

# 沉默*Gpr3*基因表达对猪卵泡颗粒细胞凋亡的影响

张宝乐<sup>1,2\*</sup> 徐银学<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>徐州医学院神经生物学教研室, 徐州 221004; <sup>2</sup>南京农业大学动物科学技术学院, 南京 210095)

**摘要** G蛋白偶联受体3(G protein-coupled receptor 3, *Gpr3*)属于G蛋白偶联受体超家族成员, 能够维持卵泡卵母细胞减数分裂的前期阻滞, 但在卵泡颗粒细胞中的作用不清。该研究利用RNAi技术, 以化学合成的siRNA转染体外培养的猪卵泡颗粒细胞, 并利用Real-time PCR和Western blot技术检验*Gpr3*基因的沉默效果; 利用MTT(四甲基偶氮唑盐)、流式细胞术和Real-time PCR技术检测沉默*Gpr3*基因表达对猪卵泡颗粒细胞凋亡以及凋亡相关基因表达的影响。结果显示, *Gpr3*-siRNA能够有效地抑制猪卵泡颗粒细胞中*Gpr3*基因mRNA和蛋白的表达( $P<0.01$ ); 在沉默*Gpr3*基因表达后, 猪卵泡颗粒细胞的细胞活性由0.419升高至0.586, 同时细胞凋亡率由2.67%下降至0.42%, 并在显著上调*Bcl-2*表达的同时, 下调了*Bax*的表达( $P<0.05$ )。结果表明, 沉默*Gpr3*基因的表达抑制了猪卵泡颗粒细胞的凋亡, 其机制可能与调控*Bcl-2*和*Bax*表达有关。

**关键词** 猪; *Gpr3*; RNA干扰; 颗粒细胞; 细胞凋亡

## Effects of Silencing *Gpr3* Gene by Small Interfering RNA on Apoptosis in Porcine Granulosa Cells

Zhang Baole<sup>1,2\*</sup>, Xu Yinxue<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;

<sup>2</sup>College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** G protein-coupled receptor 3 (*Gpr3*), a member of the G protein-coupled receptor superfamily, is known as a critical factor for the maintenance of meiotic prophase arrest in oocytes via a Gs protein-mediated pathway, but its role in granulosa cells is still unclear. In this study, RNAi was used to explore the effect of silencing *Gpr3* gene expression on apoptosis of porcine granulosa cells (GCs). The specific siRNAs against *Gpr3* was designed, chemically synthesized and transiently transfected into the porcine GCs using liposome. *Gpr3* expression level was assayed by Real-time PCR and Western blot. Cytoactive, apoptotic and the expression level of apoptotic-related genes were analyzed by MTT, flow cytometry and Real-time PCR, respectively. The results showed that *Gpr3*-siRNA effectively inhibited the expression of *Gpr3* at both mRNA and protein levels in porcine GCs ( $P<0.01$ ); the cytoactivity of porcine GCs increased from 0.419 to 0.586, and the apoptosis rate dropped from 2.67% to 0.42%; the expression levels of *Bcl-2* were significantly increased, while the expression levels of *Bax* were reduced ( $P<0.05$ ). Our results suggested that siRNA-mediated *Gpr3* depletion inhibited apoptosis in porcine granulosa cells, which

收稿日期: 2014-04-11 接受日期: 2014-05-07

国家高技术研究发展计划项目(863计划)(批准号: 2006AA10Z136)、江苏省研究生创新计划(批准号: CXLX11-0701)和徐州医学院优秀人才基金(批准号: 53591307)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0516-83262127, E-mail: zblpdsd@163.com; Tel: 025-84395278, E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn

Received: April 11, 2014 Accepted: May 7, 2014

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.006AA10Z136), a Grant-in-Aid for Innovative Training of Doctoral Students in Jiangsu Province of China (Grant No.CXLX11-0701) and Xuzhou Medical College Talents Fund (Grant No. 53591307)

\*Corresponding authors. Tel: +86-516-83262127, E-mail: zblpdsd@163.com; Tel: +86-25-84395278, E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-28 10:01 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0080.html>

were possibly related to the expression levels of *Bcl-2* and *Bax* genes.

