

## WDR12 对 GC-1 细胞增殖凋亡及核糖体蛋白基因表达的影响

郭兰华 娟

**摘要** 目的 探究敲低 WD 重复结构域 12(WDR12) 对小鼠精原细胞(GC-1)的影响。方法 利用脂质体转染法将针对 WDR12 的 shRNA 编码克隆(shWDR12)及阴性对照的 EGFP 质粒转染细胞后,Western blot 和 Q-PCR 检测细胞中 WDR12 表达量;CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况;TUNEL 试剂盒染色检测细胞凋亡情况;Q-PCR 检测细胞中核糖体蛋白基因的差异表达。结果 与转染阴性对照质粒的细胞相比,转染 shWDR12 的细胞检测结果显示成功降低了 GC-1 细胞中 WDR12 的表达( $P < 0.01$ );WDR12 敲低的 GC-1 细胞增殖被抑制;TUNEL 染色结果显示 WDR12 敲低后凋亡细胞数量增多;转染 shWDR12 后细胞内核糖体相关蛋白基因[核糖体蛋白 S3(RPS3) ( $P < 0.05$ )、核糖体蛋白 L11(RPL11) ( $P < 0.01$ )、核糖体蛋白 S15(RPS15) ( $P < 0.05$ ) 以及核糖体蛋白 L31(RPL31) ( $P > 0.05$ )]的表达量下降。结论 转染

shWDR12 能有效敲低 GC-1 细胞中 WDR12 的表达,WDR12 表达的降低导致 GC-1 细胞出现增殖能力下降、凋亡数量增多及核糖体相关蛋白基因表达下调。

**关键词** WDR12;小鼠精原细胞 GC-1;增殖;凋亡;核糖体  
中图分类号 R 321.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1875-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.006

据报道<sup>[1]</sup>,全球约 15% 的夫妇患有不孕不育,其中男性因素约占 30%~55%。精子发生是一系列基因参与的复杂生物学过程<sup>[2]</sup>。该课题组前期研究表明,WDR12 基因突变与 1 例近亲婚配家系锥形头部畸形精子症的男性患者有关。WDR12 是 WD 重复蛋白家族的成员,内源性 WDR12 在细胞的多个生物学过程中发挥作用,例如细胞分裂和增殖、细胞周期调控和核糖体生物发生<sup>[3]</sup>。核糖体是细胞内合成蛋白质的重要细胞器,目前,已经有研究<sup>[4]</sup>报道核糖体在精子发生过程中发挥重要作用。该研究利用 shWDR12 敲低小鼠精原细胞 GC-1 中 WDR12 的表达,观察 WDR12 对精原细胞增殖、凋亡及核糖体相关蛋白基因表达的影响。

2021-09-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82101685);安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划(编号:2020xkjT014)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:郭兰,女,硕士研究生;

华娟,女,校聘副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hjhuaJuan@163.com

## The antibacterial effect of photodynamic therapy on the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia*

Chen Chen<sup>1,2</sup>, He Jiakai<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Laboratory of Anhui Oral Disease Research Center, Hefei 230032)

**Abstract** **Objective** To study the antibacterial effect of a new photosensitizer NHS-BODIPY-Br on the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia* *in vitro*. **Methods** The biocompatibility of photosensitizer NHS-BODIPY-Br was detected by CCK8. *P. gingivalis* and *T. forsythia* were cultured in anaerobic condition (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) for 48 h to form a biofilm and then treated with antibacterial photodynamic therapy. The photosensitizer concentration was 5, 10, 15 mg/L and the laser intensity was 15 and 30 J/cm<sup>2</sup>. After treatment, bacterial activity, residual LPS and laser confocal analysis were performed to determine the optimal treatment combination. **Results** The reduction rate of bacterial biofilm was about 98% when the concentration of NHS-BODIPY-Br was 10 mg/L and the laser intensity was 15 J/cm<sup>2</sup>. **Conclusion** This study shows that the NHS-BODIPY-Br-mediated photodynamic therapy can effectively inhibit the biofilm of *P. gingivalis* and *T. forsythia*.

