

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.024.html>

生长分化因子-9下调对小鼠卵巢颗粒细胞增殖能力的影响

马会明, 张永芳, 王蒙蒙, 李昀伽, 蒲静, 于佳, 王燕蓉, 裴秀英, 徐仙

摘要 目的 探讨生长分化因子-9(GDF9)对小鼠卵巢颗粒细胞增殖能力基因周期蛋白A(cyclin A)、周期蛋白D1(cyclin D1)和周期蛋白依赖性激酶抑制因子27(p27kip1)表达的影响。方法 利用CCK-8检测法检测细胞的增殖能力;使用流式细胞术、Real-time PCR和Western blot法验证GDF9 siRNA的干扰效率;采用Real-time PCR和Western blot法检测细胞增殖cyclin A、cyclin D1和p27kip1 mRNA和蛋白表达情况。结果 GDF9 siRNA显著抑制颗粒细胞增殖活力,其中72 h抑制最明显($P < 0.05$);Real-time PCR和Western blot法检测结果显示GDF9 siRNA显著下调小鼠卵巢颗粒细胞中GDF9 mRNA及蛋白的表达($P < 0.01$);Real-time PCR法检测结果显示,细胞cyclin A、cyclin D1 mRNA表达降低,p27kip1 mRNA表达增强;Western blot法结果显示,GDF9 siRNA可促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27kip1的表达,同时下调G2/M期调控蛋白cyclin A、cyclin D1的表达。结论 靶向抑制小鼠卵巢颗粒细胞中GDF9的表达,下调细胞cyclin A、cyclin D1的表达,上调P27kip1的表达,显著抑制细胞的增殖。

关键词 GDF9 siRNA; 细胞增殖; 细胞周期; 卵巢颗粒细胞; 小鼠

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0051-05

女性卵巢储备功能减退原因可能与颗粒细胞一

2015-09-30 接收

基金项目 宁夏自然科学基金(编号: NZ11128)

作者单位 宁夏医科大学生殖力保持教育部重点实验室、宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室、人体解剖与组织胚胎学系,宁夏医科大学总医院生殖医学中心,银川 750004

作者简介 马会明,男,讲师,博士;

裴秀英,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: peixiuying@163.com;

徐仙,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xux36@163.com

系列重要的信号分子和周期蛋白调控有关^[1-3],细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)抑制剂在调控细胞周期转换过程中具有重要作用^[4],其中细胞周期D1(cyclin D1)和细胞周期A(cyclin A)的首要功能主要是促进细胞增殖^[5]。CDK抑制蛋白p27(p27kip1)是一种CDK抑制剂,通过抑制cyclin D/CDK4、cyclin E/CDK2的活性,从而抑制细胞增殖活性^[6-8],使细胞失去分裂能力。在卵母细胞的成熟过程中GDF9作为一个旁分泌因子参与调节卵丘颗粒细胞扩展的过程^[9]。该研究通过GDF9基因沉默对小鼠颗粒细胞中cyclin D1、cyclin A和p27kip1表达的检测,旨在探讨小鼠颗粒细胞周期调控蛋白在细胞增殖分化机制中的作用,为卵母细胞发育机制提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 逆转录试剂盒和荧光定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)试剂盒均购自日本TaKaRa公司;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)试剂盒、TRIzol、DMEM/F12(1:1)、I型胶原酶、胎牛血清均购自美国Life Tech公司;兔来源cyclin A、cyclin D1及p27kip1单克隆抗体购自英国Abcam公司;β-actin兔单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;羊抗兔二抗及ECL化学发光试剂盒购自中国博士德生物公司;蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物试剂公司;重组pcDNA 6.2-GDF9 siRNA(简称GDF9 siRNA)质粒、siRNA转染专用试剂HiPerFect购自美国Qiagen公司;680型酶标仪购自美国Bio-rad仪器公司;FACSCalibur型流式细胞仪购自美国BD公司;普通PCR仪和GelDoc XR System凝胶成像系统

occurred in the late stage of apoptosis. The expression levels of Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 were not altered after exposure to TRAIL. Transfection with Mcl-1 siRNA could obviously downregulate the expression level of Mcl-1 in HGC-27 cells and enhanced the sensitivity of cells to TRAIL-induced apoptosis. **Conclusion** Overexpression of Mcl-1 may account for the resistance of HGC-27 cells to TRAIL. Downregulation of Mcl-1 by siRNA can effectively enhance the sensitivity of HGC-27 cells to TRAIL-induced apoptosis.