**Key words** Pig; *Gpr3*; RNA interference; granulosa cells; cell apoptosis

G蛋白偶联受体3(G protein-coupled receptor 3, *Gpr3*)是孤儿G蛋白偶联受体超家族中的一员,其序列首次从小鼠的脑组织中被克隆,起初命名为*GPCR21*<sup>[1]</sup>。随后的研究发现,*Gpr3*基因不仅分布于脑组织,在卵巢和睾丸组织中也有大量的表达<sup>[1]</sup>,并且能够在CHO-K1、COS-7、NIH3T3等细胞系中组成性地激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),升高细胞内的cAMP水平<sup>[2]</sup>。近来的研究发现,*Gpr3*受体还能够通过激活下游Gs蛋白介导的信号通路的方式,维持小鼠卵泡卵母细胞减数分裂的前期阻滞<sup>[3]</sup>;另外还发现,敲除*Gpr3*基因的雌性小鼠,在表型正常的情况下,却因卵巢早衰而丧失了生育能力<sup>[4]</sup>,由此表明*Gpr3*参与了卵泡发育的调控过程。颗粒细胞是卵泡中最为重要的体细胞,对卵母细胞成熟以及卵泡的正常发育至关重要,我们课题组首次观察到猪*Gpr3*基因不仅表达于卵泡卵母细胞,而且在卵泡颗粒细胞中亦有表达<sup>[5]</sup>。然而,当前的研究着重于*Gpr3*基因对卵泡卵母细胞减数分裂前期阻滞的机制<sup>[6]</sup>,至今鲜见*Gpr3*对卵泡颗粒细胞生物学作用的研究。

为了探明*Gpr3*基因在猪卵泡颗粒细胞中潜在的生物学作用,本试验采用RNAi技术,以化学合成的siRNA特异地干扰猪卵泡颗粒细胞中*Gpr3*基因的表达,产生*Gpr3*“基因沉默”效应,藉此检测沉默*Gpr3*基因的表达对猪卵泡颗粒细胞凋亡的影响,有助于丰富*Gpr3*基因在调节卵泡发育过程中的生理功能方面的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪卵巢从南京市天环屠宰场采集,2 h内送达实验室,用于猪卵泡颗粒细胞的培养。

### 1.2 试剂及仪器

DMEM-F12培养液、Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清购自Gibco公司; Trizol、Lipofectamine<sup>™</sup> 2000转染试剂、抗生素购自Invitrogen公司; RIPA蛋白裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度试剂盒、ECL发光液购自碧云天生物技术研究所; 鼠抗人*Gpr3*单克隆抗体(ab55136)和鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(ab8226)购自Abcam公司;

MTT细胞增殖及细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; Prime Script<sup>™</sup> II反转录试剂盒购自TaKaRa公司; FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)荧光定量PCR试剂盒购自Roche公司; 其他试剂均为国产分析纯。6孔和96孔细胞培养板购自美国Costar公司; CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 倒置显微镜购自日本Olympus公司。

### 1.3 细胞培养

采集新鲜的青年商品猪卵巢,利用12G针头的注射器抽取3~5 mm卵泡中的颗粒细胞,经200目滤网过滤去除卵母细胞后,于37 °C预热的PBS中洗涤2次。以DMEM/F-12完全培养液(含100 IU/mL青霉素+100  $\mu$ g/mL链霉素+10% FBS)重悬颗粒细胞,调整细胞密度 $[(0.5\sim 1)\times 10^6/\text{mL}]$ 后接种至25 mL培养瓶,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。24 h后观察细胞贴壁及生长情况,更换完全培养液,待细胞长至80%~90%融合时,用0.25%的胰酶消化传代。

### 1.4 siRNA合成

根据*Gpr3*基因的mRNA序列(GenBank的登录号为HQ606483)和Invitrogen公司BLOCK-iT<sup>™</sup> RNAi Designer程序的设计原则,分别设计1对靶向*Gpr3*基因编码区的*Gpr3*-siRNA和作为阴性对照的NC-siRNA。利用BLAST程序确定*Gpr3*-siRNA序列的唯一性以及NC-siRNA序列的无义性(即与任何已知序列无相近匹配),并合成一条FAM标记的NC-siRNA序列(FAM-NC-siRNA)用于细胞转染效率的检测。具体siRNA序列见表1,交由Invitrogen公司合成。

