

LncRNA SRA通过MEK/ERK/GATA4通路调控 KGN细胞系炎症作用的机制研究

徐芳¹ 梁锦铃² 潘紫萌² 马明³ 孙淼^{1*} 匡洪影^{1*}

(¹黑龙江中医药大学附属第一医院妇科二科, 哈尔滨 150040; ²黑龙江中医药大学第一临床医学院, 哈尔滨 150040;

³黑龙江中医药大学附属第一医院外科, 哈尔滨 150040)

摘要 该研究主要探究LncRNA SRA在PCOS卵巢局部炎症中的调控机制, 以及MEK/ERK/GATA4通路在此调控机制中的可能作用。选用人类卵巢颗粒细胞肿瘤细胞系KGN, 采用细胞转染技术, 将KGN分为未转染组(Control)、LncRNA SRA过表达空载体对照组(Vector)、LncRNA SRA过表达载体转染组(LncRNA SRA)、LncRNA SRA过表达空载体+PD98059处理组(MEK的抑制剂)(Vector+PD98059)、LncRNA SRA过表达载体+PD98059处理组(LncRNA SRA+PD98059)。采用RT-qPCR检测各组细胞中LncRNA SRA表达水平; MTT法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot检测cleaved-Caspase-3、Caspase-3、p-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、p-GATA4、GATA4、p-p65和SGMS2蛋白表达量; ELISA检测各组细胞中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 炎症因子表达水平。结果发现, 抑制MEK通路不仅能够抑制LncRNA SRA引起的KGN细胞增殖活力的升高、炎症反应和MEK/ERK/GATA4通路相关蛋白的高表达水平, 而且能够促进LncRNA SRA引起的KGN细胞中凋亡率的降低。这提示高表达LncRNA SRA可以降低KGN细胞的凋亡率, 且能够促进增殖并诱发炎症反应的发生, 而抑制MEK可以逆转此种反应现象的发生。这说明LncRNA SRA/MEK/ERK/GATA4通路可能是调控PCOS卵巢颗粒细胞局部炎症微环境的重要作用途径。

关键词 LncRNA SRA; MEK; KGN; 增殖; 凋亡; 炎症

Mechanism of LncRNA SRA Regulating Chronic Inflammation in KGN through MEK/ERK/GATA4 Pathway

XU Fang¹, LIANG Jinling², PAN Zimeng², MA Ming³, SUN Miao^{1*}, KUANG Hongying^{1*}

(¹Second Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; ²First Clinical Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

³Department of Surgery, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract The research purpose of this article was to explore the regulatory mechanism of LncRNA SRA in PCOS ovarian local inflammation and the possible role of MEK/ERK/GATA4 pathway in this regulatory mechanism. Human ovarian granulosa cell tumor cell line (KGN) was selected in this study. KGN was divided into non-transfected group (Control), LncRNA SRA overexpression control group (Vector), LncRNA SRA overexpression vector transfection group (LncRNA SRA), LncRNA SRA overexpression Vector+PD98059 treatment group (inhibi-

收稿日期: 2022-09-01 接受日期: 2023-01-16

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 82004401)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 82174195、82174422)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13704810319, E-mail: sunmiao82@163.com; Tel: 13766860387, E-mail: hyk20042@sina.com

Received: September 1, 2022 Accepted: January 16, 2023

This work was supported by the Youth Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82004401), and the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.82174195, 82174422)

*Corresponding authors. Tel: +86-13704810319, E-mail: sunmiao82@163.com; Tel: +86-13766860387, E-mail: hyk20042@sina.com

tor of MEK) (Vector+PD98059), and LncRNA SRA overexpression vector+PD98059 treatment group (LncRNA SRA+PD98059) by cell transfection technology. RT-qPCR was used to detect the expression level of LncRNA SRA in each group. MTT assay was used to detect cell proliferation. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The protein expression levels of cleaved-Caspase-3, Caspase-3, p-MEK1/2, MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2, p-GATA4, GATA4, p-p65 and SGMS2 were detected by Western blot. The expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β were detected by ELISA. The results showed that inhibition of MER pathway could not only reduce the increased proliferation and inflammation of KGN cells caused by LncRNA SRA and the high expression level of MEK/ERK/GATA4 pathway related proteins, but also increase the decreased apoptosis of KGN cells caused by LncRNA SRA. These results suggest that LncRNA SRA/MEK/ERK/GATA4 pathway may play an important role in regulating the local inflammatory microenvironment of PCOS ovarian granular cells.

Keywords LncRNA SRA; MEK; KGN; proliferation; apoptosis; inflammation

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性最常见的生殖内分泌疾病,其在全球育龄期女性中的发病率为5%~20%^[1]。PCOS在无排卵性不孕患者中占比可达75%以上,卵泡发育停止和排卵功能障碍往往是此类患者的主要特征^[2-3]。尽管许多研究者们进行了深入的研究,但PCOS卵泡发育异常和无排卵的病理机制仍不清楚。颗粒细胞(granular cells, GCs)是卵巢的主要功能细胞,参与类固醇分泌和卵泡发育^[4]。与正常人群相比,PCOS患者中与卵泡形成和排卵过程密切相关的GCs表现出异常的细胞死亡和增殖状态^[1]。最近的证据也表明,改善GCs相关的病理变化可以有效缓解PCOS的临床症状^[5]。证据表明PCOS是一种炎症代谢综合征^[6],炎症与PCOS诸多的病理表现互为因果^[7]。炎症可以影响卵巢动力学及排卵过程,其在PCOS卵巢局部微环境的病理改变中发挥了重要的调控作用^[8]。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)被定义为长度超过200个核苷酸的非编码RNA,大量证据表明,LncRNA在基因表达、胚胎发生、细胞增殖、分化和凋亡等各种重要生物学过程中发挥着至关重要的作用^[9-12]。LncRNA类固醇受体激活剂(lncRNA-steroid receptor RNA activator, LncRNA SRA)位于染色体5q31.3,由SR41基因编码,被LANZ等^[13]于1999年鉴定为LncRNA。其能够协调各种转录因子的功能并提高类固醇核受体,如雌激素受体 α 和雄激素受体^[14]依赖性基因的表达水平,作为一种独特的支架能够增强基因上类固醇受体的转录活性^[15]。目前研究表明,PCOS患者外周血白细胞中的LncRNA SRA基因表达水平升高^[16],且发现