Key words gastric cancer; apoptosis; siRNA; Mcl-1

购自美国 Bio-rad 仪器公司; Real-time PCR 仪购自美国 ABI 公司; BX51 荧光倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

1.2 小鼠卵泡颗粒细胞的获得 取 18 ~ 22 g 未成熟的雌性 Bal 小鼠 30 只(宁夏医科大学实验动物中心),按照常规方法^[8] 每只腹腔注射孕马血清(PMSG) 5 IU,注射 42 h 后在无菌条件下迅速剖取卵巢放入无菌的 PBS 中,去除卵巢周围组织及表面包膜,PBS 清洗后置于 TCM199-Hepes 培养基中。用不锈钢针刺破卵巢表面的 3 ~ 8 mm 卵泡,使颗粒细胞释放于 TCM199-Hepes 培养基中。1 000 r/min 低速离心 5 min,洗涤 2 次。将生长培养基 TCM199 (含 100 IU/ml 双抗、10% FBS、10 ng/ml EGF) 加入细胞团并制成单细胞悬液。将细胞接种在 6 孔培养板中,在 5% CO₂、37.5 °C 条件下孵育 24 h。镜下观察是否污染及细胞的生长情况,去除未贴壁细胞。此后隔日换液 1 次。所有动物实验均遵循实验动物的伦理要求和实验动物管理条例。

1.3 颗粒细胞转染及最适条件确定 小鼠颗粒细胞贴壁 24 h 后,开始转染,按照质粒 GDF9 siRNA DNA 量和 HiPerFect 量为 1.5 μg 和 12 μg 设计实验;每组设置 3 个复孔,转染后 48 h 换生长培养基 TCM199。在荧光显微镜下观察转染情况,用 PBS 充分洗涤去除漂浮的死细胞,用流式细胞仪分析转染率,确定最佳转染时间。转染率(%) = 绿色荧光细胞/细胞总数 × 100%。转染设计分为空质粒 siRNA control 组和 blank control 组及 GDF9 siRNA 组。

1.4 小鼠颗粒细胞增殖情况的确定 按照常规方法^[8] 将分离纯化的小鼠颗粒细胞接种至 96 孔培养板,使每孔细胞密度为 1×10^4 个,按照实验设计,每组设 3 个平行孔,并设不含细胞的空白对照,37 °C 培养 24 h 使细胞贴壁。然后根据上述方法开始转染 GDF9 siRNA 及对照 siRNA,转染 48 h 后,按照 CCK-8 试剂盒使用说明每孔加入 10 μl CCK-8 试剂,继续培养 4 h,检测波长为 450 nm 下的光密度(optical density, OD) 值。

1.5 反转录 PCR(RT-PCR) 和 Real-time PCR 法检测转染细胞中 mRNA 的表达 细胞转染后 48 h,清洗、消化细胞后按照常规方法(9) 分别提取总 RNA,并用 Oligo(dT) 反转录得到 cDNA。利用 GDF9、cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 mRNA 特异性引物(表 1),扩增特异性条带。RT-PCR 扩增反应结束后用 2% 的琼脂糖凝胶检测扩增的条带大小; Real-time PCR 反应以 β-actin mRNA 的表达作为内参,

每组平行试验重复 3 次,计算基因的相对表达量并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示,各组的 Ct 值均经 β-actin 校正,以正常组的表达作为 100%。

1.6 Western blot 法检测转染细胞中蛋白表达 细胞转染后 48 h,清洗、消化细胞并裂解细胞全蛋白,按照常规方法^[8] 用 BCA 法测定浓度并定量,取 50 μg 蛋白样品按照常规方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并湿转移至 PVDF 膜上,封闭液封闭后,分别加入一抗 cyclinA、cyclinD1 和 p27kip1 (1 000 : 1),4 °C 孵育过夜;漂洗后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(2 000 : 1),37 °C 室温孵育 1 h,增强化学发光显色系统 ECL 显色,曝光。以 β-actin 作为等量蛋白质上样对照,每个样本至少重复 3 遍,曝光图片经 GelDoc XR System 凝胶成像系统扫描后,计算条带的吸光度,cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 蛋白相对表达采用与 β-actin 吸光度比值来表示。