### 1.5 细胞转染与效率测定

将对数生长期的猪卵巢颗粒细胞接种于6孔细胞培养板,待细胞融合至50%~60%时,参照Lipofectamine<sup>™</sup> 2000说明书分3组进行转染,即空白对照组(不经任何处理)、阴性对照组(转染NC-siRNA)和试验组(转染*Gpr3*-siRNA)。转染24 h后,利用荧光标记的FAM-NC-siRNA通过流式细胞仪测定转染效率。转染48 h后,收集细胞用于后续检测。

### 1.6 Real-time PCR

采用Trizol(Invitrogen公司)一步法从细胞中提

表1 猪Gpr3-siRNA合成序列

Table 1 Porcine Gpr3-siRNA sequences synthesized

siRNA	序列类型	合成序列(5'→3')
siRNA	Type of sequence	Synthesized sequences (5'→3')
Gpr3-siRNA	Sense	AGC AGG GUG AGA UAA GUG UAG AGG G
	Antisense	CCC UCU ACA CUU AUC UCA CCC UGC U
NC-siRNA (FAM-NC-siRNA)	Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
	Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

表2 引物信息

Table 2 Details of PCR primers employed in experiments

基因	GenBank序列号	引物序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)	退火温度(°C)
Genes	Accession number	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
Gpr3	HQ606483	F: CTT TGC TGC TGT CTT CTG	236	60
		R: GTG GTC TCT GAG TAG TAG G		
Bcl-2	AB271960	F: TTC TTT GAG TTC GGT GGG G	195	60
		R: CCA GGA GAA ATC AAA TAG AGG C		
Bax	AJ606301	F: CCG AAA TGT TTG CTG ACG	154	60
		R: AGC CGA TCT CGA AGG AAG T		
GAPDH	AF017079	F: GGA CTC ATG ACC ACG GTC CAT	220	60
		R: TCA GAT CCA CAA CCG ACA CGT		

取总RNA, 操作过程按照说明书进行。紫外分光光度仪测定总RNA浓度及纯度。以1 μg总RNA为模板按Prime Script™ II反转录试剂盒(TaKaRa)说明行反转录反应合成cDNA第一链。以cDNA第一链为模板, 通过Real-time PCR反应扩增目的基因和内参基因(*GAPDH*), 引物序列见表2。每个样品均做3个复孔。于ABI公司的7300型实时荧光定量PCR仪器上进行如下反应: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 42个循环。PCR结束采用熔解曲线确定产物特异性, 由PCR扩增曲线得到Ct值(threshold cycle number域值循环数)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行相对定量处理, 校正公式为: 目的基因的相对量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ;  $\Delta\Delta Ct = [Ct_{目的基因(待测样品)} - Ct_{内参(待测样品)}] - [Ct_{目的基因(校正样品)} - Ct_{内参(校正样品)}]$ , 以空白对照组作为目的基因表达量的校正样品。

### 1.7 Western blot

收集空白对照组、阴性对照组和转染Gpr3-siRNA组48 h的颗粒细胞, 用PBS洗2次, 溶解于RIPA细胞裂解缓冲液提取总蛋白。BCA蛋白检测试剂盒(碧云天)测定各样品总蛋白质浓度, 并调节浓度一致。通过10% SDS-PAGE分离蛋白质样品并转移到PVDF膜(Millipore)上。用封闭液(含5%脱脂牛奶的TBST溶液)室温封闭1 h后, 加入1:500稀释的鼠源Gpr3单克隆抗体(Abcam)或1:5 000稀释的鼠源β-actin单克隆抗体(Abcam), 4 °C孵育过夜。加兔抗鼠IgG第二抗体(1:3 000稀释, Santa-Cruz)室温孵育

PVDF膜2 h。TBST洗膜3次后, 浸入ECL超敏发光液中放置2 min, 于EC3 IMAGING SYSTEM荧光成像仪下拍照。用NIH ImageJ software进行条带灰度分析。