**Key words** antimicrobial photodynamic therapy; peri-implantitis; biofilm; lipopolysaccharide

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠精原细胞 GC-1 获赠于安徽医科大学组胚教研室。

1.1.2 Q-PCR 引物序列 应用于 Q-PCR 的相关引物序列(上游序列以 F 表示,下游序列以 R 表示),见表 1。

表 1 Q-PCR 引物序列

引物名称	引物序列
WDR12	F: CAAGAACACCCCTTGGTGACC R: GACCGCCAGACTCAACATCC
$\beta$ -actin	F: CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC R: ATGGAGCCACCGATCCACA
RPS3	F: GCTGAAGATGGCTACTCTGGAG R: CTGGACAACCTGCGGTCAACTCT
RPL11	F: GAGAGCGGAGACAGACTGACC R: GGATGCCAAAGGACCTGACAGT
RPS15	F: ACCTACCGTGGCGTAGACC R: ATGTCCCTCAGGTGAGTCTTC
RPL31	F: AGATGTGGCCATTGACACCAGG R: ACAGGCACGTAAGTTACCAGCG

1.1.3 试剂与抗体 DMEM 高糖培养液 (C11995500BT) 购自美国 Gibco 公司,胎牛血清 (04-001-4A) 购自以色列 BI 公司,青霉素和链霉素 (ST488)、吐温-20 (ST825)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (P0015)、预染蛋白质分子量标准 (P0078)、丽春红染色液 (P0022) 均购自上海碧云天生物技术有限公司,胰酶细胞消化液 (BL512A)、Puromycin (BS080A)、CCK-8 试剂盒 (BS350B) 均购自上海桥星贸易有限公司 (Biosharp),TRIzol 试剂 (15596026)、Lipofectamine 3000 转染试剂 (L3000015) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,RIPA 组织/细胞裂解液 (R0020)、PMSF (P8340) 均购自北京 Solarbio 公司,异丙醇 (80109218)、甲醇 (10014118)、甲醛 (10010018)、无水乙醇 (13015069)、三氯甲烷 (10006818)、二甲苯 (10023418) 等购自中国医药集团有限公司,TUNEL 试剂盒 (A112) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,逆转录试剂盒 (E047-01A)、SYBR Green qPCR SuperMix 试剂盒 (E168-01B) 购自北京安诺伦生物科技有限公司 (novoprotein)。shWDR12 质粒购自上海吉凯基因公司。WDR12 多克隆抗体 (PA5-57635) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。 $\beta$ -actin 抗体 (AF7018) 和山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 二抗 (S0001) 购自美国 Aff-

ity 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GC-1 细胞培养条件为:10% 胎牛血清 (FBS) + 1% 青霉素-链霉素双抗 + 高糖 DMEM 培养基,日常培养在恒温 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 浓度的细胞培养箱中。

1.2.2 细胞转染 转染前 1 d 将  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  个 GC-1 细胞均匀接种到 6 孔板中,使细胞密度在转染时达到 60% ~ 80%。转染前 30 min 取出细胞孔板,用 37 °C 预热的 PBS 洗 2 遍,加入 2 ml 无血清的 DMEM 饥饿;EP 管 1: 125  $\mu$ l DMEM + 3.75  $\mu$ l Lipofectamine 3000,指腹轻弹混匀;EP 管 2: 125  $\mu$ l DMEM + 2.5  $\mu$ g DNA + 5  $\mu$ l P3000,指腹轻弹混匀;各自静置 5 min,将管 1 的体系完全加入管 2 内混匀后室温静置 15 ~ 20 min,多位置轻轻滴加到饥饿的细胞中,在桌面上交叉晃动孔板使转染液均匀分布;转染 6 h 后更换为完全 DMEM 培养基,48 h 后开始添加已经确定好的嘌呤霉素浓度 (1  $\mu$ g/ml) 进行筛选,4 ~ 6 d 后收取细胞进行相关检测。将稳定转染的干扰组和对照组 GC-1 细胞分别命名为 shWDR12 组和 NC 组。

1.2.3 蛋白提取与 Western blot 实验 6 孔板每孔加入 160  $\mu$ l 新鲜配制的蛋白裂解液 (1 ml RIPA 裂解液 + 10  $\mu$ l PMSF),冰上充分裂解 30 min。按比例加入 40  $\mu$ l 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀,100 °C 煮沸 10 min,分装放于 -20 °C 冰箱保存。按说明书配制 SDS-PAGE 凝胶 (下层 12% 的分离胶,上层 5% 的浓缩胶),上样完成后,先 80 V 恒压电泳 40 min,再 120 V 恒压 1.5 h;转膜到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上进行电转 (冰上 150 mA 恒流转膜 2.5 h);5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后 TBST 洗 3 次;NC 膜于湿盒中室温孵育一抗 (WDR12 与  $\beta$ -actin 均 1 : 1 000 稀释) 1 h 后 4 °C 过夜,TBST 洗 3 次;湿盒中二抗 (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h 后洗 3 次;化学发光成像设备进行显影后保存图片。

