

长链非编码RNA A-30-P01019163对卵巢颗粒细胞 β B2晶体蛋白表达的调控及对颗粒细胞增殖和凋亡的影响

刘胜楠, 李美慧, 李励, 黄玮, 张俊洁

引用本文:

刘胜楠, 李美慧, 李励, 等. 长链非编码RNA A-30-P01019163对卵巢颗粒细胞 β B2晶体蛋白表达的调控及对颗粒细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床医学, 2021, 28(5): 795-801.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210452>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

颗粒细胞凋亡调控机制及其在卵泡发育中的作用

Regulation mechanisms of granulosa cells apoptosis and its role in follicular development

中国临床医学. 2020, 27(5): 857-860 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191161>

前列腺素 E_2 在排卵过程中作用及机制研究进展

Research progress on the role of prostaglandin E_2 in ovulation and its mechanism

中国临床医学. 2020, 27(3): 515-519 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191032>

MicroRNA-29b表达改变对卵巢癌细胞增殖及侵袭的影响

The role of microRNA-29b in ovarian cancer cell proliferation and invasion and its mechanism

中国临床医学. 2018, 25(3): 387-390 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180433>

肾胺酶减轻高糖诱导的足细胞损伤

Remission effects of renalase on high glucose-induced injury in podocytes

中国临床医学. 2021, 28(4): 603-609 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210017>

Toonaciliatin A在体内外抑制胃癌MKN45细胞增殖并诱导细胞凋亡

Toonaciliatin A inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer MKN45 cells in vitro and in vivo

中国临床医学. 2017, 24(1): 12-15 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160913>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210452

长链非编码 RNA A-30-P01019163 对卵巢颗粒细胞 β B2 晶体蛋白表达的调控及对颗粒细胞增殖和凋亡的影响

刘胜楠, 李美慧, 李 励, 黄 玮, 张俊洁*

海军军医大学第一附属医院妇产科, 上海 200433

引用本文 刘胜楠, 李美慧, 李 励, 等. 长链非编码 RNA A-30-P01019163 对卵巢颗粒细胞 β B2 晶体蛋白表达的调控及对颗粒细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床医学, 2021, 28(5): 795-801. LIU S N, LI M H, LI L, et al. LncRNA A-30-P01019163 regulates β B2 crystallin gene expression in ovarian granulosa cells and its effects on cell proliferation and apoptosis [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(5): 795-801.

【摘要】目的:探讨 lncRNA A-30-P01019163 对卵巢颗粒细胞 β B2 晶体蛋白(β B2 crystallin, CryBB2)表达的调控作用, 及其对卵巢颗粒细胞增殖、凋亡的影响。**方法:**构建小鼠卵巢颗粒细胞过表达 lncRNA A-30-P01019163 体内模型, 同时基于人卵巢颗粒细胞系 KGN 构建过表达或干扰 lncRNA A-30-P01019163 稳定细胞株。采用 qRT-PCR 和 Western 印迹法检测 lncRNA A-30-P01019163 过表达或干扰后颗粒细胞中 CryBB2 的表达水平, 采用 EdU 法检测细胞增殖, 采用 TUNEL 法和流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:**随着小鼠周龄增长, 卵巢颗粒细胞 lncRNA A-30-P01019163 表达逐渐增加($P<0.05$)。过表达 lncRNA A-30-P01019163 后, 小鼠卵巢颗粒细胞中 CryBB2 mRNA 和蛋白表达均增加($P<0.01$)。对卵巢颗粒细胞系 KGN 过表达 lncRNA A-30-P01019163 后, 其 CryBB2 mRNA 和蛋白表达均增加($P<0.05$); 颗粒细胞增殖加快, 细胞周期相关蛋白 D1 及增殖细胞核抗原蛋白表达均增加($P<0.01$); 颗粒细胞凋亡增加, 凋亡相关蛋白半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)切割体及多聚 ADP-核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)切割体表达均增加($P<0.05$)。而干扰卵巢颗粒细胞系 KGN 中 lncRNA A-30-P01019163 后, CryBB2 mRNA 和蛋白表达均下调($P<0.01$); 颗粒细胞增殖减慢, 细胞周期相关蛋白 D1 及增殖细胞核抗原蛋白表达均降低($P<0.01$); 颗粒细胞凋亡减少, caspase-3 及 PARP 切割体表达均降低($P<0.05$)。**结论:**小鼠卵巢颗粒细胞中 lncRNA A-30-P01019163 表达随卵巢发育逐渐增加, 参与调控 CryBB2 表达, 并与颗粒细胞增殖、凋亡密切相关。

