

RNAi 抑制 *Smad4* 基因表达对猪卵巢颗粒细胞 凋亡的影响

张海燕 王 伟 贺 彘 王 莉 田宽校 宋晓光 徐银学*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 *Smad* 蛋白家族是 TGF- β /*Smad* 信号通路中的重要成员, 其中 *Smad4* 在该信号转导途径中起着关键作用。本研究利用 RNAi 技术沉默 *Smad4* 基因, 探讨其对猪卵巢颗粒细胞凋亡的影响。设计并合成靶向 *Smad4* 的小分子干扰 RNA, 在脂质体的介导下转染猪卵巢颗粒细胞, 荧光定量 PCR 检测 *Smad4* mRNA 的表达情况; MTT(四甲基偶氮唑盐)比色法分析检测细胞活性; TUNEL(原位末端核苷酸标记法)及 Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 荧光定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达水平。研究显示, *Smad4*-siRNA 能有效抑制 *Smad4* 的 mRNA 表达($P < 0.01$), 细胞活性由 0.31 减少到 0.27, 凋亡率由 17.0% 增加到 22.1%, Bcl-2 的 mRNA 表达显著下调。结果说明沉默 *Smad4* 基因可以促进猪卵巢颗粒细胞的凋亡, 其机制可能与调控 Bcl-2 表达有关。

关键词 猪卵巢颗粒细胞; *Smad4*; RNA 干扰; 细胞凋亡

Smad 蛋白家族是近年新发现的细胞内信号传导蛋白, 可分为 3 个不同的亚族: R-*Smad*、Co-*Smad* 和 I-*Smad*, 其中 R-*Smad* 亚族可以进一步分为 BMP-*Smad* 和 TGF- β /actin-*Smad* 两类。Co-*Smad* 可以与所有磷酸化的 R-*Smad* 形成异聚复合体, 直接参与转化生长因子(transforming growth factor, TGF- β)多个成员的信号转导, 在 TGF- β 超家族成员的信号转导中具有重要的作用。该家族是一类结构上相关而具有激素活性的多肽, 参与早期胚胎发生的身体构建, 控制软骨、骨和性器官的形成, 促进组织修复; 调节细胞的增殖、凋亡、分化和迁移, 以及调节免疫和内分泌功能等^[1,2]。

Smad4 作为 *Smad* 蛋白家族的重要成员之一, 是哺乳类中发现的唯一一种 Co-*Smad*。研究表明 *Smad4* 是 TGF- β 、actin 和 BMP 信号转导通路上的共享成分, 被认为是不同 TGF- β 成员信号传递必需的中心转导分子。*Smad4* 在 TGF- β /*Smad* 信号通路中发挥着关键作用, 其表达缺失或者突变都会引起 TGF- β /*Smad* 信号转导紊乱, 从而导致肿瘤的发生。大量人类肿瘤发生机制的研究表明, 沉默 *Smad4* 基因对不同组织的细胞生长有着不同的影响^[3-5]。因此, 本试验构建了靶向 *Smad4* 的小干扰 RNA 并转染猪卵巢颗粒细胞, 利用 TUNEL (原位末端核苷酸标记法)及 Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 定量分析 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达水平, 探讨其在颗

粒细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

猪卵巢在南京天环屠宰场采集, 在 37℃ 条件下 2 h 内运回实验室。

DMEM-F12 培养干粉购自 GIBCO (上海普飞生物技术有限公司), RNA 抽提试剂盒和 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂购自 Invitrogen (上海普飞生物技术有限公司), PCR 引物均由上海英俊公司合成, 新生胎牛血清购自兰州民海生物有限责任公司, Real-time PCR 反应试剂盒购自 TaKaRa (宝生物工程大连有限公司), MTT 和细胞凋亡试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司, 其余常用化学试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 siRNA 的合成及转染 根据 siRNA 靶序列设计原则和 Invitrogen 公司网站上提供的方法, 设计针对 *Smad4* 基因的 siRNA 序列, 在 GenBank 表达序列标签数据库中用 BLASTN 检索, 确认所设计 siRNA 序列的唯一性, 设计两条链, 正义链序列为: 5'-AAU CCU

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-06-28

国家高技术研究发展计划课题(No.2006AA10Z136)资助项目

* 通讯作者。Tel: 025-84365362, E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn

GAG AGA UCA AUU CCU GGU G-3'; 反义链序列为: 5'-CAC CAG GAA UUG AUC UCU CAG GAU U-3'。同法构建阴性对照组的无关干扰序列, 正义序列: 5'-GGA UGG AUG AAA UGG UAU GGA GAA A-3'; 反义序列: 5'-UUU CUC CAU ACC AUU UCA UCC AUC C-3', 与任何编码序列无同源性, 提交 Invitrogen 公司合成。