### 1.8 细胞活性检测

将处于对数生长期的颗粒细胞以 $1 \times 10^4$ /孔的密度植入96孔培养板中, 待细胞融合至50%时分组转染siRNA, 每组6个复孔。继续培养48 h后, 每孔加入MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 50 μL, 继续孵育2 h, 弃培养基, 加入DMSO(二甲基亚砷) 150 μL, 室温静置15 min, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪检测550 nm波长处的D值。

### 1.9 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的颗粒细胞以 $1 \times 10^5$ /mL密度接种于6孔培养板中, 待细胞融合至60%时分组转染siRNA。转染48 h后, 用0.25%的胰酶(不含EDTA)消化细胞, 并顺次加入5 μL Annexin V-FITC和碘化丙啶(propidium iodide, PI), 室温避光反应15 min, 用流式细胞仪进行凋亡检测。

### 1.10 数据统计

实验数据以mean±S.D.形式表示, 每组实验至少设置3个平行, 独立重复3次。用Microsoft Excel和SPSS 16.0软件对数据进行处理, 并做单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05代表差异显著,

$P < 0.01$ 代表差异极显著。

## 2 结果

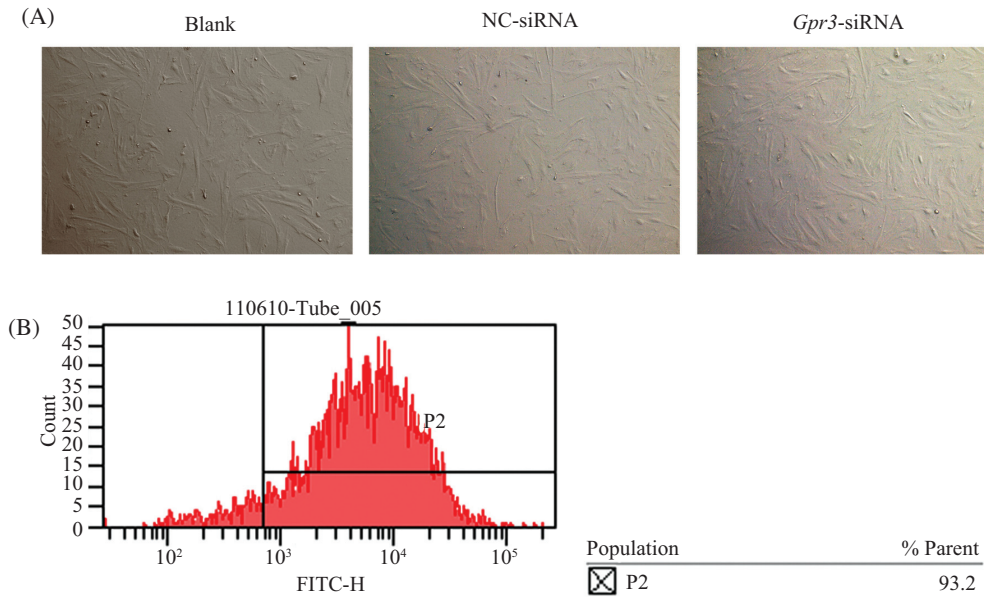
### 2.1 siRNA转染猪颗粒细胞的效率检测

为了证实siRNA成功转染颗粒细胞, 我们在转染24 h后利用流式细胞仪检测了荧光标记的FAM-NC-siRNA的转染效率, 并在倒置显微镜下

观察了各组细胞的细胞状态。结果显示: 光镜下颗粒细胞呈梭形或多角形, 生长状态良好, 无明显的死亡迹象(图1A), 流式检测的平均转染效率为 $(92.90 \pm 0.36)\%$ (图1B), 表明siRNA转染成功可以用于后续的实验研究。