1.2.4 RNA 提取、逆转录及 Q-PCR 实验 RNA 提取:6 孔板每孔加入 1 ml TRIzol 试剂,冰上放置 5 min 后转移到无酶 EP 管内,每管加入 200  $\mu$ l 三氯甲烷 (TRIzol : 三氯甲烷 = 5 : 1),剧烈混匀 15 s;冰上静置 2 ~ 3 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;将上层无色透明水相转移至新的无酶 EP 管;加入 500  $\mu$ l 异丙醇 (与吸出的上层水相等量),颠倒混匀,冰上静置 10 min;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后,底部出现白色沉淀,弃上清液;每管加 1 ml 75% 乙

醇(用预冷的 DEPC 水提前配制)轻轻旋转颠倒管壁进行洗涤,缓慢倒掉洗液;重复洗涤 1 次;4 °C、9 000 r/min 再次离心 5 min;将离心管倒扣在滤纸上 30 min,开盖使管壁内的乙醇充分挥发;加入 20 ~ 50  $\mu\text{l}$  DEPC 水充分混匀后使用 RNA 浓度测量仪 Nano-Drop 检测并调整 RNA 浓度(加 DEPC 水使终浓度为 500 ng/ $\mu\text{l}$ ), -20 °C 保存。

逆转录反应:① 去基因组 DNA 反应:模板 RNA 2  $\mu\text{l}$  gDNA purge 1  $\mu\text{l}$  无酶水 7  $\mu\text{l}$ ;总体积 10  $\mu\text{l}$  42 °C 孵育 5 min 结束后立即插入碎冰中;② 逆转录反应:上一步得到的反应体系 10  $\mu\text{l}$  2  $\times$  cDNA SuperMix 10  $\mu\text{l}$  轻轻混匀,点动离心 50 °C、15 min;③ 终止反应:75 °C、5 min, -20 °C 冰箱保存。

Q-PCR:先将引物加入 ddH<sub>2</sub>O 溶解使终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  然后按说明书配制体系。2  $\times$  SYBR Q-PCR SuperMix Plus: 10  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  Primer F: 1  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  Primer R: 1  $\mu\text{l}$  模板 cDNA(10 ng/ $\mu\text{l}$ ): 1  $\mu\text{l}$  RNase-free water: 7  $\mu\text{l}$ 。95 °C、1 min 95 °C、20 s, 60 °C、1 min 40 个循环; $\beta$ -actin 作为内参 采用相对定量的 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  计算方法分析目的基因表达的拷贝数倍变化情况。

**1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖** 转染及药筛后的细胞按照每孔 2 000 个接种到 96 孔板 48 h 后每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 2 h 后用酶联免疫检测仪上机检测 GC-1 细胞在 450 nm 处的吸光度值,重复 3 次以上实验。

**1.2.6 TUNEL-DAPI 双染色** 转染及药筛后的细胞在 24 孔板内进行细胞爬片,长满至 70% ~ 90% 时拿出进行实验:阻水笔固定爬片,1  $\times$  PBS 洗 2 遍;加 50 ~ 100  $\mu\text{l}$  4% 多聚甲醛 4 °C 放置 25 min 进行细胞固定后浸于 0.2% TritonX-100 溶液中,室温孵育 5 min 进行通透处理;1  $\times$  PBS 洗 2 ~ 3 次;加入 100  $\mu\text{l}$  1  $\times$  Equilibration Buffer 全部覆盖待检样本区域,室温平衡 10 ~ 30 min;平衡结束后,每个样本滴加新鲜配制的 50  $\mu\text{l}$  TdT 孵育缓冲液(34  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{l}$  5  $\times$  Equilibration Buffer, 5  $\mu\text{l}$  BrightGreen Labeling Mix, 1  $\mu\text{l}$  Recombinant TdT Enzyme);封口膜盖于样本上均匀分布试剂,湿盒内 37 °C 孵育 60 min;1  $\times$  PBS 洗 2 次;然后用 1  $\times$  PBS 新鲜配制 2  $\mu\text{g/ml}$  的 DAPI 溶液在黑暗中对样本进行复染,室温放置 5 min;1  $\times$  PBS 清洗 3 次;样本区域加入抗淬灭剂,湿润封片;荧光显微镜下分析样本,在不同波长处观察绿色(TUNEL)和蓝色荧光(DAPI)拍照保存。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据