表 1 Real-time PCR 相关基因的引物序列及参数

名称	序列号	序列(5'-3')	产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
GDF9	NM_008110.2	F: GATGCTGGACCTGCTGTTTA R: ATGGCCTCCTTTACCAACAG	144	59
cyclin A	NM_009828.2	F: GGGCACCTCGAGGCATTC R: CCTATTACCCGTCGAGTCTTGAG	156	60
cyclin D1	NM_007631.2	F: CCTGGATGCTGGAGGCTCTG R: AGGGTGGGTGGAAATGAAC	172	58
p27 kip1	U09968.1	F: AGCCTACGCTCCGACTGTTTG R: CCTCCTGCCACTCGTATCTGC	128	58
β-actin	NM_007393.3	F: AGAGGGAAATCGTCGCTGAC R: CCACAGGATTCCATACCCAAG	205	60

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对实验结果进行单因素方差分析或 LSD 多重比较。

2 结果

2.1 GDF9 siRNA 对小鼠卵巢颗粒细胞干扰后干扰效率的检测 分离纯化的小鼠卵巢颗粒细胞用 GDF9 siRNA 和无关序列 siRNA control 分别转染细胞,48 h 后更换为正常培养基 TCM199,荧光显微镜下观察(图 1A),经流式细胞仪分析 GDF9 siRNA 和 siRNA control 两组细胞,约有 70% 以上卵巢颗粒细胞已经表达绿色荧光蛋白(图 1B、1C),能满足后续表达调控分析的要求。GDF9 siRNA 和 siRNA control 转染细胞 48 h 后,提取总 RNA,反转录后采用 Real-time PCR 检测 GDF9 mRNA 的表达。结果表明,GDF9 siRNA 转染细胞 GDF9 mRNA 表达显著下

调($F = 33.058, P < 0.05$), siRNA control 转染细胞 GDF9 mRNA 表达没有显著变化(图 1D)。

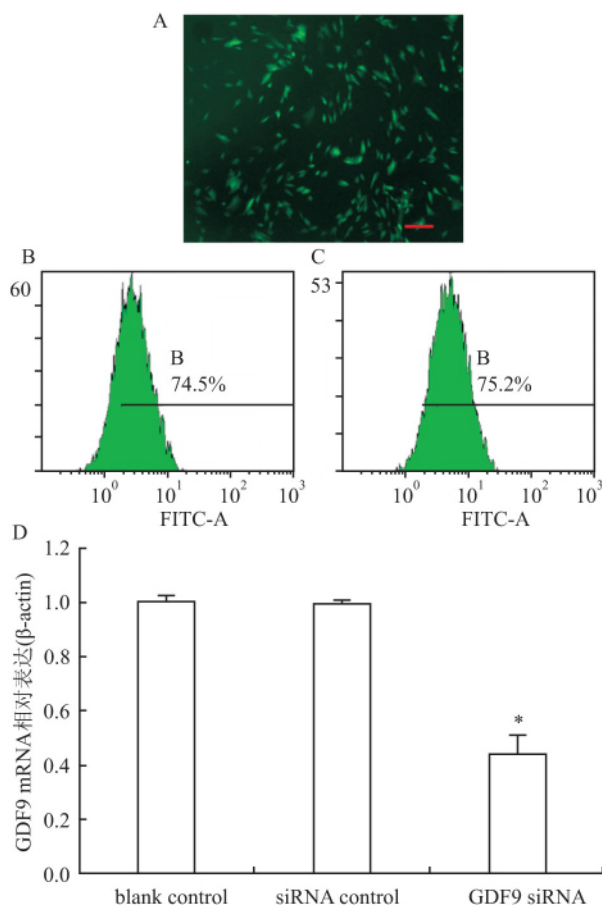


图1 GDF9 siRNA 转染颗粒细胞转染效率分析

A: 颗粒细胞原代转染 $\times 100$; B: siRNA control 转染效率; C: GDF9 siRNA 转染效率; D: GDF9 转染后基因沉默检测; 与 siRNA control 和 blank control 比较: * $P < 0.05$

2.2 siRNA 干扰颗粒细胞 GDF9 基因表达对细胞增殖的影响 颗粒细胞转染后,显微镜下观察发现 GDF9 siRNA 颗粒细胞开始表现为细胞轮廓稍有萎缩,细胞漂浮物变多。CCK-8 法检测结果显示: siRNA control 与 blank control 相比, siRNA control 转染后 48 h 的 OD 值降低, GDF9 siRNA 与 siRNA control 和 blank control 组之间差异有统计学意义($F = 5.321, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 siRNA 干扰颗粒细胞 GDF9 对 cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 mRNA 表达的影响 GDF9 siRNA 转染细胞后, RT-PCR 分别扩增出特异性 cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 片段,琼脂糖凝胶电泳结果如图 3A,扩增的条带大小与理论片段大小一致; Real-time PCR 分析检测 cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1