颗粒细胞及 siRNA 转染颗粒细胞培养体系为含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基, 37°C, 5% 的 CO₂。选择处于对数生长期的细胞, 经胰酶消化后重悬细胞^[6], 每孔 2 ml 加于 6 孔板中, 使每孔细胞密度为 10⁵ 个 /ml, 细胞接板后 24 h 进行转染实验, 转染步骤按 Lipofectamine™ RNAiMAX 说明书操作。

1.2.2 试验分组 试验分为三组: 第 1 组为空白对照, 不经任何特殊处理; 第 2 组为阴性对照, 转染 8 nmol/L 无关干扰序列; 第 3 组为实验组, 转染 8 nmol/L *Smad4*-siRNA, 各组均转染 36 h 后检测分析。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 *Smad4*、Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达 采用 Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂盒提取各实验组转染后细胞的总 RNA, 应用两步法进行荧光定量 PCR。设计合成引物序列如下: GAPDH, 上游 5'-GGA CTC ATG ACC ACG GTC CAT-3', 下游 5'-TCA GAT CCA CAA CCG ACA CGT-3', 扩增片段长度为 220 bp; *Smad4* 上游 5'-TTT GCG TCA GTG TCA TCG-3', 下游 5'-TGC TCT GCC TTG GGT AAT-3', 扩增片段长度 236bp; Bax, 上游 5'-CCG AAA TGT TTG CTG ACG-3', 下游 5'-AGC CGA TCT CGA AGG AAG T-3', 扩增片段长度 154 bp; Bcl-2, 上游 5'-TTC TTT GAG TTC GGT GGG G-3', 下游 5'-CCA GGA GAA ATC AAA TAG AGG C-3', 扩增片段长度 195 bp。

每个标本重复 3 次, 取平均 C_t 值, 按 2^{-ΔΔC_t} 方法^[7] 分析转染后各基因的表达情况: 以空白组为对照, ΔC_{t1}= 转染后的 C_t 值 - 对应内参 C_t 值, ΔC_{t2}= 空白组的 C_t 值 - 对应内参 C_t 值, ΔΔC_t=ΔC_{t1}-ΔC_{t2}, 2^{-ΔΔC_t} 值为转染后较空白组各基因表达量的倍数。

1.2.4 MTT 比色法检测细胞活性 将细胞以 10⁴ 个 /ml 密度接于 96 孔培养板进行细胞转染, 36 h 后终止, 每孔加入 MTT 50 μl, 继续孵育 4 h, 弃培养基, 加入 DMSO (二甲基亚砷) 150 μl, 室温静置 15 min, 紫色结晶完全溶解后, 酶标仪检测各组细胞的 A₅₅₀ 吸光值, 以空白细胞组为对照组, 计算细胞活力。

1.2.5 TUNEL 检测细胞凋亡 将细胞以 10⁵ 个 /ml 接种于铺有盖玻片的六孔板中进行细胞转染, 36 h 后收集细胞爬片, 多聚甲醛固定 30 min, 加封闭液室

温反应 10 min, 加通透液冰上反应 2 min, 每个样本加 50 μl TdT 酶反应液, 37°C 避光湿润反应 1 h, 滴加 50 μl/片 Streptavidin-HRP 工作液, 37°C 避光湿润反应 30 min, 滴加 50~100 μl/片 DAB 工作液, 显色反应后, 苏木素浅染, 脱水, 透明, 封片(每次反应间隔均用 PBS 洗 3 次), 光学显微镜下拍照观察。

1.2.6 Annexin-V/PI 双染流式细胞仪测定细胞凋亡率 将细胞以 10⁵ 个 /ml 的密度接种于 25 ml 培养瓶中, 待细胞融合到 85% 以上开始转染, 转染 36 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤两次, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后, 加入 Propidium Iodide 混匀, 室温反应 15 min, 用流式细胞仪进行凋亡检测。

1.2.7 统计学分析 每组试验三次平行, 独立重复三次, 采用 SPSS13.0 统计分析软件进行 One-way ANOVA 分析, LSD 多重比较, 数据均以平均数 ± 标准误 (means ± SE) 表示。

2 结果

2.1 定量 PCR 检测 siRNA 转染后 *Smad4* mRNA 的表达情况

当 siRNA 浓度为 8 nmol/L 时(图 1), 转染 36 h 后实验组较空白组 *Smad4* mRNA 的表达量下降 84% (P<0.01)。

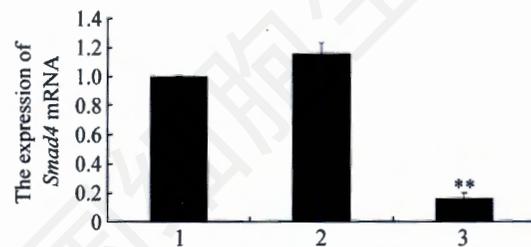


Fig.1 Expression of *Smad4* mRNA after transfection with siRNA for 36h

1: blank control; 2: negative control; 3: *Smad4*-siRNA. Significant differences from the blank group are indicated by **P<0.01. The same as below.