PCOS患者LncRNA SRA的表达与体重指数呈显著正相关,提示LncRNA SRA可能是PCOS肥胖发生的重要介质,但其功能和参与PCOS的分子机制仍不清楚。

丝裂原活化蛋白激酶激酶1/2(mitogen-activated protein kinase kinase 1/2, MEK1/2)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的激酶,负责丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的活化,在细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用^[17],且MEK-ERK1/2通路是促炎分子产生和释放的重要介质^[18]。此外,MEK-ERK1/2信号通路可使锌指转录因子GATA4活化而促进其与下游基因启动子结合并激活其转录,调控细胞的生长^[19]。最新研究发现,LncRNA SRA与炎症的发展密切相关,LncRNA SRA可促进肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症相关因子的产生^[20]。而LncRNA SRA是否在PCOS卵巢局部炎症中发挥重要的调控作用是有待进一步阐明的,故此,本研究选用人类卵巢颗粒细胞肿瘤细胞系KGN,拟通过体外实验观察调控LncRNA SRA对KGN细胞炎症反应状态的影响,以及MEK/ERK/GATA4通路在此调控机制中的可能作用,为阐明PCOS卵巢局部炎症微环境的病理机制提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

KGN细胞株购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;DMEM/F-12培养基购于Biosharp公司;胎牛血清(货号11011-8611)购于四季青浙江天杭生物科

技股份有限公司; PD98059购于上海源叶生物科技有限公司; BeyoRT II M-MLV反转录酶购于上海碧云天生物技术有限公司; RNase inhibitor购于北京百泰克生物技术有限公司; 人源LncRNA SRA过表达载体及其阴性对照载体均购于通用生物系统(安徽)有限公司; MTT试剂盒、TNF- α 、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的ELISA检测试剂盒、MEK1/2人单克隆抗体、ERK1/2人单克隆抗体、p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)人单克隆抗体、p-p65人单克隆抗体、Caspase-3人单克隆抗体、活化型半胱氨酸蛋白酶3(cleaved-Caspase-3)人单克隆抗体、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V FITC/PI)凋亡检测试剂盒均购于沈阳万类生物科技有限公司; p-MEK1/2(Ser217/221)抗体购于Cell Signaling Technology公司; p-GATA4(Ser105)人单克隆抗体购于Affinity Biosciences公司; GATA4人单克隆抗体购于Proteintech公司; SGMS2人单克隆抗体购于Bioss公司。

1.2 细胞培养

将KGN细胞培养于DMEM/F-12培养基[培养基含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素], 37 °C、5% CO₂条件下培养。

1.3 细胞转染及分组

按照实验计划分组, 将培养至对数期的各细胞接种于6孔板中, 每孔约 4×10^5 个细胞, 在37 °C、5% CO₂的条件下培养。当细胞的密度达到70%融合时, 根据Lipofectamine 2000说明书将100 nmol/L的LncRNA SRA过表达载体及其阴性对照(LncRNA SRA vector)转染KGN细胞48 h后, 加入适宜的MEK抑制剂PD98059进行处理, 处理1 h后, 进行后续实验。实验分组设置为A: 未转染组(Control); B: LncRNA SRA过表达空载体对照组(Vector); C: LncRNA SRA过表达载体转染组(LncRNA SRA); D: LncRNA SRA过表达空载体+PD98059处理组(Vector+PD98059); E: LncRNA SRA过表达载体+PD98059处理组(LncRNA SRA+PD98059)。

1.4 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测LncRNA SRA表达水平

按照Trizol试剂说明书提取细胞总RNA, 分别使用miRNA逆转录试剂盒和PCR逆转录试剂盒合成cDNA, 按照试剂盒说明进行RT-qPCR扩增, 每个样本最少重复3次, 设置3个复孔, 反应体系包括: 2 μ L

反转录产物, 10 μ L SYBR Green Mix, 上下游引物各0.5 μ L, 7 μ L无菌水; 循环条件为94 °C预变性2 min, 94 °C变性10 s, 60 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 共40个循环; 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。LncRNA SRA以 β -actin为内参, 具体引物如下(5'→3'): LncRNA SRA正向引物序列为5'-AGT GGG CTG GAG GAA AGT-3', 反向引物序列为5'-GGG AAC CGA GGA TTA TGA A-3'; β -actin正向引物序列为5'-GGC ACC CAG CAC AAT GAA-3', 反向引物序列为5'-TAG AAG CAT TTG CGG TGG-3'。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.5 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)法筛选PD98059干预的适宜浓度并检测细胞增殖情况

按实验分组将细胞接种于96孔板中, 每孔细胞量为 5×10^3 个, 每组设置5个复孔, 待细胞贴壁后进行加药处理。以96孔板为例, 每孔加入浓度分别为0 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L的PD98059, 用含药血清定容至200 μ L, 之后将96孔板置于37 °C、5% CO₂的条件下培养1 h。将达到特定时间的各组细胞弃去培养基, 每孔加入20 μ L MTT染色液, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育4 h。小心吸去上清, 加入150 μ L Formazan溶解液, 直至Formazan全部溶解。在酶标仪上测定波长为570 nm处的D值, 进行数据分析, 计算半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 将筛选出的浓度值进行后续实验。

按实验计划分组将Control、Vector、LncRNA SRA、Vector+PD98059和LncRNA SRA+PD98059组细胞接种于96孔板中, 每孔细胞量为 5×10^3 个, 每组设置5个复孔, 细胞过夜培养后进行细胞转染, 转染48 h后, 将处于对数期的细胞1 500 r/min离心3 min后去掉上清, 沉淀用培养基重悬。吸取10 μ L细胞悬液, 进行细胞计数并根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度。在孔板加入适量PBS, 烘干后放进细胞培养箱中培养。细胞贴壁后, 取出96孔板, 每孔加入20 μ L的5 mg/mL MTT染色液, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育4 h。每孔加入150 μ L Formazan溶解液, 振荡混匀, 放入37 °C、5% CO₂培养箱孵育至少4 h, 直至Formazan全部溶解。在酶标仪上测定波长为570 nm处的D值, 进行数据分析。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组细胞, 预冷1 $\times$ PBS(4 °C)重悬细胞一