统计与分析,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组之间比较采用 *t* 检验,GraphPad Prism 7.0 绘制统计图, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GC-1 细胞转染后 WDR12 的表达水平** 与阴性对照组(NC 组)相比,转染 shWDR12 后 GC-1 细胞中 WDR12 蛋白的表达水平明显降低( $t = 22.83$ ,  $P < 0.01$ ),见图 1A。Q-PCR 结果同样显示细胞内 WDR12 的 mRNA 表达水平降低( $t = 4.94$ ,  $P < 0.01$ ),见图 1B。

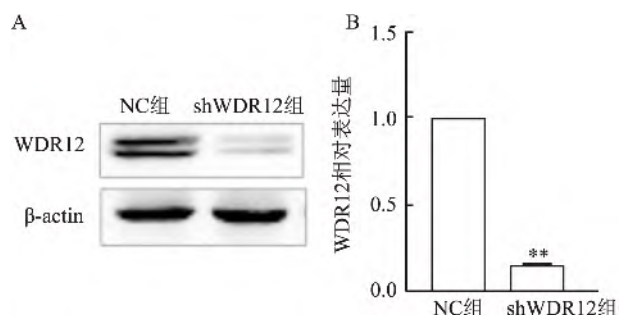


图 1 GC-1 细胞转染 shWDR12 后内源性 WDR12 的表达情况

A: GC-1 细胞转染 shWDR12 后 WDR12 的蛋白表达情况; B: GC-1 细胞转染 shWDR12 后 WDR12 的 mRNA 表达情况;与阴性对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.2 GC-1 细胞转染 shWDR12 后对细胞增殖的影响** 对转染及药筛后的细胞加入 CCK-8 2 h 后用酶联免疫检测仪检测细胞在 450 nm 处的吸光度变化情况,以此反映细胞的增殖速率,经统计显示 WDR12 敲低的细胞增殖能力低于 NC 组的细胞增殖能力,差异有统计学意义( $t = 21.77$ ,  $P < 0.01$ ),见图 2。

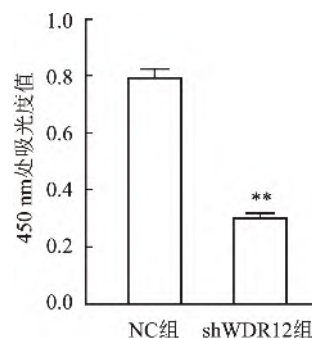


图 2 GC-1 细胞转染 shWDR12 后细胞的增殖情况

与阴性对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.3 GC-1 细胞转染 shWDR12 后对细胞凋亡的影响**

响 用 TUNEL-DAPI 双染色检测 NC 组和 shWDR12 组细胞的凋亡情况 ,DAPI 标记细胞核 ,TUNEL 标记凋亡细胞 ,Merge 为两种染色叠加后的效果 ,荧光显微镜下可以看到 ,shWDR12 组的凋亡细胞数量较 NC 组多( 图 3)。

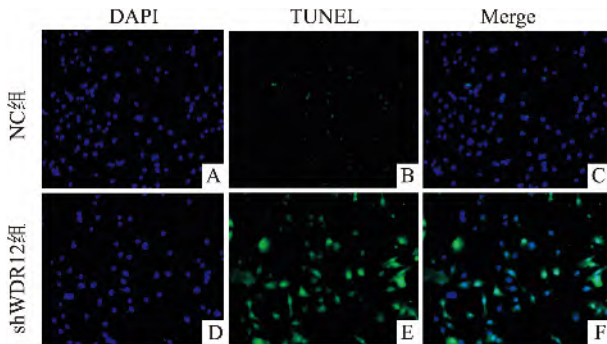


图 3 GC-1 细胞转染 shWDR12 后细胞的凋亡情况 ×200

A、B、C: 转染 NC 质粒组; D、E、F: 转染 shWDR12 质粒组; TUNEL: 荧光显微镜下显示凋亡的细胞; DAPI: 显示染色的细胞核; Merge: 叠加效果