Table 1 The growth of MTT assay transfected with siRNA of granular cell

Groups	A
Blank control	0.31±0.01 ^a
Negative control	0.30±0.01 ^a
<i>Smad4</i> -siRNA	0.27±0.00 ^b

Values with different superscript letters in the same rank mean significant difference (P<0.05), with same superscript or no letters mean nonsignificant difference (P>0.05). The same as below.

2.2 MTT 比色法检测 siRNA 转染对细胞活性的影响

MTT 检测结果显示(表 1), Smad4-siRNA 转染对卵巢颗粒细胞的增殖有明显的抑制作用, siRNA 组抑制率明显高于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$), 同时, 阴性对照组与空白组之间差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 TUNEL 法检测 siRNA 转染后细胞凋亡结果

显微镜下观察, 实验组较空白组细胞凋亡数增多, 表现为细胞呈棕褐色, 核染色质浓缩、凝聚, 胞

核固缩, 颗粒深染, 形态不规则(图 2)。

2.4 Annexin-V/PI 流式细胞仪测定 siRNA 转染后细胞凋亡率

Annexin-V/PI 双染流式细胞仪检测各组细胞凋亡率(表 2, 图 3), 结果显示, siRNA 实验组凋亡率为 22.1%, 高于空白对照组的 17.0%, 差异显著($P<0.05$); 阴性对照与空白对照相比, 凋亡率无明显差异($P>0.05$)。

2.5 定量 PCR 检测 siRNA 转染后 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达情况

Table 2 Flow cytometric analysis of apoptosis with siRNA of granulosa cell

Groups	Dead cell rate	Apoptotic cell rate	Living cell rate
Blank control	1.03±0.79 ^a	17.0±0.50 ^a	81.93±1.24 ^a
Negative control	0.57±0.43 ^a	17.9±1.75 ^a	81.50±2.11 ^a
Smad4-siRNA	0.63±0.44 ^a	22.1±1.04 ^b	77.30±1.41 ^a

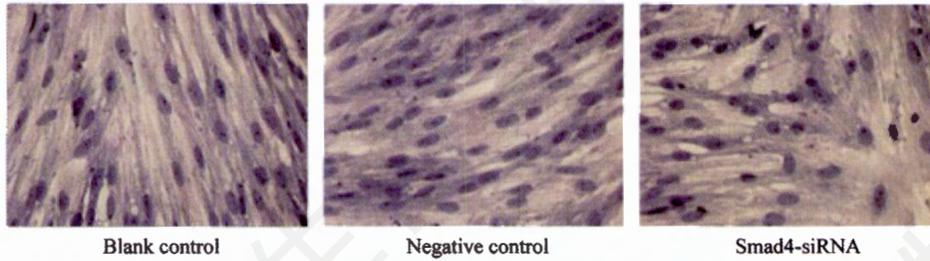


Fig.2 The comparison of TUNEL in three groups of granulosa cells

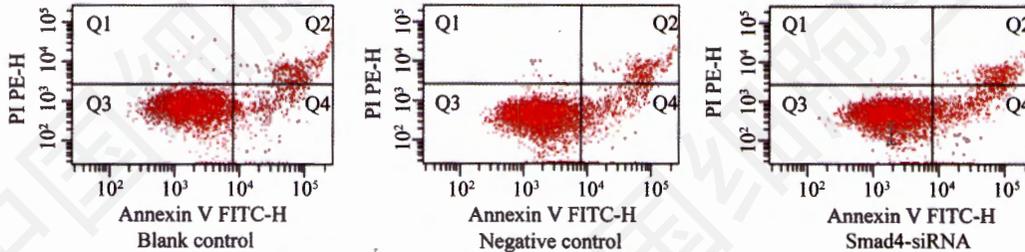


Fig.3 The scatter plots of apoptosis with siRNA of granulosa cell

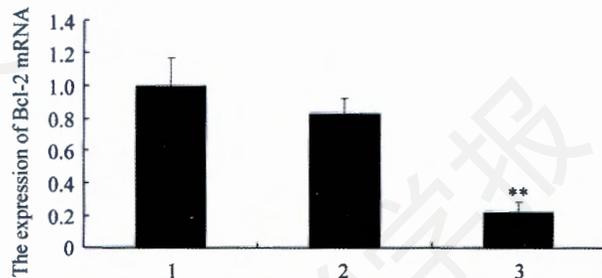


Fig.4 Expression of Bcl-2 mRNA after transfection with siRNA

1: blank control; 2: negative control; 3: Smad4-siRNA. Significant differences from the blank group are indicated by $**P<0.01$.