次, 2 000 r/min离心10 min后弃上清洗涤细胞, 加入500 μ L 1 $\times$ 结合液轻轻重悬细胞。取100 μ L细胞悬液, 按照Annexin V-FITC/PI双染法, 细胞凋亡检测试剂盒分别加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后, 避光, 室温孵育15 min, 上机前5 min再加入10 μ L Propidium Iodide染色, 混匀。之后再补加200 μ L 1 $\times$ 结合液, 随即采用流式细胞仪测量样品荧光强度, FlowJo_V10软件分析数据。

1.7 Western blot检测蛋白表达量

裂解液裂解蛋白, 蛋白定量后取适量蛋白和等体积上样缓冲液混合, 煮沸5 min使蛋白变性冷却至室温后备用。蛋白上样后, 于100 V、90 min的条件下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。快速将蛋白转移至PVDF膜后, 用含5%脱脂奶粉的封闭液室温孵育2 h。加入cleaved-Caspase-3(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、p-MEK1/2(1:1 000)、MEK1/2(1:500)、p-ERK1/2(1:500)、ERK1/2(1:1 000)、p-GATA4(1:1 000)、GATA4(1:400)、磷酸化核因子-p65(phosphorylated nuclear factor-p65, p-p65) (1:400)和鞘磷脂合酶(sphingomyelin synthase2, SGMS2) (1:400)抗体4 $^{\circ}$ C过夜孵育, 加入带标记的二抗(1:5 000) 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 避光用化学发光显色试剂盒进行显影, 以目的蛋白与内参蛋白 β -actin灰度值比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.8 ELISA检测炎症因子表达水平

取对数生长期的KGN细胞接种于6孔培养板中, 每孔加入含有10% FBS的2 mL培养基继续培养12 h, 待细胞融合至70%~80%时, 将细胞按实验要求分组, 培养48 h收集细胞, 每个样本中加入200 μ L PBS缓冲

液, 超声破碎, 1 500 r/min离心10 min去除沉淀物后收集上清液, 参照ELISA试剂盒说明进行逐步操作, 读取各组细胞在波长为450 nm处的吸光度(D)值, 以标品浓度(pg/mL)为纵坐标, 校准后的 D 为横坐标, 绘制标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算得到所测得细胞上清液标本中实际TNF α 、IL-6和IL-1 β 的浓度值。

1.9 统计学分析

数据统计使用IBM SPSS Statistics 21.0进行分析, 数据满足正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)的方式进行描述, 如数据具有方差齐性, 多组数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 检验水准为 $\alpha=0.05$, 当 $P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。使用GraphPad Prism 8(GraphPad Software, 美国)软件进行数据的统计学图片绘制。

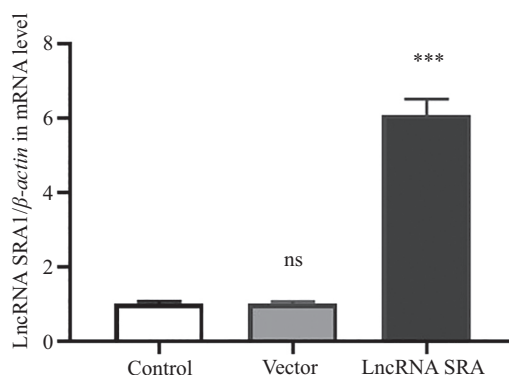
2 结果

2.1 LncRNA SRA过表达载体构建的验证

细胞转染24 h后, RT-qPCR检测各组细胞中LncRNA SRA的表达, LncRNA SRA组的LncRNA SRA的mRNA表达水平高于Control组和Vector组, $P<0.001$ (图1), 表明LncRNA SRA过表达载体构建成功。

2.2 细胞生长状况及形态学观察

加入MEK抑制剂PD98059处理KGN细胞1 h后观察到, Control组和Vector组的KGN细胞形态呈上皮细胞样, 表现为长梭形、多边形等不规则形态, 细胞之间以各自延伸的伪足相互交织连接, 细胞核呈



*** $P<0.001$, 与Control组相比; ns $P>0.05$, 与Control组相比。

*** $P<0.001$ compared with Control group; ns $P>0.05$ compared with Control group.

图1 LncRNA SRA过表达载体构建的验证

Fig.1 Validation of LncRNA SRA overexpression vector construction

圆形或椭圆形,细胞形态结构完整。LncRNA SRA组与正常组细胞相比,细胞密度稍大,细胞状态良好,细胞轮廓清晰。Vector+PD98059组与正常组细胞相比,细胞密度减小,细胞间连接消失,与周围的细胞脱离。LncRNA SRA+PD98059组与正常组和LncRNA SRA组细胞相比,细胞密度略小,细胞状态良好(图2)。

2.3 筛选并计算PD98059干预的适宜浓度

通过参考实验资料[21],分别予以KGN细胞0、5、10、20、50、100、200、400 μmol/L浓度的PD98059干预,测得细胞的D值分别为0.290±0.028、0.285±0.022、0.266±0.018、0.243±0.020、0.202±0.010、0.142±0.011、0.097±0.021和0.054±0.009(表1)。根据细胞的抑制率,我们计算得出PD98059干预KGN细胞

的IC₅₀值为107.7 μmol/L(图3),故此我们选择50 μmol/L作为后续实验中PD98059干预KGN细胞的适宜浓度值。

2.4 抑制MER通路能够抑制LncRNA SRA引起的KGN细胞增殖活力的升高

LncRNA SRA组的D值高于Control组($P<0.05$); Vector+PD98059组的D值低于Control组和LncRNA SRA组($P<0.05$); LncRNA SRA+PD98059组的D值低于LncRNA SRA组($P<0.05$),并高于Vector+PD98059组($P<0.05$),与Control组之间不具有统计学差异($P>0.05$)(图4)。