【关键词】 长链非编码 RNA; β B2 晶体蛋白; 卵巢颗粒细胞; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R 711.75 **【文献标志码】** A

LncRNA A-30-P01019163 regulates β B2 crystallin gene expression in ovarian granulosa cells and its effects on cell proliferation and apoptosis

LIU Sheng-nan, LI Mei-hui, LI Li, HUANG Wei, ZHANG Jun-jie*

Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】Objective: To explore the regulatory effect of lncRNA A-30-P01019163 on the expression of ovarian granulocytes β B2 crystallin (CryBB2) and its effects on ovarian granulocyte proliferation and apoptosis. **Methods:** The model of over-expression lncRNA A-30-P01019163 was constructed, and a stable cell line based on human ovarian granulosa cell line KGN with of overexpression or interference lncRNA A-30-P01019163 was established. The expression level of CryBB2 in after expression or interference was detected by qRT-PCR and protein blotting method, and the cell proliferation was detected by EdU, and apoptosis was detected by TUNEL and flow cytometric analysis. **Results:** As the mice age increasesd, the expression of lncRNA A-30-P01019163 in the granulocytes gradually increasesd ($P<0.05$). After overexpression of lncRNA A-30-P01019163 in KGN cells, the CryBB2 mRNA and protein expressions increased ($P<0.05$); granulocyte proliferation accelerated, cell cycle-related protein D1 and proliferating cell nuclear antigen expressions increased ($P<0.01$); the apoptosis of granulocytes increased, and cleaved caspase-3 and poly ADP-ribose polymerase (PARP) expressions were all increased($P<$

【收稿日期】 2021-03-05 **【接受日期】** 2021-05-06

【基金项目】 国家自然科学基金(81571387), 海军军医大学第一附属医院青年启动基金(2020QNB07). Supported by National Natural Science Foundation of China(81571387) and Youth Launch Fund of the First Affiliated Hospital of Naval Medical University(2020QNB07).

【作者简介】 刘胜楠, 硕士, 主治医师. E-mail: liushengnan227@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162044, E-mail: zhangjj910@163.com

0.05). After interfering lncRNA A-30-P01019163 in KGN cells, CryBB2 mRNA and protein expressions were reduced ($P < 0.01$); cell proliferation slowed down, cell cycle-related protein D1 and proliferating cell nuclear antigen expressions decreased ($P < 0.01$); cell apoptosis decreased, cleaved caspase-3 and PARP expressions decreased ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of lncRNA A-30-P01019163 increased along with ovarian granulosa cell development and is involved in the regulation of CryBB2 protein expression. LncRNA A-30-P01019163 is closely related to proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells.

[Key Words] lncRNA; β B2 crystallin; ovarian granulosa cell; proliferation; apoptosis

不孕症在成年育龄人群中的发病率逐年升高并呈年轻化趋势,我国不孕症发病率为 7%~10%,病因主要为女方因素、男方因素和不明原因性不孕^[1]。女性因素中常见原因包括子宫异常、激素水平异常及排卵障碍。近年来,国内外学者发现一些生物学因素与卵巢发育及排卵障碍密切相关^[2-3]。虽然已有文献报道影响卵巢发育的原因,但是具体分子机制仍待进一步探究。

在影响卵巢发育的因素中,卵巢中颗粒细胞因素较为重要。卵泡发育、排卵过程及黄体形成都需要颗粒细胞参与,这体现颗粒细胞在卵巢发育中的重要性。颗粒细胞的功能直接影响女性的生殖功能,并与卵泡增殖、分化和凋亡等的改变密切相关,直接影响卵泡发育和卵巢排卵^[4-5]。

本课题组前期研究^[6]发现, β B2 晶体蛋白(β B2 crystallin,CryBB2)基因全敲雄性小鼠生殖能力降低,可能由生殖细胞增殖和凋亡紊乱所致。在 CryBB2 蛋白对卵巢初步作用研究^[7]中发现,CryBB2 表达于健康人及小鼠的卵巢中,在小鼠的卵巢颗粒细胞中表达,且 CryBB2 敲除小鼠的卵巢结构及功能显著有别于正常同龄小鼠。有研究^[8]采用基因芯片、生物信息学分析及 qRT-PCR 等方法验证了 lncRNA A-30-P01019163 (lnc-9163) 在 CryBB2 基因全敲小鼠卵巢组织中表达下调。本研究基于课题组前期实验结果,进一步探讨 lnc-9163 对卵巢颗粒细胞 CryBB2 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 100 只 C57/B6 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心[SCXK(沪)2017-0002],饲养于海军军医大学实验动物中心[SCXK(军)2002-011]SPF 级(无特定病原体动物级)动物房。