基因表达情况(图 3B)。siRNA control 与 blank control 组相比较, cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 基因表达无显著性差异。干扰 GDF9 后 p27kip1 的 mRNA 表达量显著上升($F = 259.165, P < 0.05$); 干扰 GDF9 后 cyclin D1 的 mRNA 表达显著下降($F = 17.224, P < 0.05$); cyclin A 的 mRNA 表达量降低,但没有显著性变化。

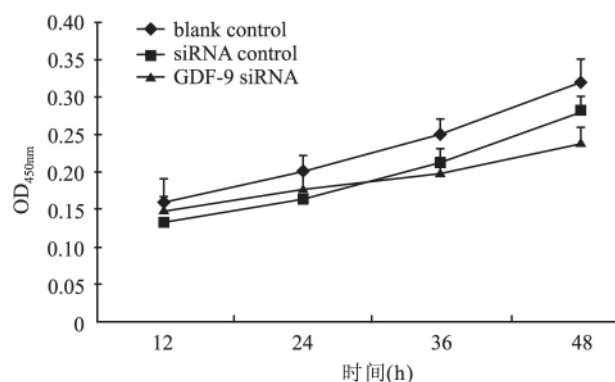


图2 CCK-8 法检测 GDF9 siRNA 对细胞增殖的影响

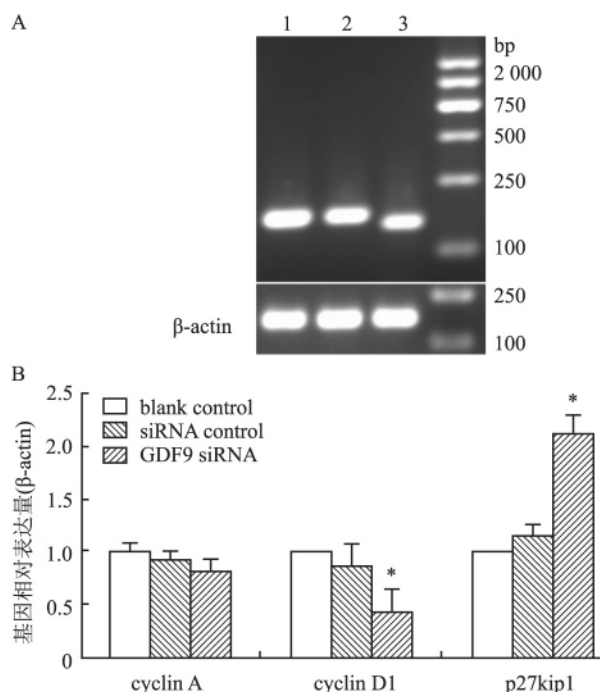


图3 GDF9 siRNA 对 p27 kip1、cyclin D1 及 cyclin A mRNA 表达的影响

A: 琼脂糖凝胶电泳扩增结果; B: Real-time PCR 分析结果; 1: cyclin A; 2: cyclin D1; 3: p27kip1; 与 blank control 组比较: * $P < 0.05$

2.4 siRNA 干扰颗粒细胞 GDF9 对 cyclin A、cyclin D1 和 p27kip1 蛋白表达的影响 Western blot 检测显示,干扰 GDF9 后,可显著增加 p27kip1 蛋白的

表达($F = 123.564, P < 0.05$), cyclin D1 蛋白的表达明显下降($F = 11.237, P < 0.05$)。但干扰 GDF9 后, cyclin A 蛋白表达下降, 但是没有显著性改变。见图 4。