2.5 抑制MER通路能够促进LncRNA SRA引起的KGN细胞凋亡率的降低

LncRNA SRA组的凋亡率(图5A)及cleaved-

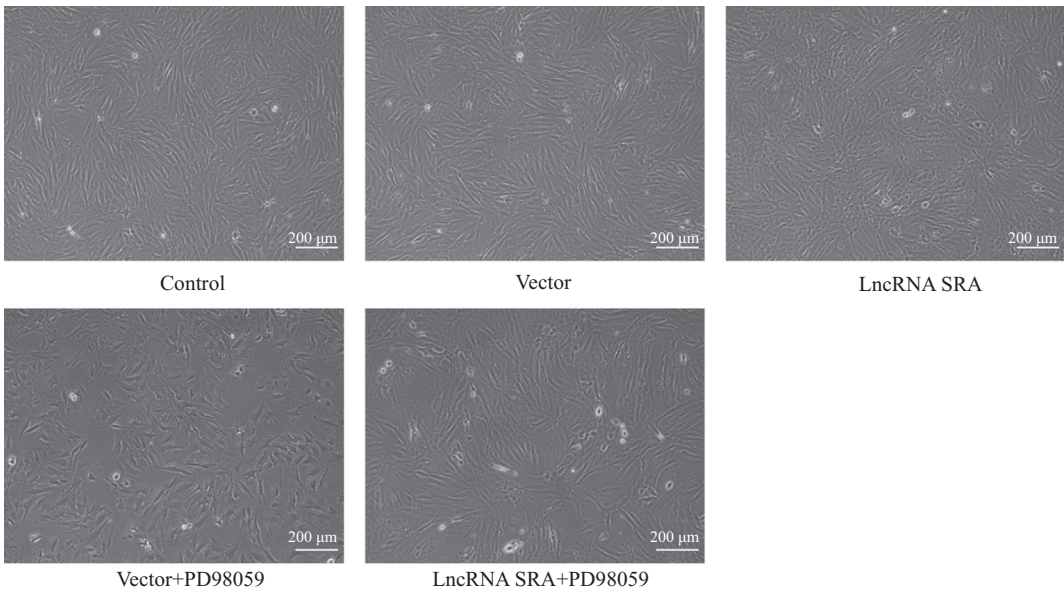


图2 各组细胞生长状态观察
Fig.2 Observation of cell growth status

表1 MTT检测不同浓度PD98059干预细胞的增殖情况

Table 1 MTT assay of PD98059 at different concentrations interfering with cell proliferation	
PD98059浓度值/μmol·L ⁻¹ PD98059 /μmol·L ⁻¹	D ₅₇₀
Control	0.290±0.028
5	0.285±0.022
10	0.266±0.018
20	0.243±0.020
50	0.202±0.010
100	0.142±0.011
200	0.097±0.021
400	0.054±0.009

n=5.

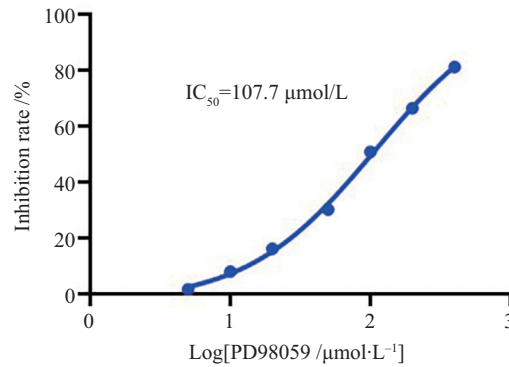
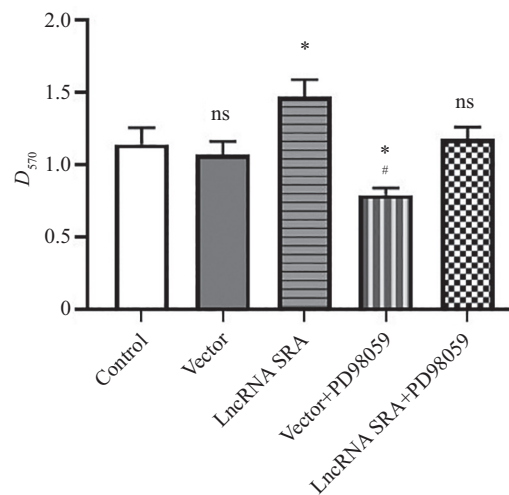


图3 计算PD98059干预细胞的 IC_{50} 图

Fig.3 Calculate the IC_{50} diagram of PD98059 intervention cells



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与LncRNA SRA组相比; ns $P > 0.05$, 与Control组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with LncRNA SRA group; ns $P > 0.05$ compared with Control group.

图4 MTT法检测各组KGN细胞的增殖情况

Fig.4 The proliferation of KGN cells was detected by MTT assay

Caspase-3蛋白(图5B)相对表达量低于Control组($P < 0.05$); Vector+PD98059组的凋亡率及cleaved-Caspase-3蛋白相对表达量均高于Control组($P < 0.05$); LncRNA SRA+PD98059组的凋亡率高于LncRNA SRA组($P < 0.05$), 并低于Vector+PD98059组($P < 0.05$), 与Control组之间不具有统计学差异($P > 0.05$); LncRNA SRA+PD98059组cleaved-Caspase-3蛋白相对表达量高于Control和LncRNA SRA组($P < 0.05$), 低于Vector+PD98059组($P < 0.05$)。各组间的Caspase-3蛋白相对表达量不具有统计学差异($P > 0.05$)(图5B)。