1.2 样品准备 根据小鼠的年龄将其分为 5 组:刚出生、出生后 1 周、2 周、1 个月及 3 个月,每组至少 4 只,腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG,HOR-272,PROSPEC)10 U,腹腔内留存 48 h。麻醉后颈椎脱臼处死,取其卵巢组织即刻进行后续实验。

1.3 小鼠卵巢颗粒细胞分离与培养 常规消毒,取双侧卵巢放入无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)中,去除卵巢周围组织及表面包膜,PBS 清洗后置于 DMEM/F12 培养液[含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、10 ng/mL 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、100 U/mL 双抗]中。在光镜显微镜下用 25 号针头刺破卵巢表面的卵泡,使颗粒细胞释放于培养液中。300 $\times g$ 离心 5 min,洗涤 2 次,弃上清。取 DMEM/F12 生长培养液 2 mL 加入沉淀在离心管底的细胞团中,并制成单细胞悬液。将收集到的小鼠卵巢颗粒细胞悬液接种于含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液的 6 cm 培养皿中,每 2 个卵巢细胞 1 个皿,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。24 h 后弃培养液,用新鲜培养液洗 1 次,用 0.25% Trypsin-EDTA 胰酶消化细胞,同等体积含血清培养液终止消化,收集所有培养皿内的细胞液,300 $\times g$ 离心 5 min,弃上清,制成单细胞悬液。调整细胞数量至 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL,将细胞接种于 24 孔板或 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。

1.4 体内过表达 lnc-9163 AAV 构建及小鼠尾静脉注射 lnc-9163 片段、AAVrh10 载体均购自维真生物公司,AAVrh10 载体过表达 lnc-9163 及对照病毒构建、包装均由上海和元生物有限公司完成。-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存病毒。用无菌 PBS 稀释病毒,按照 5×10^9 滴度/只经尾静脉注射入小鼠体内,3 周后开始分选颗粒细胞(图 1)。

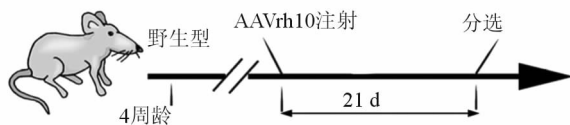


图1 过表达 lnc-9163 小鼠模型的构建及验证

1.5 过表达和干扰 lnc-9163 人卵巢颗粒细胞株 KGN 构建 慢病毒载体 pLenR、lnc-9163 干扰序列购自中乔新州公司,慢病毒核心元件质粒构建也由该公司完成,KGN、293T 细胞由海军军医大学细胞生物教研室馈赠。按照流程制备好过表达和干扰 lnc-9163 病毒以及对照病毒,将病毒加入 KGN 细胞中,培养 7 d 后根据载体上的真核抗性筛选细胞。

1.6 反转录及实时定量 PCR (quantitative real-

time PCR,qRT-PCR)检测 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 试剂提取小鼠卵巢组织总 RNA,采用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 反转录获得 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。采用荧光定量 PCR 仪 (Rchoe 公司),试剂盒为 SYBR-Green PCR Kit (TaKaRa 公司)。反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s、60℃ 30 s 循环 40 次。采用 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	正向序列(3'/5')	反向序列(3'/5')
lnc-9163	CGT GGG TGA GAT GGC TCA AT	ACA CGT CAG AGG ACA GCT TG
GADPH	GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG	CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T
CryBB2	GGC TGG TGT CAC TGG TCA TT	TCT CCA CGC CAG TTT CCT TC

