与线粒体上的 *Bcl2* 结合从而促进细胞凋亡<sup>[34]</sup>。Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的一员, 是一类与细胞密切相关的蛋白水解酶, 通过自身活化或相互激活形成活性复合物引起瀑布式的级联反应, 导致细胞凋亡, 在整个过程中发挥着最后的枢纽作用<sup>[35]</sup>。本研究结果表明, 过表达 *miR-191* 和抑制表达 *BDNF* 基因后, 猪睾丸支持细胞中 *Bcl2* 蛋白表达水平增加, 而 *BAX* 和 *Capase-3* 蛋白表达水平降低, 且细胞 ATP 水平显著增加, 细胞凋亡率显著减少。

为进一步解析 *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因调控猪未成熟支持细胞增殖和凋亡的信号机制, 本文对 *miR-191* 所有的潜在靶基因进行了功能富集分析, 预测出 PI3K/AKT 信号通路为潜在路径。同时, 研究表明, *BDNF* 基因与 PI3K/AKT 信号通路之间具有调控关系。本研究结果表明, 过表达 *miR-191* 和抑制表达 *BDNF* 基因均可显著促进 PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平, 且 *BDNF*

基因同样拮抗 *miR-191* 对 PI3K 和 AKT 蛋白的调控作用。在我们的前期研究中发现, 740Y-P 激活剂诱导的 PI3K/AKT 信号通路激活显著促进猪未成熟支持细胞周期进程和细胞增殖, 而抑制细胞凋亡<sup>[15]</sup>, 且 LY294002 抑制剂诱导的 PI3K/AKT 信号通路激活则显著抑制猪未成熟支持细胞增殖而促进其凋亡<sup>[10]</sup>。此外, 甲状腺激素、促卵泡激素和邻苯二甲酸二丁酯等均可以通过抑制 PI3K/AKT 信号通路活性抑制支持细胞增殖而促进细胞凋亡<sup>[36-38]</sup>, 17 $\beta$ -雌二醇则通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进支持细胞增殖<sup>[39]</sup>。同时, *miR-638*<sup>[40]</sup>、*miR-499*<sup>[10]</sup>和 *miR-222*<sup>[41]</sup>等均被报道通过调节 PI3K/AKT 信号通路活性以调控支持细胞增殖和凋亡。因此, PI3K/AKT 信号通路的活性可能对于猪未成熟支持细胞的增殖和凋亡具有重要作用。综上所述, *miR-191* 靶向 *BDNF* 基因通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进猪未成熟支持细胞增殖而抑制其凋亡。