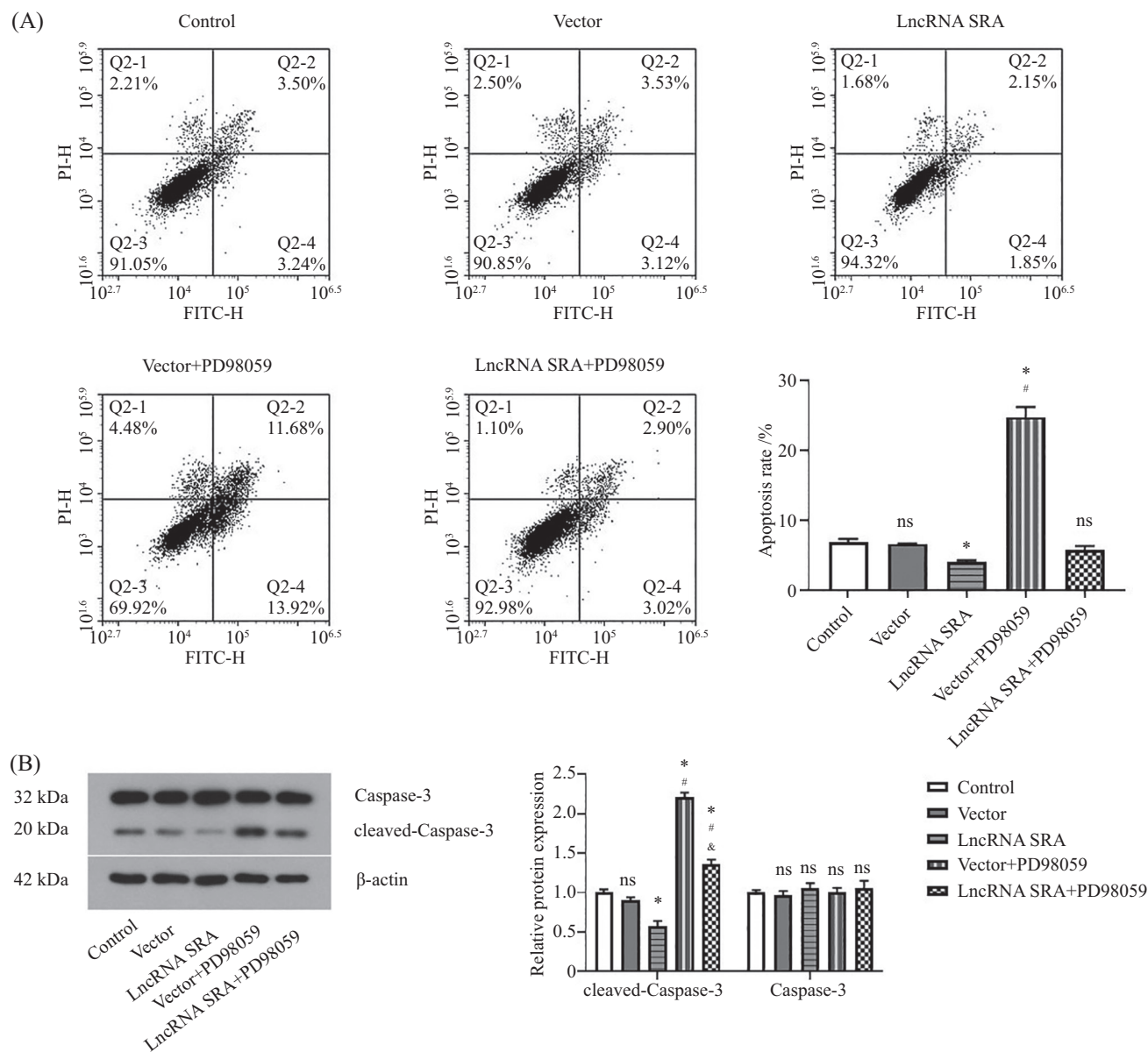
2.6 抑制MER通路能够降低LncRNA SRA引发的KGN细胞中MEK/ERK/GATA4蛋白的高表达水平

LncRNA SRA组 p-MEK、p-ERK、p-GATA4和GATA4蛋白相对表达量高于Control组($P < 0.05$);

Vector+PD98059组 p-MEK、p-ERK、p-GATA4和GATA4蛋白相对表达量低于Control组和LncRNA SRA组($P < 0.05$); LncRNA SRA+PD98059组 p-MEK和p-ERK蛋白相对表达量低于LncRNA SRA组($P < 0.05$), 高于Control和Vector+PD98059组($P < 0.05$)。LncRNA SRA+PD98059组 p-GATA4和GATA4蛋白相对表达量低于Control组和LncRNA SRA组($P < 0.05$); LncRNA SRA+PD98059组GATA4蛋白相对表达量高于Vector+PD98059组($P < 0.05$); 各组之间的MEK和ERK蛋白相对表达量间不存在统计学差异($P < 0.05$)(图6)。

2.7 抑制MER通路能够减轻LncRNA SRA引发的KGN细胞的炎症反应

Control组、Vector组与Vector+PD98059组之间的TNF- α 、IL-6与IL-1 β 的水平不具有统计学差异



A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: Western blot检测cleaved-Caspase-3和Caspase-3蛋白的表达。* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与LncRNA SRA组相比; & $P<0.05$, 与Vector+PD98059组相比; ns $P>0.05$, 与Control组相比。

A: flow cytometry detects cell apoptosis; B: Western blot detects the expression of cleaved-Caspase-3, Caspase-3 protein. * $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with LncRNA SRA group; & $P<0.05$ compared with Vector+PD98059; ns $P>0.05$ compared with Control group.

图5 抑制MER通路能够升高LncRNA SRA引起的KGN细胞中降低的凋亡率

Fig.5 Inhibition of MER pathway can increase decreased apoptosis rate in KGN cells induced by LncRNA SRA