GADPH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; CryBB2: β B2 晶体蛋白。

1.7 Western 印迹法检测蛋白表达水平 提取小鼠卵巢组织总蛋白,采用 BCA 法定量蛋白浓度,调整为 2.5 g/L,按比例加入十二烷基硫酸钠上样缓冲液 (5×),105℃ 加热 10 min 变性,每孔上样 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入兔抗 lnc-9163 多克隆抗体 (Abcam 公司,ab121884,稀释比例 1:500),4℃ 孵育过夜,加入 1:10 000 稀释的二抗 (辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊多克隆抗体, KPL 公司)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,ECL 发光液处理后暗室内曝光胶片。实验重复 3 次。检测卵巢颗粒细胞增殖相关蛋白细胞周期相关蛋白 D1(cyclin D1,1:1 000, ab16663, Abcam 公司)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 1:1 000, ab92552, Abcam 公司)、凋亡相关蛋白半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 切割体 (1:1 000, ab13847, Abcam 公司)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (poly ADP-ribose polymerase 1, PARP1) 切割体 (1:1 000, ab32064, Abcam 公司)。

1.8 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测 将各组的颗粒细胞按照 1×10^4 密度接种于小皿中培养备用。按照 1:1 000 用培养液稀释 EdU 细胞增殖检测试剂盒 (C10310-1,广州锐博生物有限公司)中 EdU 试剂,在 -20℃ 保存,每个小皿加入 100 μ L 稀释的 EdU 试

剂,孵育 2 h,用甲醇-丙酮液固定细胞 10 min,PBS 清洗 3~4 次,每次 5 min。加入 500 μ L 2 g/L 甘氨酸,孵育 5 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min。加入 1 000 μ L 含 0.5% Triton X-100 的 PBS,孵育 10 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min。按照试剂盒说明书配制 Apollo 显色液,加入 500 μ L,避光孵育 30 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min;加入用 PBS 稀释的 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚,4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色液 (1:1 000 稀释)孵育 1 min,PBS 清洗 1 次,避光保存。显微镜下观察荧光染色情况。

1.9 Annexin V-PI 双染细胞凋亡检测 Annexin V-PI 试剂盒购自 Thermo 公司 (V13242)。将待检测细胞弃去培养液,PBS 冲洗 3 次,加入不含 EDTA 的胰蛋白酶消化约 5 min,轻柔吹打至细胞完全脱离培养皿,转移至 EP 管中,900 $\times g$ 离心 3 min,弃上清,加入 PBS 清洗 3 次,每次清洗后 2 000 $\times g$ 离心 3 min。加入 500 μ L 结合缓冲液,轻柔吹打,充分混匀;加入 5 μ L Annexin V-FITC 吹打混匀,静置 1 min;加入 5 μ L PI,吹打混匀后,于室温、避光条件下反应 15 min。流式细胞仪上检测各通道染色细胞所占百分比。

1.10 TUNEL 法检测细胞凋亡 TUNEL 凋亡试剂购自锐博生物有限公司 (C11012-1)。将各组颗粒细胞按照 1×10^4 密度种植于小皿中培养备用。用

甲醇-丙酮溶液(1 : 1 体积混合)固定细胞 10 min, 加入 1 000 μ L 含 0.5% Triton X-100 的 PBS, 孵育 10 min, 加入可以覆盖培养皿底部的末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT 酶)缓冲液, 室温下反应 5 min; 加入 100 μ L TdT 酶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。然后加入适量 37 $^{\circ}$ C 预热的洗涤液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。按照说明书配制 TUNEL 反应混合液, 加入 100 μ L, 室温下反应 30 min, 用柠檬酸钠缓冲溶液(SSC, 20 倍去离子水按 1 : 10 稀释)终止反应(室温放置 10 min)。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用 PBS 稀释的 DAPI 染色液(1 : 1 000 稀释)孵育 1 min, PBS 清洗 1 次, 避光保存, 观察荧光

染色情况。
1.11 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7 软件处理所有数据以及制作统计图, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于非配对计量数据比较采用 Student t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同周龄小鼠卵巢颗粒细胞中 lnc-9163 的表达 结果(图 2)显示: 随着小鼠周龄增长, lnc-9163 表达逐渐升高($P < 0.05$), 提示 lnc-9163 可能参与小鼠卵巢发育过程。

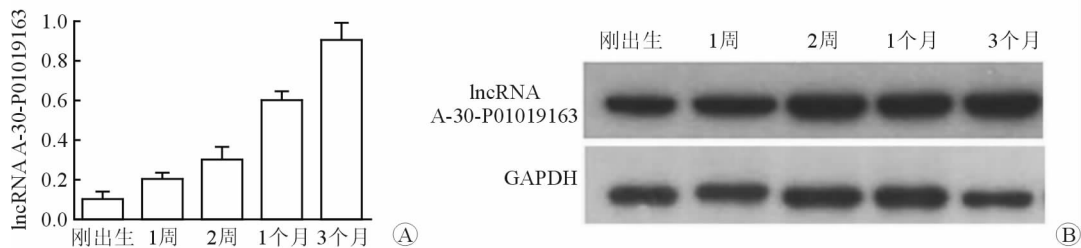


图 2 不同周龄小鼠卵巢颗粒细胞中 lnc-9163 的表达

A: qRT-PCR, B: Western 印迹法; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$ 。