## 参考文献(References):

- [1] Franca LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 2016, 4(2): 189–212. [DOI]
- [2] Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, Pitetti JL, Nef S, Smith LB, O'Shaughnessy PJ. Sertoli cell number defines and predicts germ and leydig cell population sizes in the adult mouse testis. *Endocrinology*, 2017, 158(9): 2955–2969. [DOI]
- [3] Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Guillou F, RaméC, Nadal-Desbarats L, Foretz M, Viollet B, Dupont J, Froment P. Specific deletion of AMP-activated protein kinase ( $\alpha$ 1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 423: 96–112. [DOI]
- [4] Ran ML, Chen B, Wu MS, Liu XC, He CQ, Yang AQ, Li Z, Xiang YJ, Li ZH, Zhang SW. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in development of porcine testes. *Rsc Adv*, 2015, 5(78): 63439–63449. [DOI]
- [5] Ding HS, Liu M, Zhou CF, You XB, Su T, Yang YB, Xu DQ. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in testes of Duroc and Meishan boars. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 686. [DOI]
- [6] Luo ZY, Dai XL, Ran XQ, Cen YX, Niu X, Li S, Huang SH, Wang JF. Identification and profile of microRNAs in Xiang pig testes in four different ages detected by Solexa sequencing. *Theriogenology*, 2018, 117: 61–71. [DOI]
- [7] Chen XX, Zheng Y, Li XL, Gao Q, Feng TY, Zhang PF, Liao MZ, Tian XE, Lu HZ, Zeng WX. Profiling of miRNAs in porcine Sertoli cells. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11: 85. [DOI]
- [8] Ma CP, Song HB, Yu L, Guan KF, Hu PD, Li Y, Xia XY, Li JL, Jiang SW, Li FG. miR-762 promotes porcine immature Sertoli cell growth via the ring finger protein 4 (RNF4) gene. *Sci Rep*, 2016, 6: 32783. [DOI]
- [9] Zhang SX, Guo J, Liang MD, Qi JJ, Wang ZB, Jian XR, Zhang ZB, Sun BX, Li ZH. miR-196a promotes proliferation and inhibits apoptosis of immature porcine Sertoli cells. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(1): 41–48. [DOI]
- [10] Gao H, Ran ML, Luo H, Weng B, Tang XW, Chen Y, Yang AQ, Chen B. miR-499 promotes immature porcine Sertoli cell growth by the PI3K/AKT pathway by targeting the PTEN gene. *Reproduction*, 2019, 152(2): 145–157. [DOI]
- [11] Hu Y, Deng J, Tian K, Yang WR, Luo NJ, Lian Y, Gan L, Tang XY, Luo HY, Zhang JJ, Wang XZ. MiR-8-3p regulates hyperthermia-induced lactate secretion by targeting PPP2R5B in boar Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(11): 1720–1730. [DOI]
- [12] Guo J, Yang C, Zhang SX, Liang MD, Qi JJ, Wang ZB, Peng YH, Sun BX. MiR-375 induces ROS and apoptosis in ST cells by targeting the HIGD1A gene. *Gene*, 2019, 685: 136–142. [DOI]
- [13] Zhang JJ, Wang Y, Yang WR, Kee JD, Wang XZ. MicroRNA-1285 regulates 17 $\beta$ -estradiol-inhibited immature boar Sertoli cell proliferation via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 2015, 156(11): 4059–4070. [DOI]
- [14] Ran M, Li Z, Cao R, Weng B, Peng F, He C, Chen B. miR-26a suppresses autophagy in swine Sertoli cells by targeting ULK2. *Reprod Domest Anim*, 2018, 53(4): 864–871. [DOI]
- [15] Luo H, Chen B, Weng B, Tang XW, Chen Y, Yang AQ, Chu D, Zeng XY, Ran ML. miR-130a promotes immature porcine Sertoli cell growth by activating SMAD5 through the TGF- $\beta$ -PI3K/AKT signaling pathway. *FASEB J*, 2020, 34(11): 15164–15179. [DOI]
- [16] Tian F, Yu CT, Wu M, Wu XY, Wan LF, Zhu XJ. MicroRNA-191 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by has\_circ\_0000204/miR-191/KLF6 axis. *Cell Prolif*, 2019, 52(5): e12635. [DOI]
- [17] Gao XT, Xie ZQ, Wang ZG, Cheng KL, Liang K, Song ZQ. Overexpression of miR-191 predicts poor prognosis and promotes proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Yonsei Med J*, 2017, 58(6): 1101–1110. [DOI]