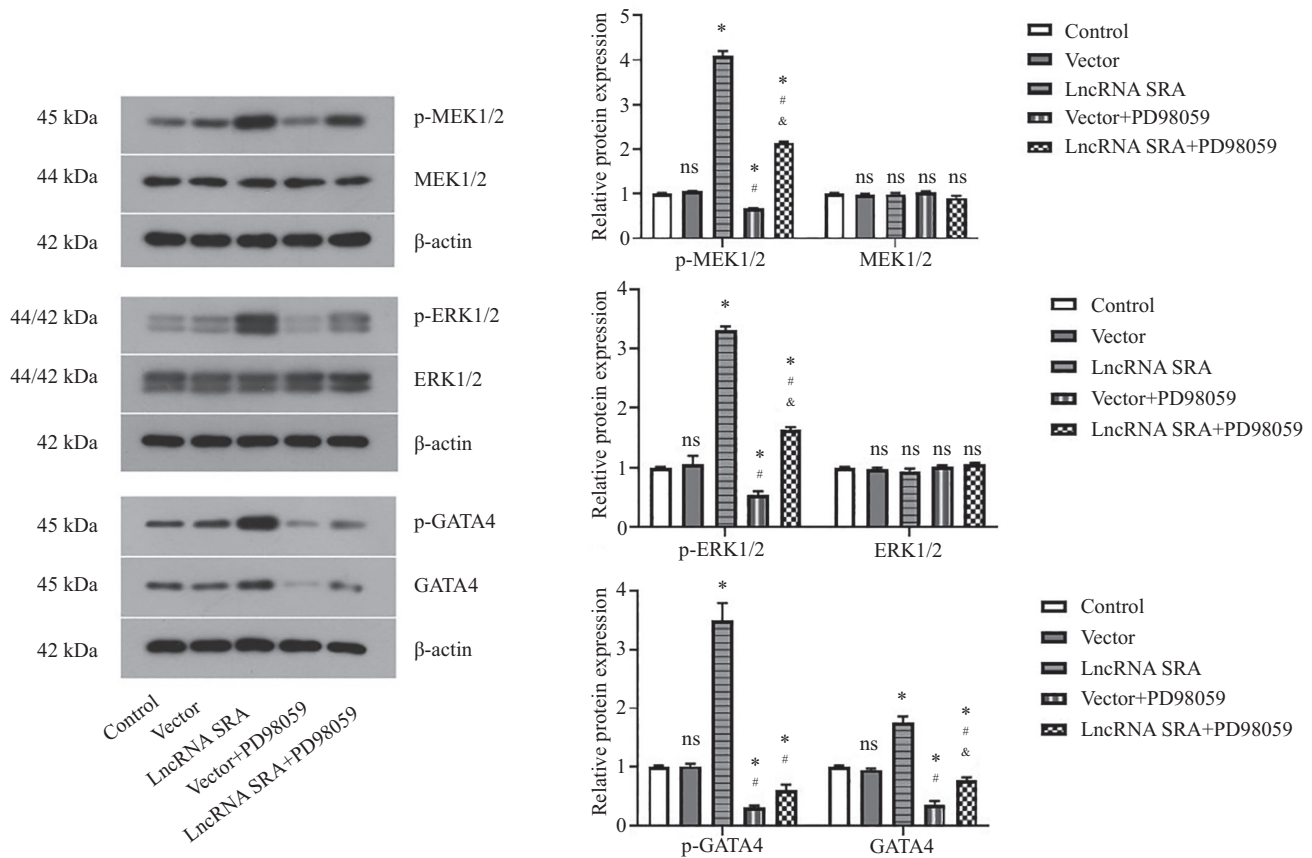
($P>0.05$)。LncRNA SRA组的TNF- α 、IL-6与IL-1 β 的水平均分别高于Control组($P<0.05$)和LncRNA SRA+PD98059组($P<0.05$)(表2)。

LncRNA SRA组p-p65和SGMS2蛋白相对表达量高于Control组($P<0.05$); Vector+PD98059组p-p65和SGMS2蛋白相对表达量低于Control组和LncRNA SRA组($P<0.05$); LncRNA SRA+PD98059组p-p65和SGMS2蛋白相对表达量低于LncRNA SRA组

($P<0.05$), 高于Control和Vector+PD98059组($P<0.05$)(图7)。

3 讨论

PCOS的临床表现具有高度异质性, 常由于卵泡发育成熟障碍、排卵功能障碍及高雄激素血症而导致患者不孕。此外, PCOS还增加了肥胖、高胰岛素血症及心血管等诸多代谢性疾病的患病风险^[22]。由



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与LncRNA SRA组相比; & $P < 0.05$, 与Vector+PD98059组相比; ns $P > 0.05$, 与Control组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with LncRNA SRA group; & $P < 0.05$ compared with Vector+PD98059 group; ns $P > 0.05$ compared with Control group.

图6 Western blot检测MEK/ERK/GATA4通路相关蛋白的表达
Fig.6 Western blot detects protein expressions of MEK/ERK/GATA4 signaling pathway

表2 ELISA检测各组炎症因子分泌水平
Table 2 ELISA detects secretion levels of inflammatory factors in each group

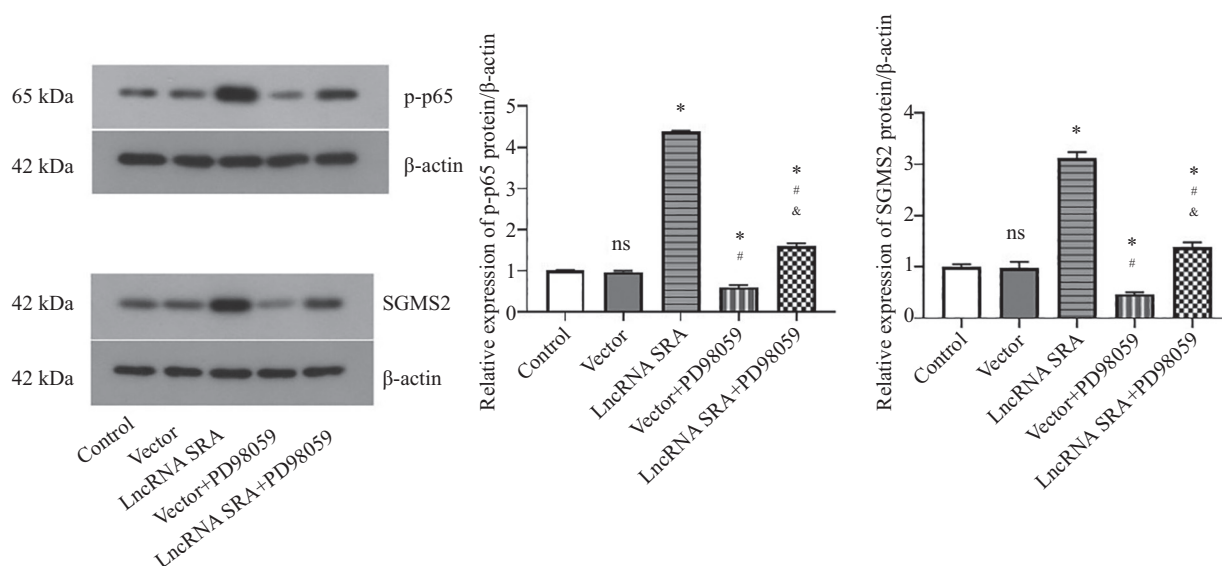
分组 Group	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6 /pg·mL ⁻¹	IL-1 β /pg·mL ⁻¹
Control	48.28±0.78	40.670±0.39	32.57±0.88
Vector	48.97±0.79	41.290±0.39	32.09±0.73
LncRNA SRA	87.13±1.26*	65.670±0.56*	65.55±1.09*
Vector+PD98059	45.36±0.79	39.280±0.39	30.27±1.01
LncRNA SRA+PD98059	58.56±1.07*#	48.645±0.56*#	42.56±1.18*#
F	973.88	1 663.41	664.32
P	0.00	0.00	0.00

* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与LncRNA SRA组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with LncRNA SRA group.