2.2 lnc-9163 过表达后小鼠颗粒细胞内 CryBB2 表达 通过尾静脉注射腺病毒方式获得过表达 lnc-9163 的卵巢组织, 分选出颗粒细胞后, qRT-PCR(图 3A)显示卵巢组织颗粒细胞中 lnc-9163 表达增加,

提示构建过表达小鼠成功。对收集的颗粒细胞采用 qRT-PCR(图 3B)和 Western 印迹法(图 3C)检测 CryBB2 蛋白表达, 结果均显示过表达组 CryBB2 表达水平较对照组提高了约 4 倍($P < 0.01$)。

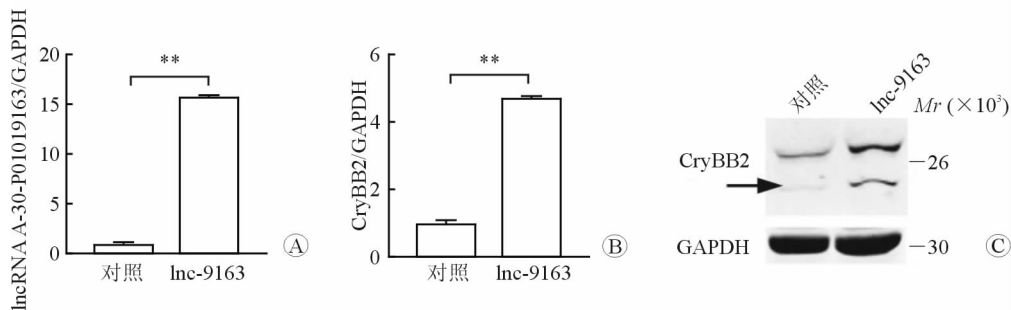


图 3 卵巢颗粒细胞过表达后及 CryBB2 检测

A: qRT-PCR 检测小鼠卵巢颗粒 lnc-9163 表达水平($n = 4$); B, C: qRT-PCR($n = 3$); D: Western 印迹法。* $P < 0.01$, $\bar{x} \pm s$ 。

2.3 KGN 过表达及干扰 lnc-9163 后检测 CryBB2 表达 qRT-PCR(图 4A)显示过表达 lnc-9163 的稳定 KGN 构建成功。qRT-PCR(图 4B)和 Western 印迹(图 4C)均显示, lnc-9163 过表达组的 CryBB2 表达水平较对照组提高了近 3 倍($P < 0.05$)。针对 lnc-9163 片段中 3 段位点, 利用 GeneMed 软件设计

3 对干扰引物序列, 并通过 pLenR 构建 3 种序列, 筛选出成功干扰的序列及相应细胞。结果(图 5A~5C)显示, 干扰 lnc-9163 后 CryBB2 mRNA 和蛋白表达下调, 与对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

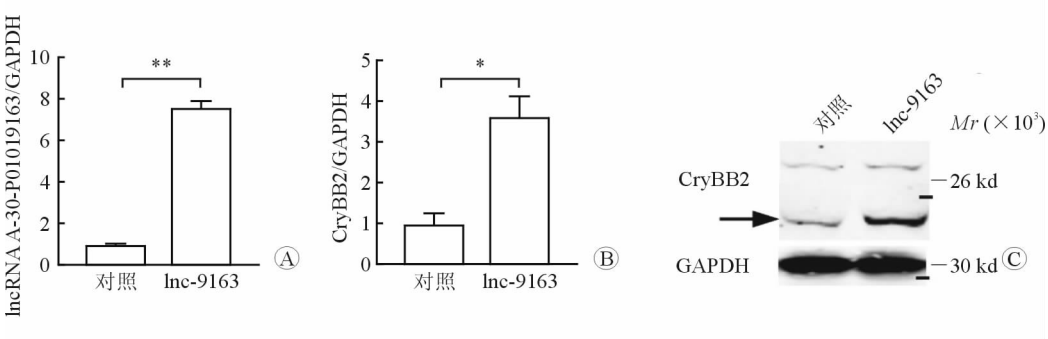


图 4 过表达 lnc-9163 人卵巢颗粒细胞系 KGN 建立及 CryBB2 表达检测

A: 颗粒细胞系 KGN 过表达 lnc-9163 后 qRT-PCR 验证; B, C: qRT-PCR (B) 和 Western 印迹法 (C) 检测 KGN 过表达 lnc-9163 和对照组内 CryBB2 表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