- [18] Polioudakis D, Abell NS, Iyer VR. MiR-191 regulates primary human fibroblast proliferation and directly targets multiple oncogenes. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126535. [DOI]
- [19] Ma CP, Song HB, Guan KF, Zhou JW, Xia XY, Li FG. Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(4): 427–433. [DOI]
- [20] Ni FD, Hao SL, Yang WX. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 541. [DOI]
- [21] Berger T, Nitta-Oda BJ. Sertoli cell proliferation in juvenile boars and microRNA. *Livest Sci*, 2020, 233: 103954. [DOI]
- [22] Kang PC, Leng KM, Liu YP, Liu Y, Xu Y, Qin W, Gao JJ, Wang ZD, Tai S, Zhong XY, Cui YF. miR-191 inhibition induces apoptosis through reactivating secreted frizzled-related protein-1 in cholangiocarcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5): 1933–1942. [DOI]
- [23] Sharma S, Nagpal N, Ghosh PC, Kulshreshtha R. P53-miR-191-SOX4 regulatory loop affects apoptosis in breast cancer. *RNA*, 2017, 23(8): 1237–1246. [DOI]
- [24] Tian XY, Xu LM, Wang P. MiR-191 inhibits TNF- $\alpha$  induced apoptosis of ovarian endometriosis and endometrioid carcinoma cells by targeting DAPK1. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4933–4942. [DOI]
- [25] Varendi K, Kumar A, Härma MA, Andressoo JO. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(22): 4443–4456. [DOI]
- [26] Li HX, Du MQ, Xu WM, Wang ZF. MiR-191 down-regulation protects against isoflurane-induced neurotoxicity through targeting BDNF. *Toxicol Mech Methods*, 2021, 31(5): 367–373. [DOI]
- [27] Mohammadipoor-Ghasemabad L, Sangtarash MH, Sheibani V, Sasan HA, Esmaeili-Mahani S. Hippocampal microRNA-191a-5p regulates BDNF expression and shows correlation with cognitive impairment induced by paradoxical sleep deprivation. *Neuroscience*, 2019, 414: 49–59. [DOI]
- [28] Trumpp A, Refaeli Y, Oskarsson T, Gasser S, Murphy M, Martin GR, Bishop JM. c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature*, 2001, 414(6865): 768–773. [DOI]
- [29] Ramana KV, Tammali R, Srivastava SK. Inhibition of aldose reductase prevents growth factor-induced G1-S phase transition through the AKT/phosphoinositide 3-kinase/E2F-1 pathway in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(4): 813–824. [DOI]
- [30] Blum Y, Mikelson J, Dobrzynski M, Ryu H, Jacques MA, Jeon NL, Khammash M, Pertz O. Temporal perturbation of ERK dynamics reveals network architecture of FGF2/MAPK signaling. *Mol Syst Biol*, 2019, 15(11): e8947. [DOI]
- [31] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127–1140. [DOI]
- [32] Duval N, Vaslin C, Barata TC, Frarma Y, Contremoulins V, Baudin X, Nedelec S, Ribes VC. BMP4 patterns Smad activity and generates stereotyped cell fate organization in spinal organoids. *Development*, 2019, 146(14): 175430. [DOI]
- [33] Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 206–215. [DOI]
- [34] Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KLB, Ding HS, Nowakowski GS, Dai HM, Kaufmann SH. Emerging understanding of Bcl-2 biology: implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1658–1671. [DOI]
- [35] Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Mosc)*, 2015, 80(11): 1393–1405. [DOI]
- [36] Riera MF, Regueira M, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorraga SB. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(8): E914–E923. [DOI]
- [37] Sun Y, Yang WR, Luo HL, Wang XZ, Chen ZQ, Zhang JJ, Wang Y, Li XM. Thyroid hormone inhibits the proliferation of piglet Sertoli cell via PI3K signaling pathway. *Theriogenology*, 2015, 83(1): 86–94. [DOI]
- [38] Wang C, Zheng P, Adeniran SO, Ma MJ, Huang FS, Adegoke EO, Zhang GX. Thyroid hormone (T3) is involved in inhibiting the proliferation of newborn calf Sertoli cells via the PI3K/Akt signaling pathway in vitro. *Theriogenology*, 2019, 133: 1–9. [DOI]
- [39] Yang WR, Zhu FW, Zhang JJ, Wang Y, Zhang JH, Lu C, Wang XZ. PI3K/Akt activated by GPR30 and Src regulates 17 $\beta$ -estradiol-induced cultured immature boar Sertoli cells proliferation. *Reprod Sci*, 2017, 24(1): 57–66. [DOI]
- [40] Hu PD, Guan KF, Feng Y, Ma CP, Song HB, Li Y, Xia XY, Li JL, Li FG. miR-638 inhibits immature Sertoli cell growth by indirectly inactivating PI3K/AKT pathway via SPAG1 gene. *Cell Cycle*, 2017, 16(23): 2290–2300. [DOI]
- [41] Luo H, Peng FZ, Weng B, Tang XW, Chen Y, Yang AQ, Chen B, Ran ML. miR-222 suppresses immature porcine Sertoli cell growth by targeting the GRB10 gene through inactivating the PI3K/AKT signaling pathway. *Front Genet*, 2020, 11: 581593. [DOI]