2.4 GC-1 细胞转染 shWDR12 后对核糖体蛋白基因的影响 利用 Q-PCR 分析了敲低 WDR12 后核糖体蛋白基因的表达情况 ,结果显示 RPS3(  $t = 31.35$  ,  $P < 0.05$  )、RPL11(  $t = 21.47$  ,  $P < 0.01$  )、RPS15(  $t = 16.03$  ,  $P < 0.05$  )的 mRNA 表达量下降 ,差异有统计学意义 ,而 RPL31(  $t = 2.3$  ,  $P > 0.05$  )的 mRNA 水平与 NC 组相比差异无统计学意义 ,见图 4。

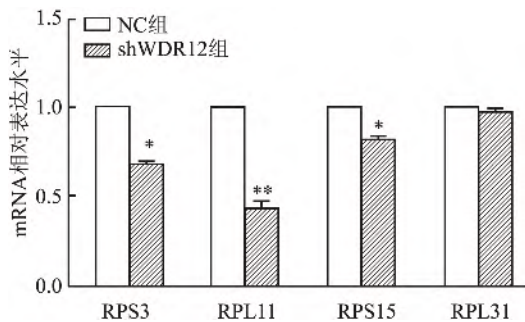


图 4 GC-1 细胞转染 shWDR12 后细胞内的核糖体蛋白基因表达情况 与阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

在哺乳动物中 ,WDR12 与核糖体生物发生因子 1( Pes1) 和增殖阻断蛋白 1( Bop1) 共同组成 1 个名为 PeBoW 的稳定复合物 ,该复合物对于哺乳动物细胞的增殖和大核糖体亚单位的成熟至关重要<sup>[5]</sup>。作为 PeBoW 的成员 ,WDR12 在 32S 前体 rRNA 加

工、细胞周期进程、细胞凋亡和细胞增殖中发挥着关键作用<sup>[6]</sup> ,而其中最重要的是对于核糖体生物发生的影响。研究<sup>[3]</sup>显示 WDR12 是 32S 前体核糖体 RNA 加工和细胞增殖的必需因子 ,WDR12 的 N 端或 C 端截短可以阻止 32S 前 rRNA 加工为成熟的 28S rRNA ,并触发依赖于 p53 的细胞周期阻滞 ,从而使细胞正常功能的发挥出现损害甚至缺失。

该研究前期通过对 1 名来自近亲家族的不育男性病例及相关家系进行分析 ,鉴定了一个 WDR12 基因的纯合错义突变( p. Ser162Ala/c. 484T > G) ,经研究表明该突变是导致患者出现重度畸形精子症的重要原因。WDR12 在睾丸组织中高表达 ,为了进一步了解 WDR12 在精子发生过程中的作用 ,该研究使用脂质体转染方法对来自小鼠的精原细胞系 GC-1 细胞进行了 WDR12 的敲低 ,根据细胞的一些行为学差异表现来探究 WDR12 的功能。研究结果表明转染 shWDR12 后细胞的内源性 WDR12 表达水平显著降低。进一步的生物学分析显示 ,转染 shWDR12 后 GC-1 细胞的增殖能力减弱 ,这与前期的研究<sup>[7]</sup>结果一致。同时在敲低 WDR12 的小鼠精原细胞中观察到 RPS3、RPL11 和 RPS15 这 3 个核糖体蛋白基因的表达量下降 ,核糖体是催化蛋白质合成的细胞器 ,由 1 个小的 40S 亚基和 1 个大的 60S 亚基组成 ,RPS3、RPS15 编码的核糖体蛋白是 40S 亚基的 1 个组成部分 ,RPL11 编码的核糖体蛋白是 60S 亚基的组成部分 ,提示了 WDR12 可能是通过降低核糖体亚基生成的途径影响核糖体的生物发生过程 ,但其具体机制还有待进一步研究。