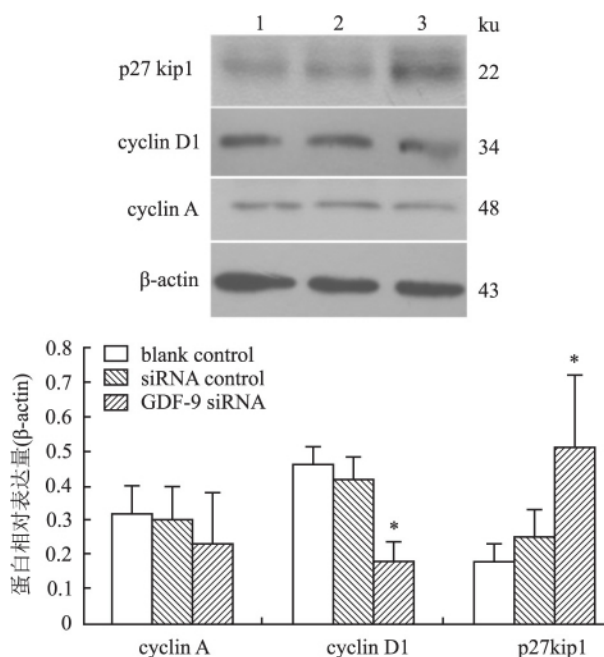


图4 GDF9 siRNA 对 p27kip1、cyclin D1 及 cyclin A 蛋白表达的影响

1: blank control 组; 2: siRNA control 组; 3: GDF9 siRNA 组; 与 blank control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

在正常卵巢的周期性卵泡发育过程中, 卵泡发育与颗粒细胞增殖分化和凋亡密切相关。GDF9 对卵泡发育有重要作用的细胞因子, 可以通过多个信号通路促进颗粒细胞增殖过程^[1]。本研究中利用 RNA 干扰技术沉默 GDF9 基因的表达, 达到抑制颗粒细胞增殖, 首先发现靶向 GDF9 的 siRNA 对颗粒细胞干扰效果明显, GDF9 基因表达量明显降低, 能够通过细胞周期蛋白表达研究卵巢颗粒细胞增殖, 为研究 PCOS 患者卵巢颗粒细胞黄素化和凋亡的机制提供实验依据, 为研究细胞周期调控的相关信号通路奠定基础。

细胞周期是与细胞生长增殖极其相关的一系列细胞内反应过程, 在这一重要过程中有许多关键的因子调控细胞的进程, 这些分子包括 cyclin D1、cyclin A 和 p27kip1 等, 正常的细胞周期有序的循环是通过激活和失活 CDK 来实现的。cyclinD1 作为细

胞周期进程的启动子, 是调控细胞周期 G1 期的关键蛋白, 能够促进细胞的生长增殖。cyclin A 在细胞周期中的 G1-S 和 G2-M 时相中均发挥了作用, 能够以有活性的 cyclin A-CDK-2 复合物的形式促进细胞的增殖^[2]。本研究结果显示, 沉默 GDF9 基因的表达后, cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达显著下降, 导致细胞周期进程减慢, 抑制细胞生长增殖。其中, 可以与 CDK4 结合形成复合体, 通过磷酸化和失活视网膜母细胞瘤蛋白(RB), 促进细胞周期从 G1 期到 S 期的进展, 并通过这种方式介导 DNA 的合成, 是一个比其他 Cyclins 更加敏感的指标, 对细胞周期调控至关重要^[3]。cyclin A 可在细胞周期的不同时期分别与 CDK-1、CDK-2 结合, 并激活其活性^[4]。可以磷酸化 RB 蛋白而使 E2F 游离, 活化、细胞便进入增殖阶段^[5]。Viglietto et al^[6] 研究结果显示, cyclin A 的表达量有一定的降低, 但是没有显著性下降, p27kip1 可以与 cyclin E-CDK2、cyclin A-CDK2、cyclin D-CDK4 复合物结合抑制其对底物的磷酸化作用, 使细胞不能发生 G₁ ~ S 期的时相转换, 停滞于 G₁ 期, 细胞增殖停止。本研究结果显示, 干扰 GDF9 后, p27kip1 的 mRNA 和蛋白表达量显著上升, 细胞增殖减缓, 因此也证实了 p27kip1 在介导细胞外信号, 尤其在细胞增殖及其调控中扮演负性调节的角色^[7], 可能 p27kip1 在细胞 PI3K 和 Notch 通路中参与细胞增殖和细胞周期调控^[8], 本研究也证实了 p27kip1 表达上升促进了对 cyclin D1 的抑制作用, 使 cyclin D1 表达显著性下降, 从而抑制了细胞的增殖分裂。但是研究中是否存在 PI3K/Akt/p27kip1 信号转导通路, 颗粒细胞 PI3K 通路活性是否受到影响, 从而影响细胞周期的正常调控, 需要进一步对颗粒细胞进行研究。