### 2.2 siRNA转染后对*Gpr3*表达的影响

为了检测猪卵泡颗粒细胞中siRNA转染后对

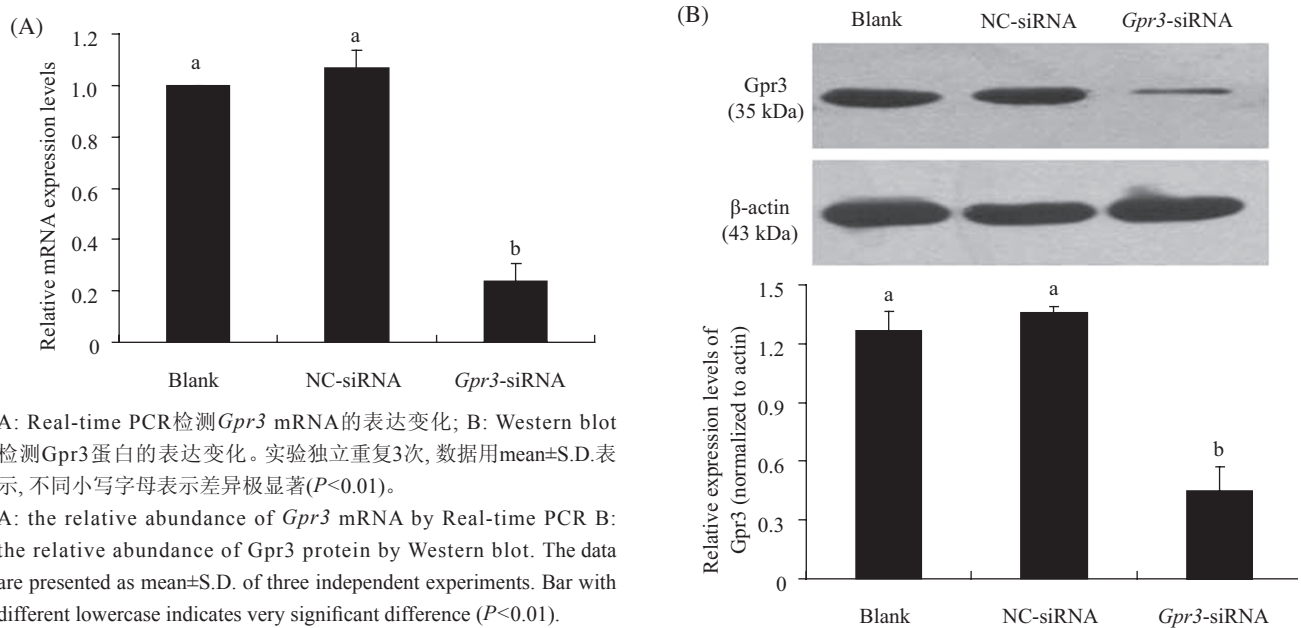


A: 转染后的猪卵泡颗粒细胞形态; B: 流式细胞术分析FAM-NC-siRNA的转染效率。

A: cell morphology of porcine granulosa cells (GCs) after transfection; B: FAM-NC-siRNA transfected efficiency of GCs by flow cytometry.

图1 转染后细胞形态及转染效率检测

Fig.1 Cell morphology and efficiency detected after transfection



A: Real-time PCR检测*Gpr3* mRNA的表达变化; B: Western blot检测*Gpr3*蛋白的表达变化。实验独立重复3次, 数据用mean±S.D.表示, 不同小写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

A: the relative abundance of *Gpr3* mRNA by Real-time PCR B: the relative abundance of *Gpr3* protein by Western blot. The data are presented as mean±S.D. of three independent experiments. Bar with different lowercase indicates very significant difference ( $P < 0.01$ ).

图2 转染siRNA对*Gpr3* mRNA和蛋白的影响

Fig.2 Effects of transfection on *Gpr3* mRNA and protein expression in GCs

*Gpr3*基因的“沉默”效果,我们利用Real-time PCR和Western blot的方法分别检测了转染48 h后*Gpr3* mRNA和蛋白的表达情况。结果显示:转染*Gpr3*-siRNA后,*Gpr3* mRNA的转录水平在颗粒细胞中下降极显著( $P<0.01$ ),与NC-siRNA组相比下调73%(图2A);*Gpr3*蛋白的表达水平也下降极显著( $P<0.01$ ),与NC-siRNA组相比降低了64.4%(图2B),表明*Gpr3*-siRNA可以有效地抑制猪卵泡颗粒细胞中*Gpr3*基因的表达,成功建立了沉默*Gpr3*基因表达的颗粒细胞模型。

### 2.3 沉默*Gpr3*基因表达对颗粒细胞活性的影响

为了分析沉默*Gpr3*基因表达对猪卵泡颗粒细胞活性的影响,我们采用MTT的方法检测了转染48 h后颗粒细胞的增殖情况。结果显示:沉默*Gpr3*基因表达能够显著促进颗粒细胞的生长( $P<0.05$ ),其增殖水平为NC-siRNA组的140%(表3)。