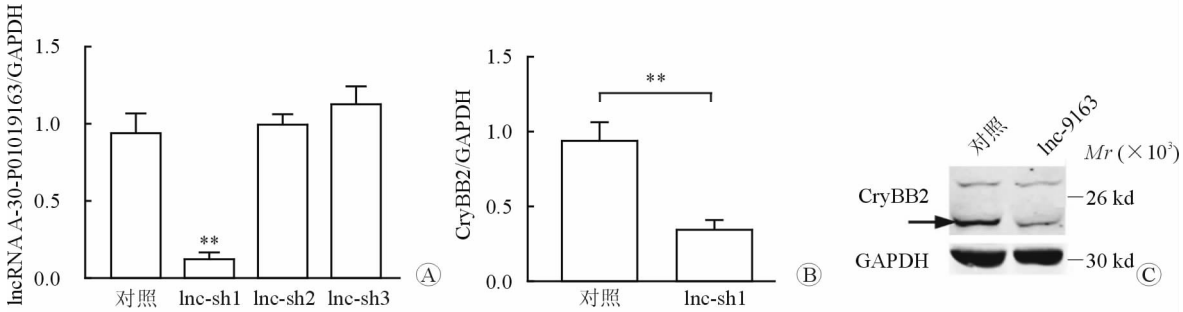


图 5 干扰 lnc-9163 的 KGN 建立及 CryBB2 表达检测

A: 3 条不同干扰序列包被慢病毒感染 KGN 后 qRT-PCR 验证; B, C: qRT-PCR (B) 和 Western 印迹法 (C) 检测 KGN 干扰 lnc-9163 和对照组内 CryBB2 表达水平; ** $P < 0.01$ 与对照组相比; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

2.4 lnc-9163 促进颗粒细胞增殖 过表达 lnc-9163 的 KGN 细胞中 EdU 标记的阳性细胞在每个 20 倍视野下约 191 个, 而对照组仅 112 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6A、6B)。Western 检测

(图 6C) 显示, 细胞增殖相关蛋白细胞周期相关蛋白 D1 及增殖细胞核抗原在过表达 lnc-9163 的 KGN 细胞中表达增加 ($P < 0.01$), 在干扰 lnc-9163 的 KGN 细胞中表达减少 ($P < 0.01$)。

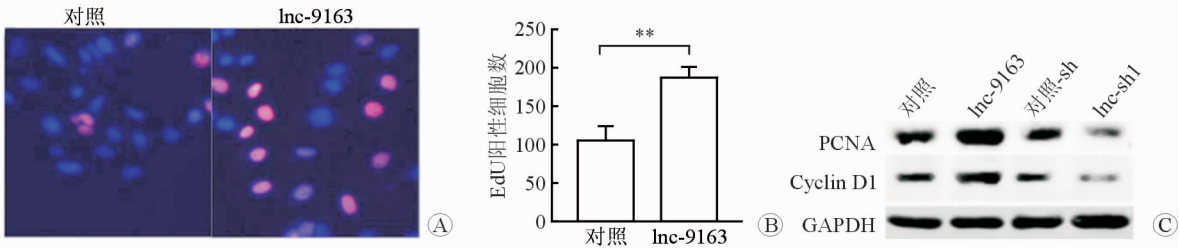


图 6 lnc-9163 促进颗粒细胞增殖

A: EdU 标记 (红色) 的对照和过表达 lnc-9163 颗粒细胞处于增殖时相的细胞荧光图, 细胞核用 DAPI 染色 (蓝色), Original magnification: $\times 20$; B: 对 A 中各组阳性细胞的量化; C: 增殖相关蛋白 PCNA 和 Cyclin D1 在过表达和干扰 lnc-9163 各组内的表达情况。 ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

2.5 lnc-9163 促进颗粒细胞凋亡 TUNEL 检测结果 (图 7A、7B) 显示, 过表达 lnc-9163 的颗粒细胞凋亡增多, 与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western 印迹法检测 (图 7C) 显示, caspase-3 切割体及 PARP1 切割体在过表达 lnc-9163 的颗粒细胞中