参考文献

- [1] 曹云霞. 高龄女性生育力的变化与评估 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2014, 6(8): 8-12, 23.
- [2] 陈蓓丽, 曹云霞. 卵巢早衰的病因学研究进展 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2013, 32(5): 339-43.
- [3] Foijer F, te Riele H. Check, double check: the G2 barrier to cancer [J]. Cell Cycle, 2006, 5(8): 831-6.
- [4] Wang X, Meng X, Sun X, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway may regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells [J]. Cell Cycle, 2009, 8(10): 1567-70.
- [5] Shi Z, Ji D F, Li Y G, et al. Activation of P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 pathway by polysaccharide from Phellinus linteus leads to S-phase arrest in HT-29 cells [J]. Chem Biol Interact, 2013, 206

- (2): 222–9.
- [6] 黄涛, 张令达. 口腔鳞状细胞癌组织中 p57 ~ (kip2) 和 Cyclin D1 mRNA 的表达及意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(4): 398–401.
- [7] 常秀峰, 张敏, 吴小华, 等. 卵母细胞分泌的生长分化因子-9 和骨形成蛋白-15 与卵母细胞发育潜能的关系 [J]. 生殖与避孕, 2014, 34(3): 200–4.
- [8] 马会明, 黑常春, 张永芳, 等. EGF 通过 PI3K/AKT 通路介导小鼠卵巢颗粒细胞增殖 [J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(5): 483–6+90.
- [9] 张永芳, 王蒙蒙, 李昕, 等. 二甲双胍通过抑制核糖体 40S 小亚基 S6K 蛋白激酶(P70S6) 调节体外人颗粒细胞胰岛素受体底物-1(IRS-1) 的表达 [J]. 生殖与避孕, 2015, 35(3): 146–53.
- [10] Ji Y R, Kim H J, Park S J, et al. Critical role of Rgs19 in mouse embryonic stem cell proliferation and differentiation [J]. Differentiation, 2015, 89(1–2): 42–50.
- [11] Yang T Y, Chang G C, Chen K C, et al. Sustained activation of ERK and Cdk2/cyclin-A signaling pathway by pemetrexed leading to S-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Eur J Pharmacol, 663(1–3): 17–26.
- [12] Nougarede R, Della Seta F, Zarrov P, et al. Hierarchy of S-phase-promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11): 3795–806.
- [13] Viglietto G, Motti M L, Fusco A. Understanding p27(kip1) down-regulation in cancer: down-regulation or mislocalization [J]. Cell Cycle, 2002, 1(6): 394–400.
- [14] Zhang W, Nie Y, Chong L, et al. PI3K and Notch signal pathways coordinately regulate the activation and proliferation of T lymphocytes in asthma [J]. Life Sci, 92(17–19): 890–5.
- [15] Jian Q, Tao Z, Li Y, et al. Acute retinal injury and the relationship between nerve growth factor, Notch1 transcription and short-lived dedifferentiation transient changes of mammalian Muller cells [J]. Vision Res, 2015, 110(Pt A): 107–17.

Effect of downregulated growth differential factor-9 on cell proliferative activity in mouse ovarian granulose cell

Ma Huiming, Zhang Yongfang, Wang Mengmeng, et al

(Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Fertility Center for Reproductive Medicine, Dept of Anatomy and Histology-Embryology, Ningxia Medical University, yinchuan 750004)

Abstract Objective In the present study, we determined whether GDF9 siRNA were involved in the expressions of cyclin A, cyclin D1 and p27kip1 which were key molecules in controlling cell cycling and cell proliferation by regulating cyclin D1 expression in mouse ovary granulose cell. **Methods** Real-time PCR and Western blot assay were used to investigate the expressions of cyclin D1, cyclin A, and p27kip1. We further observed the effect of GDF9 siRNA on the cell proliferation by regulating the expressions of cyclin D1, cyclin A, and p27kip1 in mouse ovary granulose cell. **Results** We found that the expressions of cyclin D1 and cyclin A were down-regulated at both protein and mRNA levels in GDF9 siRNA group while p27kip1 was upregulated by real-time PCR and Western blot assay. Furthermore, GDF9 siRNA had additive effect in down-regulation of cyclin D1, cyclin A and upregulation of p27kip1. Compared with the control group, the expression level of cyclin D1 was significantly decreased ($P < 0.05$) and p27kip1 was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** These data suggest that cell cyclin signal pathway may coordinately regulate the cell proliferation and differentiation processes through up-regulating cyclin D1 and down-regulating p27kip1 of mouse ovary granulose cell.

Key words GDF9 siRNA; cell proliferation; ovary granulose cell; mouse