### 2.4 沉默*Gpr3*基因表达对颗粒细胞凋亡的影响

为了明确沉默*Gpr3*基因表达对猪卵泡颗粒细胞凋亡的影响,我们利用Annexin V/PI双染流式细胞术检测了各组颗粒细胞的凋亡率。结果显示:沉默*Gpr3*基因表达能显著减少颗粒细胞凋亡的比

表3 沉默*Gpr3*基因表达对颗粒细胞生长的影响

Table 3 Effect of repressed *Gpr3* expression on growth of GCs

组别 Group	$D_{550}$
Blank	0.428±0.061 <sup>a</sup>
NC-siRNA	0.419±0.039 <sup>a</sup>
<i>Gpr3</i> -siRNA	0.586±0.062 <sup>b</sup>

数据用mean±S.D.表示。各组之间的统计学差异用不同字母表示( $P<0.05$ )。

Values are mean±S.D.. Significant differences among the groups are indicated by different letters ( $P<0.05$ ).

率( $P<0.05$ ),与NC-siRNA组相比,凋亡比率下降2.25%(表4)。

### 2.5 沉默*Gpr3*基因表达对细胞凋亡相关基因表达的影响

为探明沉默*Gpr3*基因表达抑制颗粒细胞凋亡的分子机制,我们检测了细胞凋亡相关基因*Bcl-2*和*Bax*的mRNA表达情况。结果发现,沉默*Gpr3*基因表达后*Bcl-2*的表达显著上调( $P<0.05$ ),与NC-siRNA组相比,上调至145%;相反,*Bax*的表达显著下降( $P<0.05$ ),与NC-siRNA组相比,下调至54.2%(图3)。

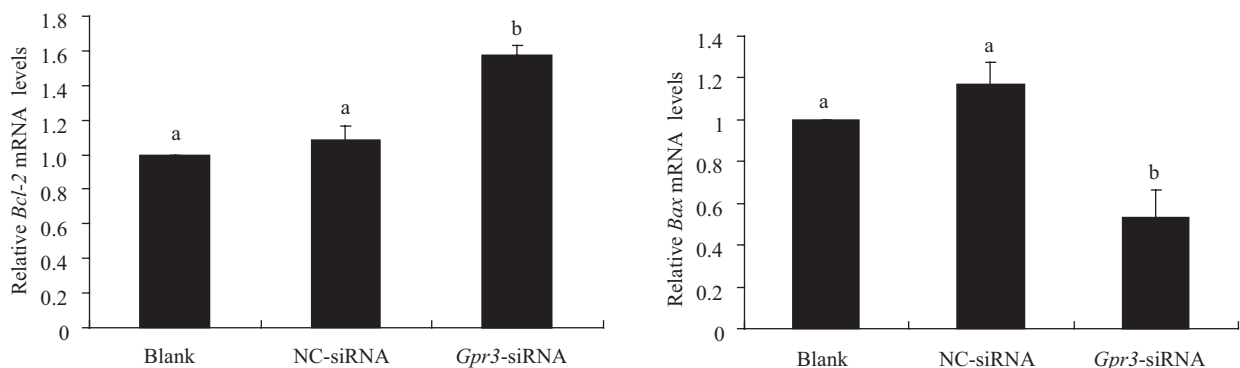
表4 沉默*Gpr3*基因表达对颗粒细胞凋亡的影响

Table 4 Effect of repressed *Gpr3* expression on apoptosis of GCs

组别 Group	活细胞率 Rate of living cells	凋亡细胞率 Rate of apoptotic cells	死细胞率 Rate of dead cells
Blank	95.75±0.85 <sup>a</sup>	2.56±0.65 <sup>a</sup>	1.68±0.06 <sup>a</sup>
NC-siRNA	95.98±0.71 <sup>a</sup>	2.67±0.16 <sup>a</sup>	1.34±0.10 <sup>a</sup>
<i>Gpr3</i> -siRNA	97.85±1.52 <sup>a</sup>	0.42±0.17 <sup>b</sup>	1.73±0.77 <sup>a</sup>

数据用mean±S.D.表示,各组之间的统计学差异用不同字母表示( $P<0.05$ )。

Values are mean±S.D. Significant differences among the groups are indicated by different letters ( $P<0.05$ ).