表达均增加 ($P < 0.05$), 在干扰 lnc-9163 的颗粒细胞中表达均减少 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果 (图 7D) 显示, 细胞中 Annexin V-PI 标记的凋亡细胞所占比例与 Western 印迹法检测结果一致。

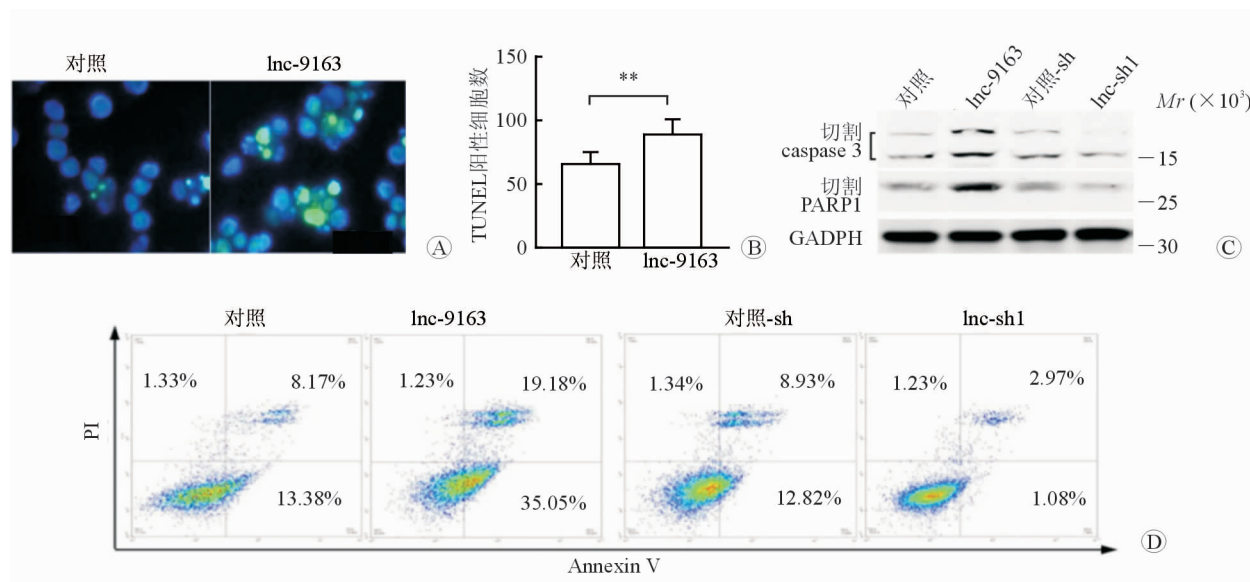


图 7 lnc-9163 促进颗粒细胞凋亡

A,B: TUNEL 结果; C: 凋亡相关蛋白 caspase-3 和 PARP1 在过表达和干扰 lnc-9163 细胞内的表达情况; D: Annexin V-PI. * $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$.

3 讨论

本研究通过设计 lnc-9163 过表达以及干扰序列,从体内和体外不同模型,分别构建了过表达和干扰 lnc-9163 颗粒细胞。过表达和干扰 lnc-9163 颗粒细胞中 CryBB2 表达水平也发生改变,且两者存在正向调节关系。同时,lnc-9163 可能促进细胞增殖和凋亡。结合前期研究^[6]结果,即 CryBB2 全敲小鼠的睾丸生殖细胞增殖和凋亡增多,lnc-9163 可能在颗粒细胞内参与调控 CryBB2 分子介导的细胞增殖和凋亡过程。

自从在晶状体外组织发现 CryBB2 的表达以来,多项研究^[9-11]报道了 CryBB2 在不同组织中的不同作用。CryBB2 可能参与卵巢颗粒细胞的发育过程,但对其调控机制仍然未知。前期研究^[8]认为,lnc-9163 可通过 P2rx7-Ca²⁺ 通道- CryBB2 轴来调控 CryBB2 基因表达。因此,本研究探究 lnc-9163 生物学功能及与 CryBB2 表达的关系。本研究结果发现,随着小鼠卵巢周龄增加,lnc-9163 在颗粒细胞中表达增加,这提示 lnc-9163 可能参与了卵巢发育过程。过表达或者干扰 lnc-9163 后的颗粒细胞内 CryBB2 蛋白表达同向改变,也提示 lnc-9163 与 CryBB2 可能存在轴向调控机制。结合 CryBB2 在体内生殖细胞表达的时相,推测 lnc-9163 可以调控 CryBB2 基因的表达,但是具体调控机制仍待后续深入研究。