已有研究报道核糖体功能与男性不育之间息息相关。如 Zhang et al<sup>[8]</sup>系统地分析了畸形精子症患者的基因表达谱 ,并发现了畸形精子症患者中下调的基因。其中一些下调的基因就是核糖体蛋白基因 ,如核糖体蛋白 S3( RPS3) 、RPS5、RPS6、RPS16 和 RPS23。Rpl10l 是小鼠生精细胞中的一种核糖体成分 ,参与核糖体的组装。Rpl10l 缺陷的雄性小鼠精子发生障碍并且完全不育 ,具体表现为绝大多数精母细胞发育停滞在减数第一次分裂前期向中期的转换 ,没有减数分裂后的生殖细胞产生<sup>[9]</sup>。且 Rpl10l 缺失后粗线期及双线期精母细胞中的核糖体生成减弱并且大量蛋白的含量发生变化。此外 ,利用全外显子测序( WES) 的方法在 3 例男性不育患者中发现了 Rpl10l 突变<sup>[4]</sup>。WDR12 是核糖体生物发生所必需的关键蛋白 ,目前对 WDR12 功能的相关研究主要集中在心肌细胞和肿瘤细胞中<sup>[6, 10-11]</sup> ,而在男

性不育患者中未见相关 WDR12 基因功能的研究。该研究通过干扰 GC-1 细胞中 WDR12 的表达,观察 WDR12 对 GC-1 增殖、凋亡以及核糖体蛋白基因表达的影响,进一步揭示了 WDR12 在精子发生过程中的可能作用,为临床上鉴定不育男性的致病基因提供了新的参考。

### 参考文献

- [1] Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility [J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(6): 369–84.
- [2] Hitoshi N, Steven W L H. Spermatogenesis [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(18): R979–1001.
- [3] Moilanen A, Rysä J, Kaikkonen L, et al. WDR12, a member of nucleolar PeBoW-complex, is up-regulated in failing hearts and causes deterioration of cardiac function [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e124907.
- [4] Tu C, Meng L, Nie H, et al. A homozygous RPL10L missense mutation associated with male factor infertility and severe oligozoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(3): 561–8.
- [5] Holzel M, Rohmoser M, Schlee M, et al. Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(3): 367–78.
- [6] Rohmoser M, Holzel M, Grimm T, et al. Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(10): 3682–94.
- [7] Yin Y, Zhou L, Zhan R, et al. Identification of WDR12 as a novel oncogene involved in hepatocellular carcinoma propagation [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 27(10): 3985–93.
- [8] Zhang T, Wu J, Liao C, et al. System analysis of teratozoospermia mRNA profile based on integrated bioinformatics tools [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1297–304.
- [9] Jiang L, Li T, Zhang X, et al. RPL10L is required for male meiotic division by compensating for RPL10 during meiotic sex chromosome inactivation in Mice [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(10): 1498–505.
- [10] Li J L, Chen C, Chen W, et al. Integrative genomic analyses identify WDR12 as a novel oncogene involved in glioblastoma [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 7344–55.
- [11] Piryaei M, Ghaderian S M H, Vakili H, et al. Analysis of rs6725887 in the WD Repeat Protein 12 in association with coronary artery disease in Iranian patients [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2015, 4(3): 160–6.

## Effect of WDR12 on GC-1 cell proliferation and apoptosis and ribosomal protein gene expression

Guo Lan, Hua Juan

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effect of knocking down WD repeat domain 12 (WDR12) on mouse spermatogonial cells (GC-1). **Methods** After transfecting cells with shWDR12 and negative control EGFP plasmids by liposome transfection, Western blot and Q-PCR were used to detect the expression of WDR12 in the cells; CCK-8 kit detected cell proliferation; TUNEL kit stains detected cell apoptosis; Q-PCR detected the differential expression of ribosomal protein genes in cells. **Results** Compared with the cells transfected with the negative control plasmid, the detection results of the cells transfected with shWDR12 showed that the expression of WDR12 in GC-1 cells was successfully reduced ( $P < 0.01$ ); the proliferation of GC-1 cells knocked down by WDR12 was inhibited; the results of TUNEL staining showed that the number of apoptotic cells increased after WDR12 knockdown; the expression of ribosomal protein genes decreased after shWDR12 transfection, ribosomal protein S3 (RPS3) ( $P < 0.05$ ), ribosomal protein L11 (RPL11) ( $P < 0.01$ ), ribosomal protein S15 (RPS15) ( $P < 0.05$ ), and ribosomal protein L31 (RPL31) ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Transfection of shWDR12 can effectively knock down the expression of WDR12 in GC-1 cells. The decrease of WDR12 expression leads to a decrease in the proliferation ability of GC-1 cells, an increase of apoptosis and the down-regulation of ribosomal-related protein gene expression.

**Key words** WDR12; mouse spermatogonial cells GC-1; proliferation; apoptosis; ribosome