数据用mean±S.D.表示,不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The data are presented as mean±S.D. of three independent experiments. Bar with different lowercase indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

图3 沉默*Gpr3*基因表达影响细胞凋亡相关基因的表达

Fig.3 Repressing *Gpr3* expression alters apoptosis related genes mRNA levels

### 3 讨论

RNA干扰(RNAi)是转录后水平基因沉默的重要手段。利用该技术进行基因功能研究经济有效、通用性好,已成为反向遗传学研究中最重要工具之一。2000年, Wianny等<sup>[7]</sup>首次将RNAi技术应用于小鼠卵母细胞的研究,即选取在卵泡中表达的*c-mos*基因作为靶基因,通过显微注射方式导入dsRNA,结果与基因敲除小鼠实验结果相同,即*c-mos*基因表达被抑制,细胞减数分裂停滞在MII期,说明RNAi可以用于哺乳动物细胞基因功能研究;随后, Han等<sup>[8]</sup>用RNAi技术证实*Wee1B*基因在小鼠卵母细胞中特异性表达,且与卵母细胞发育中减数分裂的暂停有关。RNAi技术在卵母细胞中成功应用的同时,研究人员也开始在卵泡体细胞的研究中使用该技术。Hirano等<sup>[9]</sup>利用荧光受体基因技术检测了RNAi在猪卵泡颗粒细胞中的作用,发现其能有效地抑制目的基因的表达,可以用来检测目的基因在颗粒细胞中的作用。本实验室前期的工作证明了以上结论,我们发现,利用RNAi介导的*Smad4*基因沉默不仅能抑制颗粒细胞的生长,而且能诱导细胞凋亡,改变类固醇激素的生成<sup>[10]</sup>。

*Gpr3*是与Gs蛋白偶联的GPCR家族中的一员。前人的研究发现,它存在于小鼠卵泡发育的整个过程中,与卵母细胞的减数分裂有关,将*Gpr3*的dsRNA导入卵泡卵母细胞,经过一段时期培养后,其内源性蛋白质水平降低,导致小鼠卵母细胞减数分裂停滞在第一次减数分裂前期<sup>[11]</sup>。这与小鼠的*Gpr3*敲除实验所得结论一致<sup>[4]</sup>,说明RNAi可以用于*Gpr3*在哺乳动物细胞中的功能研究。我们的前期研究表明,*Gpr3*不仅存在于猪卵泡卵母细胞当中,而且在壁层颗粒细胞和卵丘细胞当中也有表达,并且发现,随着卵泡的早期发育,*Gpr3*在颗粒细胞中的表达量呈上升趋势<sup>[5]</sup>。为了明确*Gpr3*在颗粒细胞中的作用,我们采用RNAi技术建立沉默*Gpr3*基因表达的颗粒细胞模型,以进一步了解*Gpr3*在卵泡发育过程中的功能。结果显示,成功沉默猪卵泡颗粒细胞中*Gpr3*基因的表达后,不仅在一定程度上增强了颗粒细胞的活性,并且显著降低了颗粒细胞的凋亡率。然而,由于本实验用的是第二代的颗粒细胞,其细胞活性强、凋亡“本底”较低(2.56%),在沉默*Gpr3*后可能未完全表现出*Gpr3*-siRNA在颗粒细胞中的抑凋亡能力。因此,本课题组拟在今后的实验中,建立某种体外的

颗粒细胞凋亡模型(如添加一定量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导颗粒细胞凋亡),之后再转染*Gpr3*-siRNA,从而进一步明确沉默*Gpr3*基因表达的抑凋亡功能,并为深入探讨*Gpr3*-siRNA的抑凋亡机制奠定基础。另外,在我们先前的研究中发现,沉默*Gpr3*能够通过上调*Cyclin B1*和*Cyclin D2*基因的表达,促进猪卵泡颗粒细胞的增殖<sup>[5]</sup>。Tanaka等<sup>[12]</sup>也发现,*Gpr3*能够在出生后的啮齿类动物小脑发育过程中抑制小脑颗粒细胞的增殖,与我们的研究结果相似。此外,我们课题组新近的研究发现,过表达*Gpr3*能够促进猪颗粒细胞的凋亡(数据未列出),进一步支持了本研究的结果。由此说明,*Gpr3*基因参与了体细胞生长与凋亡的调节过程。