越来越多的研究关注 lncRNA 在卵巢颗粒细胞中的作用,例如 Xiong 等^[12]报道了 lncRNA-Meg3-p53-p66Shc 轴可以影响卵巢颗粒细胞增殖;Kimura 等^[13]报道了 lncRNA-Amhr2 可以通过影响抗苗勒管激素(AMH)的分泌来影响卵巢颗粒细胞功能。lncRNA 与卵巢功能密切相关,本研究也提示 lnc-9163 与卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡密切相关,过表达 lnc-9163 可以促进颗粒细胞增殖和凋亡发生。凋亡和增殖的发生并不是相反的,也有可能是同向改变,取决于基因对凋亡或增殖相关基因的直接作用及所处的组织环境。Dedera 等^[14]报道,E2A-PBX1 可以在淋巴结中同时促进增殖和凋亡;Sakao 等^[15]认为在血管密集的区域存在凋亡后增殖加快的现象,这是机体的一种自我保护,为了维持整体细胞数目的平衡。由此推测 lnc-9163 可能通过影响 CryBB2 来促进凋亡发生,而加快的细胞增殖由颗粒细胞较强的增殖能力有关或为凋亡后代偿性增殖。然而,相关结论仍需要进一步研究来证实。

综上所述,本研究首次发现 lnc-9163 在卵巢颗粒细胞发育中逐渐升高,参与调控 CryBB2 蛋白表达,促进颗粒细胞增殖,与凋亡发生密切相关。本研究为探索 CryBB2 分子体内调控机制以及女性不孕不育分子机制提供研究思路。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

[1] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生

- 出版社, 2018. XIE X, KONG B H, DUAN T. Obstetrics and gynecology[M]. 9th ed. Beijing: People Public Health Publishing Company, 2018.
- [2] COHEN J, CHABBERT-BUFFET N, DARAI E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder—a plea for universal definitions[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(12):1709-1712.
- [3] BILGIN E M, KOVanci E. Genetics of premature ovarian failure[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2015, 27(3): 167-174.
- [4] LI Y, WANG H, ZHOU D, et al. Up-regulation of long noncoding RNA SRA promotes cell growth, inhibits cell apoptosis, and induces secretion of estradiol and progesterone in ovarian granular cells of mice[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:2384-2390.
- [5] BAUMGARTEN S C, ARMOUTI M, KO C, et al. IGF1R expression in ovarian granulosa cells is essential for steroidogenesis, follicle survival, and fertility in female mice[J]. Endocrinology, 2017, 158(7):2309-2318.
- [6] XIANG F, CUI B, GAO Q, et al. Decreased levels of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase IV in the testis as a contributing factor to reduced fertility in male CryBB2^{-/-} mice[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(5):1145-1151.
- [7] GAO Q, SUN L L, XIANG F F, et al. CryBB2 deficiency impairs fertility in female mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(1):37-42.
- [8] GAO Q, REN H, CHEN M, et al. Long non-coding RNAs regulate effects of β -crystallin B2 on mouse ovary development[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5):4223-4231.
- [9] DUPREY K M, ROBINSON K M, WANG Y, et al. Subfertility in mice harboring a mutation in betaB2-crystallin[J]. Mol Vis, 2007, 13:366-373.
- [10] HEERMANN T, GARRETT L, WURST W, et al. CryBB2 mutations consistently affect schizophrenia endophenotypes in mice[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(6):4215-4230.
- [11] BOHM M R, PROKOSCH V, BRUCKNER M, et al. β B2-crystallin promotes axonal regeneration in the injured optic nerve in adult rats[J]. Cell Transplant, 2015, 24(9): 1829-1844.
- [12] XIONG Y, LIU T, WANG S, et al. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway[J]. Gene, 2017, 596: 1-8.
- [13] KIMURA A P, YONEDA R, KURIHARA M, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-Amhr2, plays a role in Amhr2 gene activation in mouse ovarian granulosa cells[J]. Endocrinology, 2017, 158(11):4105-4121.
- [14] DEDERA D A, WALLER E K, LEBRUN D P, et al. Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice[J]. Cell, 1993, 74(5):833-843.
- [15] SAKAO S, TARASEVICIENE-STEWART L, LEE J D, et al. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells[J]. FASEB J, 2005, 19(9):1178-1180.

[本文编辑] 翟铖铖