于PCOS发病机制至今尚未被完全阐明, 目前其治疗只是针对症状的缓解而不能治愈, 因此寻找理想的生物标志物以准确诊断和治疗本病一直是临床医师的一个巨大挑战。在过去的十年中, LncRNA被认为是基因表达的新的重要的调节因子, 其参与了诸多病理过程, 包括癌症^[23]、高血压^[24]、类风湿性关节

炎^[25]及肠道炎症等^[26]。本次体外实验研究创新性地以探究LncRNA SRA在PCOS卵巢局部炎症反应中的调控机制为出发点, 采用KGN为研究对象, 通过慢病毒转染技术构建高表达的LncRNA SRA的KGN模型, 结果发现高表达的LncRNA SRA能够升高KGN的增殖活力而抑制其凋亡, 并同时诱发炎症反应发生, 而



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与LncRNA SRA组相比; & $P < 0.05$, 与Vector+PD98059组相比; ns $P > 0.05$, 与Control组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control; # $P < 0.05$ compared with LncRNA SRA group; & $P < 0.05$ compared with Vector+PD98059 group; ns $P > 0.05$ compared with Control group.

图7 Western blot检测p-p65和SGMS2炎症相关蛋白的表达

Fig.7 Western blot detects inflammation related protein expressions of p-p65 and SGMS2

此调控机制能够通过抑制MER/ERK/GATA4信号通路而得到逆转。因此本次实验结果提示, LncRNA SRA/MER/ERK/GATA4信号通路可能是诱发PCOS卵巢局部炎症反应的一种可能的作用途径。

最初认为LncRNA SRA充当RNA共激活剂以增强类固醇核受体依赖性基因的表达, 随后其被证明可作为非类固醇核受体RNA激活剂, 不仅在正常生物学过程如增殖、凋亡、脂肪生成、类固醇生成、肌肉生成和胰岛素信号调控中发挥着不同的作用, 而且在乳腺癌、前列腺癌、心脏发育异常和生殖功能低下等疾病中也发挥着调控作用^[14-15]。LIU等^[16]的研究发现, 与健康对照组相比, PCOS患者外周血白细胞中的LncRNA SRA显著上调, 并且, LI等^[27]发现在小鼠卵巢颗粒细胞中上调LncRNA SRA的表达可刺激细胞生长, 改变细胞周期, 抑制细胞凋亡。同时, 将含有LncRNA SRA特异性shRNA的慢病毒注射在脱氢表雄酮诱导的PCOS模型小鼠卵巢局部后观察到, LncRNA SRA的沉默提高了PCOS模型小鼠的胰岛素释放能力, 减轻了卵巢损伤, 并减少了血管生成因子的产生。此外, 靶向沉默LncRNA SRA抑制了PCOS小鼠卵巢和原代颗粒细胞中脱氢表雄酮诱导的促炎细胞因子产生和核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)核转位现象的发生^[5]。这与本实验中观察的过表达LncRNA SRA后KGN细胞的增殖能

力升高、凋亡现象减少及高反应的促炎状态的诱发等结果一致, 说明LncRNA SRA可能是PCOS卵巢局部炎症反应发生的又一重要调控因子。

MEK1/2主要通过激活ERK级联在细胞增殖、分化和发育中发挥重要作用^[28]。MEK1/2-ERK1/2信号通路是细胞内广泛分布的MAPK通路家族中最具特征的通路之一^[29]。MEK基因编码MAPK途径中的关键蛋白, 当MEK1/2被激活时, 其会引发下游ERK1/2磷酸化其底物, 导致细胞增殖等生物学变化的发生^[30]。证据表明ERK1/2信号级联在排卵中发挥着重要的调节作用, GCs中ERK1/2级联基因缺失的小鼠是不育的, 其卵母细胞减数分裂成熟、卵丘扩张和卵泡破裂等过程是被完全抑制的^[31]。此外, 现有研究还表明抑制ERK1/2的激活有助于减少过敏性炎症的反应强度^[32], 且研究人员发现抑制ERK1/2可以减缓IL-6和IL-8的过量产生, 以限制炎症反应状态^[33]。本研究发现LncRNA SRA高表达会诱发MEK1/2及ERK1/2磷酸化水平的增加, 同时也伴随着KGN细胞增殖活力的增高和炎症反应水平的增加, 说明LncRNA SRA可能是诱发MEK1/2及ERK1/2磷酸化反应和炎症发生的上游调控因子之一。PD98059是一种黄酮衍生物, 应用较为广泛的MEK抑制剂, 可抑制MEK底物ERK1/2的磷酸化^[34-35]。故此, 本研究选用PD98059作为MEK的抑制剂, 研究结果发现, 抑制MEK能够逆

转LncRNA SRA所引发的增殖及炎症反应的发生,并升高KGN细胞的凋亡率,此结果提示,MEK不仅是LncRNA SRA调控KGN细胞炎症反应中一个重要的下游调控靶点,也说明MEK1/2-ERK1/2信号通路在此调控机制中的正向调控关系。

综上所述,高表达LncRNA SRA虽可以抑制KGN细胞的凋亡现象,但也能够促进其增殖并诱发炎症反应的发生,而抑制MEK可以逆转此反应现象。LncRNA SRA/MEK/ERK/GATA4通路可能是调控PCOS卵巢颗粒细胞局部炎症微环境的重要作用途径,但仍需要进一步的体内和临床试验探究及验证LncRNA SRA在PCOS卵巢病理机制中可能的具体作用机制。

参考文献 (References)