大量研究表明,细胞凋亡依赖于凋亡相关基因表达的改变<sup>[13]</sup>。所以,我们在研究沉默*Gpr3*基因表达对猪卵泡颗粒细胞凋亡影响的同时,也研究了影响颗粒细胞凋亡可能的分子机制。*Bcl-2*家族是重要的细胞凋亡调控蛋白,其中*Bax*和*Bcl-2*分别属于*Bcl-2*家族中的促凋亡和抗凋亡基因,是线粒体凋亡通路中的主要调节者<sup>[14]</sup>。在猪颗粒细胞中沉默*Gpr3*基因抑制了颗粒细胞的凋亡,下调了*Bax*的表达,同时上调*Bcl-2*的表达,说明沉默*Gpr3*基因表达可能是通过线粒体凋亡通路引起猪颗粒细胞凋亡的,其具体机制有待于我们进一步的研究。

综上所述,我们利用RNAi技术成功建立了沉默*Gpr3*基因的猪卵泡颗粒细胞模型,并在此基础上发现了沉默*Gpr3*基因在颗粒细胞中的抑凋亡作用,且*Bax*和*Bcl-2*与此凋亡过程有关,为深入探索*Gpr3*基因在颗粒细胞中的生物学功能奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Saeki Y, Ueno S, Mizuno R, Nishimura T, Fujimura H, Nagai Y, *et al.* Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor (GPCR21) which is expressed predominantly in mouse central nervous system. *FEBS Lett* 1993; 336(2): 317-22.
- 2 Eggerickx D, Deneff JF, Labbe O, Hayashi Y, Refetoff S, Vassart G, *et al.* Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *Biochem J* 1995; 309( Pt 3): 837-43.
- 3 Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, *et al.* The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306(5703): 1947-50.
- 4 Ledent C, Demeestere I, Blum D, Petermans J, Hamalainen T, Smits G, *et al.* Premature ovarian aging in mice deficient for *Gpr3*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(25): 8922-6.

- 5 Zhang B, Wei Q, Shi S, Dong F, Shi F, Xu Y. Immunolocalization and expression pattern of Gpr3 in the ovary and its effect on proliferation of ovarian granulosa cells in pigs. *J Reprod Dev* 2012; 58(4): 410-9.
- 6 Li J, Mao G, Xia G. FSH modulates PKAI and GPR3 activities in mouse oocyte of COC in a gap junctional communication (GJC)-dependent manner to initiate meiotic resumption. *PLoS One* 2012; 7(9): e37835.
- 7 Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 70-5.
- 8 Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol* 2005; 15(18): 1670-6.
- 9 Hirano T, Yamauchi N, Sato F, Soh T, Hattori MA. Evaluation of RNA interference in developing porcine granulosa cells using fluorescence reporter genes. *J Reprod Dev* 2004; 50(5): 599-603.
- 10 Wang W, Wang L, Li XX, Chen X, Zhang HY, He Y, *et al.* Effect of interrupted endogenous BMP/Smad signaling on growth and steroidogenesis of porcine granulosa cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11(9): 719-27.
- 11 Mehlmann LM. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol* 2005; 288(2): 397-404.
- 12 Tanaka S, Shaikh IM, Chiocca EA, Saeki Y. The Gs-linked receptor GPR3 inhibits the proliferation of cerebellar granule cells during postnatal development. *PLoS One* 2009; 4(6): e5922.
- 13 Gonzalez-Girones DM, Moncunill-Massaguer C, Iglesias-Serret D, Cosialls AM, Perez-Perarnau A, Palmeri CM, *et al.* AICAR induces Bax/Bak-dependent apoptosis through upregulation of the BH3-only proteins Bim and Noxa in mouse embryonic fibroblasts. *Apoptosis* 2013; 18(8): 1008-16.
- 14 Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008; 60(6): 390-7.