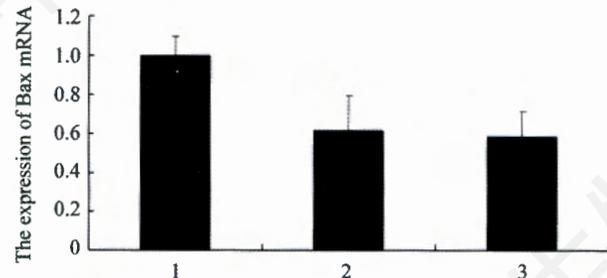


Fig.5 Expression of Bax mRNA after transfection with siRNA

1: blank control; 2: negative control; 3: Smad4-siRNA.

荧光定量 PCR 检测结果显示, siRNA 转染后 *Bcl-2* mRNA 的表达量降低了 79%, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 4), *Bax* mRNA 的表达无明显变化 (图 5)。

3 讨论

Smad4 是将 TGF- β /Smads 信号从胞浆转入胞核内的核心转录因子, 在 TGF- β 信号转导中发挥重要作用。近年来针对 *Smad4* 有大量的研究, Deckers 等^[8] 沉默 NMuMG 乳腺上皮细胞的 *Smad4* 基因, 发现可以减缓 TGF- β 的细胞生长抑制和凋亡。吴开杰等^[9] 通过靶向 RNAi 下调 *Smad4* 基因表达, 可促进前列腺细胞的增殖。Huang 等^[10] 在肝细胞癌 HCC 的 SMMC-7721 细胞系中沉默 *Smad4* 基因后, 发现细胞发生凋亡。这些研究表明, 沉默 *Smad4* 基因在不同组织上对细胞生长有着不同的影响。

苗竹林等^[11] 研究发现卵巢中存在 *Smad4* 信号转导途径, TGF- β 对卵泡的分化调节很可能是通过 *Smad4* 信号途径实现的。故本实验针对 *Smad4* 基因设计了一对 siRNA, 通过脂质体转染卵巢颗粒细胞, 研究沉默 *Smad4* 基因对猪卵巢颗粒细胞凋亡的影响。

本实验中, 荧光定量 PCR 检测到 siRNA 干扰后 *Smad4* mRNA 表达水平显著下降, *Smad4*-siRNA 能有有效的抑制 *Smad4* 的 mRNA 转录, 转染浓度为 8 nmol/L 作用 36 h 时效果最佳。MTT 比色法检测到, *Smad4* 表达被抑制后, 细胞活性 (0.27) 低于对照组 (0.31), 表明细胞生长受到抑制, 由此推论细胞发生凋亡。

为了明确是否发生细胞凋亡, 采用 TUNEL 染色, 结果发现, siRNA 实验组较对照组凋亡细胞明显增多。利用流式细胞术测得, 抑制 *Smad4* 后, 细胞凋亡率 (22.1%) 显著高于对照组 (17.0%), 表明沉默 *Smad4* 基因可促进颗粒细胞凋亡。由此也可证明 TGF- β 通过 *Smad4* 途径参与了卵泡的发育, 从而促进颗粒细胞的增殖与分化。

大量实验证明, 导致细胞凋亡的主要原因是基因的参与^[12]。Bcl-2 家族是重要的细胞凋亡调控蛋白, 其中 *Bax* 及 *Bcl-2* 分别属于 Bcl-2 家族的原凋亡及抗凋亡基因, 是线粒体凋亡通路中的主要调节者^[13]。为进一步探讨 *Smad4*-siRNA 促进细胞凋亡的可能机制, 本实验通过荧光定量 PCR 技术检测 *Bax* 及 *Bcl-2* mRNA 的表达, 结果显示, *Smad4* 被抑制后, *Bcl-2* 表达降低 79%, 显著下调, 而 *Bax* 表达无明显变化。Bcl-2