- [1] LIU J, DING J, QU B, et al. CircPSMC3 alleviates the symptoms of PCOS by sponging miR-296-3p and regulating PTEN expression [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 11001-11.
- [2] HUGHESDONP E. Morphology and morphogenesis of the stein-leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis" [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 1982, 37(2): 59-77.
- [3] ZHOU R, LI S, LIU J, et al. Up-regulated FHL2 inhibits ovulation through interacting with androgen receptor and ERK1/2 in Polycystic ovary syndrome [J]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102635.
- [4] HAVELOCK J C, RAINEY W E, CARR B R. Ovarian granulosa cell lines [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 228(1/2): 67-78.
- [5] LI Y, ZHAO W, WANG H, et al. Silencing of LncRNA steroid receptor RNA activator attenuates polycystic ovary syndrome in mice [J]. *Biochimie*, 2019, 157: 48-56.
- [6] DPRABHU Y, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. γ -linolenic acid ameliorates DHEA induced pro-inflammatory response in polycystic ovary syndrome via PPAR- γ signaling in rats [J]. *Reprod Biol*, 2020, 20(3): 348-56.
- [7] ABOELDALYL S, JAMES C, SEYAM E, et al. The role of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome-a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2734.
- [8] ROSTAMTABAR M, ESMAEILZADEH S, TOURANI M, et al. Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 824-38.
- [9] ABDUL S, MAJID A, WANG J, et al. Bidirectional interaction of lncRNA AFAP1-AS1 and CRKL accelerates the proliferative and metastatic abilities of hepatocarcinoma cells [J]. *J Adv Res*, 2020, 24: 121-30.
- [10] SUN X, WANG T, WANG Y, et al. Downregulation of lncRNA-11496 in the brain contributes to microglia apoptosis via regulation of Mef2c in chronic *T. gondii* infection mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 77.
- [11] ZHAO X, JIE X, GAO Y K, et al. Long non-coding RNA CACNA1G-AS1 promotes proliferation and invasion and inhibits apoptosis by regulating expression of miR-205 in human keloid fibroblasts [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20192839.
- [12] HONG H, SUI C, QIAN T, et al. Long noncoding RNA LINC00460 conduces to tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through miR-342-3p-dependent AGR2 up-regulation [J]. *Aging*, 2020, 12(11): 10544-55.
- [13] LANZ R B, MCKENNA N J, ONATE S A, et al. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex [J]. *Cell*, 1999, 97(1): 17-27.
- [14] CHEN G, YU D, NIAN X, et al. LncRNA SRA promotes hepatic steatosis through repressing the expression of adipose triglyceride lipase (ATGL) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35531.
- [15] KIM H J, KIM L K, LEE S H, et al. Expression levels of the long noncoding RNA steroid receptor activator promote cell proliferation and invasion and predict patient prognosis in human cervical cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5410-8.
- [16] LIU Z, HAO C, HUANG X, et al. Peripheral blood leukocyte expression level of lncRNA steroid receptor RNA activator (SRA) and its association with polycystic ovary syndrome: a case control study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(5): 363-8.
- [17] ABDULMALEK S, ELDALA A, AWAD D, et al. Ameliorative effect of curcumin and zinc oxide nanoparticles on multiple mechanisms in obese rats with induced type 2 diabetes [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20677.
- [18] SHI Y, ZHOU M, YAN J, et al. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline mitigates experimental colitis through inhibition of intestinal mucosal inflammatory responses via MEK-ERK signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 593.
- [19] LIANG Q, WIESE R J, BUENO O F, et al. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(21): 7460-9.
- [20] YANG S, SUN J. LncRNA SRA deregulation contributes to the development of atherosclerosis by causing dysfunction of endothelial cells through repressing the expression of adipose triglyceride lipase [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5207-14.
- [21] ZHAO K K, CUI Y G, JIANG Y Q, et al. Effect of HSP10 on apoptosis induced by testosterone in cultured mouse ovarian granulosa cells [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 171(2): 301-6.
- [22] ADEYANJU O A, FALODUN T O, FABUNMI O A, et al. Very low dose spironolactone protects experimentally-induced polycystic ovarian syndrome from insulin-resistant metabolic disturbances by suppressing elevated circulating testosterone [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 310: 108742.
- [23] YAN H, CHAI H, ZHAO H. Detecting lncRNA-cancer associations by combining miRNAs, genes, and prognosis with matrix factorization [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 639872.
- [24] PENG W, CAO H, LIU K, et al. Identification of lncRNA-NR_104160 as a biomarker and construction of a lncRNA-related ceRNA network for essential hypertension [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(10): 6060-75.
- [25] LIANG J, CHEN W, LIN J. LncRNA: an all-rounder in rheumatoid arthritis [J]. *J Transl Int Med*, 2019, 7(1): 3-9.
- [26] PAN S, LIU R, WU X, et al. LncRNA NEAT1 mediates intestinal inflammation by regulating TNFRSF1B [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(9): 773.
- [27] 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: 2384-90.
- [28] LU M, WANG Y, ZHAN X. The MAPK pathway-based drug therapeutic targets in pituitary adenomas [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 330.
- [29] SZYBOWSKAP, KOSTAS M, WESCHE J, et al. Cancer mutations in FGFR2 prevent a negative feedback loop mediated by the ERK1/2 pathway [J]. *Cells*, 2019, 8(6): 518.
- [30] WANG J, ZHOU J Y, WU G S. BimProtein degradation contributes to cisplatin resistance [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(25): 22384-92.
- [31] FAN H Y, LIU Z, SHIMADA M, et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility [J]. *Science*, 2009, 324(5929): 938-41.
- [32] EL-HASHIM A Z, RENNO W M, RAGHUPATHY R, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF- κ B-dependent pathways [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(6): 1964-76.
- [33] SARKARP, SAHA T, SHEIKH I A, et al. Zinc ameliorates intestinal barrier dysfunctions in shigellosis by reinstating claudin-2 and -4 on the membranes [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316(2): G229-46.
- [34] LEE H R, LEE J, KIM H J. Differential effects of MEK inhibitors on rat neural stem cell differentiation: repressive roles of MEK2 in neurogenesis and induction of astrocytogenesis by PD98059 [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 149: 104466.
- [35] LEE H R, KANG J M, KIM Y M, et al. Functional group-dependent induction of astrocytogenesis and neurogenesis by flavone derivatives [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 812.