作为抗凋亡基因, 在细胞内表达显著降低, 说明细胞发生明显凋亡, 这与我们流式及 TUNEL 的检测结果一致; *Bax* 表达虽无显著变化, 但在同实验组中表达量明显高于 *Bcl-2*, 这与 *Bax* 作为原凋亡基因的属性一致。此外, 根据 *Bcl-2* 的变化结果我们推测, *Smad4* 可能作为上游基因调控 *Bcl-2* 表达进而作用于颗粒细胞凋亡。

综上所述, 本实验表明 RNAi 抑制 *Smad4* 表达可促进猪卵巢颗粒细胞凋亡, 还初步探讨了 *Smad4* 与 *Bcl-2*/*Bax* 的相关性, *Smad4* 调控 *Bcl-2* 表达可能是颗粒细胞凋亡的机制之一。

参考文献 (References)

- 1 张文岚, 邢德利. Smad 蛋白家族与 TGF- β 信号传导. 深圳中西医结合杂志 2003; 13(03): 178-80.
- 2 Kang HG, Chae MH, Park JM. Polymorphisms in TGF- β 1 gene and the risk of lung cancer. Lung Cancer 2006; 52(1): 1-7.
- 3 Maliekal TT, Antony ML, Nair AL. Loss of expression, and mutation of Smad 2 and Smad4 in human cervical cancer. Oncogene 2003; 22(31): 4889-97.
- 4 吴鹏, 田媛, 桂伶俐. RNA 干扰技术抑制 *Smad4* 基因表达对宫颈癌细胞增殖的影响. 肿瘤 2007; 27(3): 167-71.
- 5 曹阳, 黄晓园, 马全富. RNA 干扰技术抑制 *Smad4* 基因表达对 ECV304 细胞增殖和迁移的影响. 肿瘤 2008; 28(12): 1019-22.
- 6 Martin L, Laura M, Yvonne L. The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through toll-like receptor-2. Immunology 2003; 170 (5): 2409-16.
- 7 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 2001; 25(4): 402-8.
- 8 Deckers M, Dinther M, Buijs J. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. Cancer Res 2006; 66(4): 2202-9.
- 9 吴开杰, 张栋, 曾津. RNAi 沉默 *Smad4* 基因表达对前列腺细胞增殖的影响. 第三军医大学学报 2009; 31(13): 1250-3.
- 10 Huang S, Zhang F, Miao L. Lentiviral-mediated Smad4 RNAi induced anti-proliferation by p16 up-regulation and apoptosis by caspase 3 down-regulation in hepatoma SMMC-7721 cells. Oncol Rep 2008; 20(5): 1053-7.
- 11 苗竹林, 王自能, 程龙求, 章韵. *Smad4* 蛋白及 mRNA 在卵巢不同发育阶段的表达. 中国病理生理杂志 2005; 21(05): 1009-13.
- 12 黄晓卉, 张端莲, 张昌军. 卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白 *Bax* 的表达与妊娠的关系. 武汉大学学报 2003; 24(1): 41-3.
- 13 Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. IUBMB Life 2008; 60(6): 390-7.

Effects of Silencing *Smad4* Gene by Small Interfering RNA on Apoptosis of Porcine Granulosa Cells

Hai-Yan Zhang, Wei Wang, Yu He, Li Wang, Kuan-Xiao Tian, Xiao-Guang Song, Yin-Xue Xu*
(College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Smad protein family is an important member of TGF- β /Smad signal pathway in which *Smad4* plays a key role. In this study, RNAi was used to explore the effect of silencing *Smad4* gene expression on apoptosis of porcine Granulosa cells (PGC). Chemically synthesized small interference RNA targeting to *Smad4* was transfected into PGC using lipidosome. *Smad4* mRNA expression level was assayed by real-time fluorescence quantitative PCR technology. Cytoactive, apoptotic and apoptotic index were analyzed by MTT colorimetric analysis, TUNEL and flow cytometry, respectively. Expression level of Bcl-2 and Bax mRNA was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR technology. Based on these studies, *Smad4*-siRNA effectively silenced the expression of *Smad4* mRNA ($P < 0.01$). The cytoactive decreased (0.31 to 0.27), and the apoptotic rate increased (17.0% to 22.1%), the expression of Bcl-2 mRNA was significantly decreased. These results suggested that silencing *Smad4* gene can increase apoptosis of PGC, which possibly relate to regulation of the expression of Bcl-2.

Key words porcine Granulosa cells; *Smad4*; RNA interference; cell apoptosis

Received: November 9, 2009 Accepted: June 28, 2010

This work was supported by Hi-tech Research & Development Program of China (No.2006AA10Z136)

*Corresponding author. Tel: 86-25-84365362, E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn