

# Bcl-2 基因 RNA 干扰对体外培养的鹅卵泡颗粒细胞凋亡、增殖和孕激素分泌的影响

陈秀萍<sup>1</sup>, 陈锋剑<sup>2</sup>, 姜勋平<sup>2</sup>, 李兆国<sup>3</sup>, 丁家桐<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 华中农业大学动物科技学院,

武汉 430070; 3. 山东省莱阳市羊郡中心中学, 莱阳 265224)

**摘要:** 根据已发表的 *Bcl-2* 基因序列设计 3 对 siRNA (Small interference RNA) 序列, 构建干扰表达载体, 转染体外培养的鹅卵泡颗粒细胞, 48 h 后利用流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 检测颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达量、凋亡和增殖情况, 收集细胞培养液用放射免疫分析法检测孕激素 (P) 的分泌水平; 此外, 还检测了 F<sub>1</sub> ~ F<sub>4</sub> 卵泡、最小的排卵前卵泡 (The smallest preovulatory follicle, SPF)、小黄卵泡 (Small yellow follicle, SYF) 和闭锁卵泡 (Atresic follicle) 颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达和凋亡情况。结果表明: (1) 各级卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白的表达存在着差异, 正常卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达量显著高于闭锁卵泡 ( $P < 0.05$ ), SPF 颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 SYF ( $P < 0.05$ ); (2) 干扰组 Bcl-2 蛋白表达水平显著低于所有对照组 ( $P < 0.05$ ), 而细胞凋亡指数 (Apoptosis index, AI)、增殖指数 (Proliferation index, PI) 和 P 分泌水平均高于对照组。

**关键词:** *Bcl-2* 基因; RNA 干扰; 颗粒细胞凋亡; 孕激素

中图分类号: S835.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)03-0296-06

## Effects of *Bcl-2* Gene Interference on the Apoptosis, Proliferation and Progesterone Secretion of Goose Follicular Granulosa Cells

CHEN Xiu-ping<sup>1</sup>, CHEN Feng-jian<sup>2</sup>, JIANG Xun-ping<sup>2</sup>, LI Zhao-guo<sup>3</sup>, DING Jia-tong<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University,

Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Huazhong

Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Yangjun Central Middle School, Laiyang 265224, China)

**Abstract:** According to the published sequences, three siRNAs (Small interference RNA) were designed, and expression vectors were constructed and transfected into goose granulosa cells cultured *in vitro*. The expression level of Bcl-2 protein, apoptosis and proliferation of granulosa cells were analyzed by flow cytometry 48 h after the transfection, and the progesterone (P) in the medium was assayed using RIA. Meanwhile, apoptosis indexes and Bcl-2 protein level of follicular granulosa cells with different rank were also analyzed. Our results indicated that: (1) Levels of Bcl-2 protein in follicular granulosa cells with different rank were different, the highest expression level was observed in the smallest preovulatory follicle (SPY), and levels of Bcl-2 protein in the healthy follicles were significant higher than that in atresic follicles ( $P < 0.05$ ); (2) Bcl-2 protein levels of test groups were significant lower than that of control ( $P < 0.05$ ), while apoptosis indexes (AI), proliferation indexes (PI) and P secretion of test groups were higher than that of control ( $P < 0.05$ ).

收稿日期: 2007-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300253); 武汉市青年科技晨光计划 (20065004116-25)

作者简介: 陈秀萍 (1980-), 女, 江苏南京人, 博士, 主要从事胚胎生物工程与动物繁殖方面的研究, E-mail: cxp\_yuan@163.com

\* 通讯作者: 丁家桐, 教授, 博士生导师, E-mail: jtding@yzu.edu.cn

**Key words:** *Bcl-2*; RNA interference; apoptotic granulosa cell; progesterone

禽类卵巢上大量的原始卵泡只有极少数能够发育成熟并排卵,约 99% 的卵泡发生闭锁(Follicular atresia)。禽类卵泡闭锁主要通过细胞凋亡(Apoptosis)实现,在发育卵泡中如果 10% 以上的颗粒细胞发生凋亡,那么该卵泡注定发生闭锁<sup>[1-2]</sup>。细胞凋亡是细胞在基因严格控制下的自我消亡,涉及多个基因顺序表达的调控网络。*Bcl-2* 基因是这个基因网络中至关重要的一员。它是一个凋亡抑制基因,可能通过抑制颗粒细胞凋亡而有利于卵泡发育。例如,卵泡颗粒细胞特异性表达 *Bcl-2* 基因的转基因小鼠,排卵数和窝产仔数明显高于普通小鼠,而 *Bcl-2* 基因敲除小鼠卵泡数显著减少<sup>[3]</sup>。

RNA 干扰是通过 dsRNA 介导特异性地降解相应序列的 mRNA,从而阻断相应基因表达的转录后水平。研究者使用不同的 *Bcl-2* 基因干扰体系,研究了该基因在肿瘤细胞的效应,表明该基因的下调可以促进多种肿瘤细胞的凋亡<sup>[4-6]</sup>。目前,*Bcl-2* 基因对鹅卵泡颗粒细胞的作用还不清楚。为此,本试验通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的方法使该基因发生转录后沉默,测定在该基因低表达的情况下颗粒细胞凋亡、增殖和分泌激素的情况,从而研究该基因在颗粒细胞中的功能。另外,鹅是重要的草食家禽,但是其产蛋量低,繁殖成本高是影响其规模化生产效益的瓶颈。本试验还将为利用转基因技术或 RNA 干扰技术提高禽类卵泡利用率的可能性提供理论基础和试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鹅和试剂

从扬州种鹅场选购年龄、体重一致、健康的、正处于产蛋期的扬州鹅 7 只,圈养,自由采食和饮水,

psiRNA<sub>1</sub>: S: 5'-GATCCGTTGTACGGCAACAGTATGATCAAGAGATCATACTGTTGCCGTACAATTTTTAAGCTTG-3',  
A: 3'-GCAACATGCCGTTGTCATACTAAGTTCTCTAGTATGACAACGGCATGTTAAAAAATTCGAACCTAA-5'.  
psiRNA<sub>2</sub>: S: 5'-GATCCGCTGGATCCAGGACAACGGATTCAAGAGATCCGTTGTCTGGATCCAGTTTTTAAGCTTG-3',  
A: 3'-GCGAC CTAGGTCCTGTTGCTAAGTTCTCTAGTATGACAACGGCATGTTAAAAAATTCGAACCTAA-5'.  
psiRNA<sub>3</sub>: S: 5'-GATCCAGACCTACCTGCTTACACTTTCAAGAGAAGTGTAAGCAGGTAGGTCTTTTTTAAGCTTG-3',  
A: 3'-GTCTGGATGGACGAATGTGAAAGTTCTCTCATTTCATCCATCCAGAAAAAATTCGAACCTAA-5'.  
阴性对照: S: 5'-GATCCGCTTATAAAGGCGCATAGCTTCAAGAGAGCTATGCCCTTATGAAGCTTTTTTAAGCTTG-3',  
A: 3'-GCGAAGTATCCGCGTATCGAAGTTCTCTCGATACCGGAATACTTCGAAAAAATTCGAACCTAA-5'.

1.3.2 干扰载体 psiRNA-Bcl-2 的构建 将设计好的 4 对序列送宝生物公司合成,合成产物加入灭菌

并做产蛋时间的记录。限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III,质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒均购自大连宝生物;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;小鼠抗人 *Bcl-2* 抗体、羊抗小鼠 IgG-FITC 抗体购自武汉博士德公司;孕酮放免检测试剂盒购自北京科美,PI 染液购自 Sigma 公司,胶原酶 II 型、胰蛋白酶、DMEM 培养基是 Gibco 公司的产品,胎牛血清购自杭州四季青,其它为国产分析纯试剂。

### 1.2 载体及菌种

RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen (7.35 kb)载体由华中农业大学郑嵘博士提供,含有绿色荧光蛋白和 U6 启动子,为了便于酶切鉴定在 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点间插入一段 750 bp 的序列(将该质粒命名为 psiRNA<sub>750</sub>);鸡 JLV-Bcl-2 质粒(作为阳性对照)由南京农业大学周冬蕊博士提供, DH5 $\alpha$  本室保存。

### 1.3 干扰载体的构建

1.3.1 siRNA 的设计 根据 GenBank 中已发表的序列(D11381, D11382),用 Ambion 的设计软件并按照设计原则<sup>[7]</sup>针对 *Bcl-2* 基因设计 3 对特异性干扰序列,另外根据载体的特性分别在序列前后添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点,而且如果连接后的载体进行双酶切鉴定,将出现一条 6.6 kb 和 66 bp 的条带,66 bp 的条带电泳很难看出,而且单双酶切也很难区分。而在原载体上存在 1 个 *Hind* III 酶切位点,故在序列 3' 端引入 1 个 *Hind* III 酶切位点,这样酶切鉴定将出现 4.1 kb 和 2.5 kb 两条带,而 psiRNA<sub>750</sub> 用 *Hind* III 酶切只出现一条 7.35 kb 的条带。此外设置一个非特异性对照,分别命名为 psiRNA<sub>1</sub>、psiRNA<sub>2</sub>、psiRNA<sub>3</sub>、阴性对照,各组序列如下:

水使其终浓度为 20 pmol/ $\mu$ L。退火反应体系如下:灭菌水 40  $\mu$ L, Oligo-sense 和 Oligo-antisense 各 5

$\mu\text{L}$ , 共  $50 \mu\text{L}$ , 混匀, 将各管置于  $94^\circ\text{C}$  水浴锅中  $5 \text{ min}$ , 然后让其缓慢冷却至室温, 冷却速度约  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ , 使其退火结合形成 dsDNA, 将回收的 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen 载体与退火产物按照  $1:5$  摩尔比均匀混合, 用 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取菌落, 小提质粒, 用 *Hind* III 酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒送宝生物测序。对测序正确的质粒用超纯质粒中量提取试剂盒(去内毒素)提取, 并用分光光度计测定所提质粒浓度。

#### 1.4 颗粒细胞的分离和培养

取连产  $3\sim4$  枚鹅蛋的扬州鹅, 在其产蛋前约  $1\sim3 \text{ h}$  剖腹采集各级卵泡, 然后立即置于预冷、加有抗生素的生理盐水中。卵泡的闭锁按表型来区分, 正常的卵泡呈卵圆形、表面光滑、血管丰富, 而闭锁卵泡表面坍塌、形状不规则、表面有溢血现象。

分离颗粒细胞层, 将剥离的颗粒细胞立即置于无菌的 Hank's 液中, 漂洗  $2\sim3$  次, 然后用剪刀剪碎。用滴管将其吸至离心管中静置, 吸掉上清, 加入  $1\%$  胶原酶 II 型 ( $2 \text{ mL}$  胶原酶 II 型/ $500 \text{ mg}$  组织)  $37^\circ\text{C}$  消化  $5\sim7 \text{ min}$ , 吹打数次, 至组织块刚好消散, 用胎牛血清终止反应,  $200$  目网筛过滤后收集颗粒细胞,  $900 \text{ r}/\text{min}$  离心  $8 \text{ min}$ , 弃上清, 部分细胞用于培养, 部分细胞用终浓度为  $70\%$  乙醇固定,  $-20^\circ\text{C}$  固定备用。用于培养的细胞, 台盼兰染色镜检活细胞数在  $90\%$  以上, 用含  $10\%$  胎牛血清的 DMEM, 按  $(2\sim5)\times 10^5$  密度接种于  $6$  孔培养板, 置于  $38.5^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱内培养。

#### 1.5 转染

按照转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书进行, 具体为: 当细胞长至  $60\%\sim 80\%$  汇合时开始转染, 每孔加入  $4 \mu\text{g}$  质粒和  $10 \mu\text{L}$  转染试剂, 转染  $4\sim6 \text{ h}$  后换掉培养基, 用不含血清的 DMEM ( $2 \text{ mmol}/\text{L}$  谷氨酰胺,  $5.5\times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,  $4\times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$  非必须氨基酸,  $1 \text{ mmol}/\text{L}$  丙酮酸钠) 继续培养,  $48 \text{ h}$  后在荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.6 干扰效果的鉴定

颗粒细胞转染  $48 \text{ h}$  后, 胰酶消化,  $70\%$  乙醇固定, 用流式细胞术检测颗粒细胞 Bcl-2 蛋白质表达水平、细胞凋亡和增殖情况。流式细胞仪为美国 BD 公司产品, 型号为 FACS Aria。

1.6.1 颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达的检测 固定后的颗粒细胞(约  $5\times 10^5$  个),  $1000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ ,

去除固定液, 加入含  $0.25\%$  TritonX-100 的  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  PBS(pH  $7.2\sim 7.4$ ) 冰上通透  $5 \text{ min}$ , 离心去上清, 用  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  PBS 洗  $1$  遍, 加封闭液(含  $1\%$  BSA 的  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  PBS) 封闭  $1 \text{ h}$ , 以封闭非特异性结合蛋白。加入以封闭液稀释的小鼠抗人 Bcl-2 抗体 ( $1:150$  稀释),  $37^\circ\text{C}$  孵育  $30 \text{ min}$ 。离心去除上清, 加  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  PBS 以洗去未结合的抗体。加羊抗小鼠 IgG-FITC ( $1:64$  稀释),  $37^\circ\text{C}$  避光孵育  $30 \text{ min}$ , 用  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  PBS 洗去多余的二抗。加  $0.5 \text{ mL}$  PBS, 调节细胞密度上机检测, 同时以用 PBS 代替一抗的细胞做阴性对照, 用 BD Cell Quest 软件分析 Bcl-2 蛋白相对表达水平, 用下述计算公式表示:  $\text{Bcl-2 蛋白水平} = \text{试验组平均荧光强度} - \text{阴性对照荧光强度}$ 。

1.6.2 颗粒细胞凋亡和增殖检测 取固定后的颗粒细胞约  $(2\sim 5)\times 10^5$  个,  $1000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $5 \text{ min}$ , 去除固定液, 用 PBS(含  $0.25\%$  TritonX-100) 洗  $2$  遍, 加  $100 \mu\text{L}$  RNase A ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ )  $37^\circ\text{C}$  水浴  $30 \text{ min}$ , 再加入  $400 \mu\text{L}$  PI ( $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色液混匀,  $4^\circ\text{C}$  避光  $30 \text{ min}$  上机检测。凋亡指数 (Apoptosis index, AI) =  $\text{AP}/\text{total}$ , 增殖指数 (Proliferation index, PI) =  $(\text{S} + \text{G}_2)/(\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2) \times 100\%$ 。

1.6.3 孕激素的测定 收集培养液,  $-20^\circ\text{C}$  保存, 用放射免疫试剂盒检测培养液中 P 含量。

#### 1.7 数据分析

所有数据均用平均数士标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SAS 统计软件处理, 差异显著性用多重比较的方法进行分析。

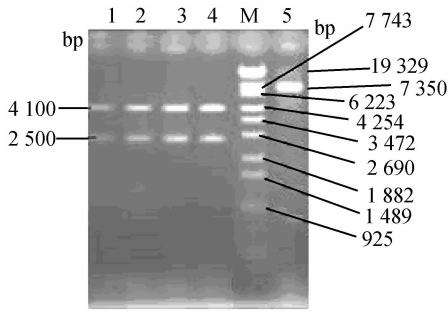
## 2 结果与分析

### 2.1 干扰载体的酶切鉴定

干扰载体上面只有  $1$  个 *Hind* III 位点, 故用 *Hind* III 酶切只出现  $1$  条  $7.35 \text{ kb}$  的条带。而我们设计的干扰序列里引入了 *Hind* III 位点, 如果插入序列与载体相连后再用 *Hind* III 酶切将出现  $4.1$  和  $2.5 \text{ kb}$  两条带。图 1 证实本研究插入片段与载体相连, 初步说明构建是成功的。宝生物公司的测序结果证实插入序列即是目的片段。

### 2.2 Bcl-2 基因 RNA 干扰质粒的转染效率

采用带有绿色荧光标记的表达载体, 可以通过荧光标记很容易观察到载体的转染效率, 同时荧光蛋白的表达与 shRNA 的表达是独立的, 因此不影响 shRNA 基因沉默的效果。本试验显示



1. psiRNA<sub>b1</sub>; 2. psiRNA<sub>b2</sub>; 3. psiRNA<sub>b3</sub>; 4. Negative control; M.  $\lambda$ -EcoT14 I digest marker; 5. psiRNA<sub>750</sub>

图 1 干扰载体的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of expression vector by restriction endonucleases digestion

RNA 干扰组呈现出绿色荧光, 而空白对照则不发光, 表明本研究构建的载体在颗粒细胞内成功表达, 而且从正常光和荧光下比较可以看出, 转染效率在 85% 以上。

### 2.3 各级卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达及凋亡

卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达量和凋亡情况见表 1。最小的排卵前卵泡 (SPF) 的 Bcl-2 表达显著高于其它各类卵泡 ( $P < 0.05$ ), 而闭锁卵泡的 Bcl-2

表达是最少的, 仅相当于 SPF 卵泡表达量的 5.68%。在 F<sub>1</sub>~F<sub>4</sub> 和 SYF 这 5 类卵泡中, 随着鹅卵泡增大, 卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白的表达呈上升趋势, 与之对应的颗粒细胞的凋亡指数呈下降趋势。也就是说, Bcl-2 蛋白表达量增加, 颗粒细胞的凋亡比例降低。闭锁卵泡的颗粒细胞凋亡指数显著高于其他各级卵泡, 是 SYF 的 3.6 倍, 是 F<sub>1</sub>~F<sub>4</sub> 的 6~20 倍。

表 1 各级卵泡颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达量和凋亡指数  
Table 1 Bcl-2 protein expression and apoptosis of follicular granulosa cells with different rank

卵泡级别 Follicular rank	Bcl-2 表达水平 Bcl-2 protein level, BP	凋亡指数 Apoptosis index, AI
F <sub>1</sub> (n=7)	726.066 ± 130.790 <sup>bc</sup>	1.030 ± 1.138 <sup>c</sup>
F <sub>2</sub> (n=7)	862.180 ± 114.344 <sup>b</sup>	0.993 ± 1.044 <sup>c</sup>
F <sub>3</sub> (n=7)	614.936 ± 140.484 <sup>c</sup>	2.654 ± 1.701 <sup>c</sup>
F <sub>4</sub> (n=4)	291.892 ± 103.177 <sup>d</sup>	3.346 ± 1.029 <sup>bc</sup>
SPF (n=7)	1062.840 ± 104.129 <sup>a</sup>	3.579 ± 1.483 <sup>bc</sup>
SYF (n=4)	246.974 ± 58.694 <sup>d</sup>	5.641 ± 2.007 <sup>b</sup>
闭锁卵泡 (n=4) Atresic follicle	60.397 ± 20.836 <sup>e</sup>	19.333 ± 4.885 <sup>a</sup>

同一列中不同字母之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下表同  
The difference between values with different superscript in the same column is significant ( $P < 0.05$ ), the same as below

表 2 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰后颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达、凋亡、增殖和孕激素分泌水平 (n=4)

Table 2 Effects of *Bcl-2* interference on the apoptosis, proliferation and P secretion of granulosa cells

组别 Group	Bcl-2 蛋白表达水平 Bcl-2 protein level	凋亡指数/% Apoptosis index, AI	增殖指数/% Proliferation index, PI	P 水平/(ng/mL 培养上清) P level
阳性对照 Positive control	655.063 ± 28.991 <sup>a</sup>	3.731 ± 0.505 <sup>d</sup>	2.713 ± 0.463 <sup>c</sup>	8.547 ± 0.427 <sup>c</sup>
空白对照 Blank control	516.295 ± 26.184 <sup>b</sup>	7.135 ± 1.266 <sup>c</sup>	5.061 ± 3.012 <sup>b</sup>	8.902 ± 0.016 <sup>c</sup>
阴性对照 Negative control	489.682 ± 73.539 <sup>bc</sup>	8.362 ± 1.188 <sup>bc</sup>	5.445 ± 0.686 <sup>b</sup>	11.420 ± 4.699 <sup>b</sup>
Plasmid psiRNA <sub>b1</sub>	273.416 ± 24.749 <sup>d</sup>	10.758 ± 0.226 <sup>b</sup>	5.663 ± 0.968 <sup>b</sup>	12.658 ± 4.371 <sup>b</sup>
Plasmid psiRNA <sub>b2</sub>	312.460 ± 7.778 <sup>d</sup>	9.620 ± 0.141 <sup>b</sup>	5.058 ± 0.127 <sup>b</sup>	11.340 ± 3.731 <sup>b</sup>
Plasmid psiRNA <sub>b3</sub>	138.467 ± 9.899 <sup>e</sup>	17.054 ± 6.640 <sup>a</sup>	9.002 ± 1.008 <sup>a</sup>	16.152 ± 8.993 <sup>a</sup>

### 2.4 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰对颗粒细胞凋亡、增殖和激素分泌的影响

*Bcl-2* 基因干扰组的颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于阳性、空白和阴性对照组 ( $P < 0.05$ ), 下降了 40%~70%。3 个干扰序列的干扰效率有显著差异, psiRNA<sub>b3</sub> > psiRNA<sub>b1</sub> > psiRNA<sub>b2</sub>。

*Bcl-2* 基因干扰后, 颗粒细胞凋亡指数增加, 增

加的程度与 Bcl-2 表达减少显著相关 ( $R_{BP-AI} = -0.951$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 *Bcl-2* 基因显著影响颗粒细胞的凋亡。

*Bcl-2* 基因干扰对颗粒细胞增殖指数也有显著的影响。增殖指数随 Bcl-2 表达量增加而增加, 增加的程度与 Bcl-2 表达减少显著相关 ( $R_{BP-PI} = -0.872$ ,  $P < 0.05$ ), 提示 *Bcl-2* 基因影响颗粒细胞的增殖。

*Bcl-2* 基因干扰后,细胞培养上清中的 P 分泌水平高于对照组。其中也是 psiRNA<sub>b3</sub> 干扰组的效果最显著( $P < 0.05$ ),与空白对照相比 P 的分泌水平上升了 81.4%。

### 3 讨论

#### 3.1 各级卵泡颗粒细胞 *Bcl-2* 蛋白的表达

随着鹅卵泡的发育,卵泡颗粒细胞 *Bcl-2* 蛋白的表达总体呈上升的趋势,但在 SPF 有个大幅度升高。此外,还发现从 SYF 发育至 SPF 过程中,*Bcl-2* 的表达量显著上升,提示 *Bcl-2* 可能在卵泡选择中起作用。另外,健康卵泡 *Bcl-2* 蛋白表达水平均高于闭锁卵泡,很可能是随着卵泡的闭锁颗粒细胞因凋亡而清除,导致颗粒细胞数目减少<sup>[8]</sup>,因而 *Bcl-2* 蛋白的表达水平显著降低,达检测不出的低水平。Johnson 等<sup>[9]</sup>曾分析了鸡 F<sub>1</sub>~F<sub>3</sub>、9~12 mm、6~8 mm、3~5 mm 卵泡颗粒细胞 *Bcl-2* mRNA 水平的表达,发现 F<sub>1</sub>~F<sub>3</sub> 卵泡颗粒细胞 *Bcl-2* mRNA 水平显著高于 9~12 mm、6~8 mm、3~5 mm 等级序列前卵泡(Prehierarchical follicle),这与笔者检测到的各级卵泡 *Bcl-2* 蛋白表达模式基本一致。

#### 3.2 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰降低内源 *Bcl-2* 蛋白的表达

传统的 RNA 干扰方法是用化学合成 siRNA,但化学合成的 siRNA 转染效率不高,而且在体内作用时间短暂,随后出现了以 RNA 聚合酶 III U6 或 H1 启动子构建 dsRNA 的真核表达载体,通过在哺乳动物细胞内表达产生 siRNA 的方式突破性的实现了 RNAi,而且产生的效果特别持久。重组质粒表达 siRNA 的方式有两种:一是以双启动子分别表达正义链和反义链,然后在细胞内结合形成 siRNA;二是以单启动子表达发夹状 shRNA,其转录模板是由连接环将靶序列的正义链和反义链连接而成的。相比之下,后一种方法产生的 RNAi 效应更强<sup>[10-11]</sup>。本研究采用的就是后一种方法,通过在颗粒细胞内表达产生 shRNA 来实现 RNAi。试验结果显示,与空白对照组相比,不同位点的干扰表达载体 psiRNA<sub>b1</sub>、psiRNA<sub>b2</sub>、psiRNA<sub>b3</sub> 对鹅卵泡颗粒细胞 *Bcl-2* 蛋白表达的抑制率分别为 47.043%、39.480%、73.181%,而阴性对照 *Bcl-2* 蛋白表达水平与空白对照十分接近,排除了质粒本身对基因的影响,表明本研究的干扰载体(尤其 psiRNA<sub>b3</sub>) 在颗粒细胞内成功表达并执行其特异性干扰作用,降低了颗粒细胞 *Bcl-2* 蛋白的表达水平。此外,本试验结果显

示构建的 3 对干扰序列对 *Bcl-2* 的干扰效果不同,这种差异很可能是靶位点选择上造成的,因为 RNA 干扰效果很大程度上取决于靶位点的位置选择。现有人提出除位置外靶位点 mRNA 的二级结构<sup>[12]</sup> 和 H-键<sup>[13]</sup> 也至关重要的,因此在靶位点的选择上除遵守以往的原则外,还要考虑其他因素(如靶位点 mRNA 的二级结构和 H-键),以提高 RNAi 的效果。

#### 3.3 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰与颗粒细胞凋亡

*Bcl-2* 作为一种抗凋亡基因,它不仅抑制细胞的凋亡,而且可以抑制由其他因素(如糖皮质激素、P53、TNF 相关的凋亡诱导配体、化疗等)诱导的多种细胞的凋亡。目前已有许多针对 *Bcl-2* 基因进行 RNA 干扰并且取得很好干扰效果的报道。本研究显示,对照组颗粒细胞凋亡率只有 3.731,显著低于对照组和 RNA 干扰组,表明外源 *Bcl-2* 蛋白的表达可以减少颗粒细胞的凋亡。而干扰组颗粒细胞凋亡率显著高于对照组,表明随着 *Bcl-2* 蛋白表达水平的降低,颗粒细胞的凋亡增多。这一正一负的作用正说明了 *Bcl-2* 对鹅卵泡颗粒细胞的抗凋亡作用,表明 *Bcl-2* 是一种进化过程中功能高度保守的蛋白。

#### 3.4 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰与颗粒细胞增殖

Vaux 等首次发现 *Bcl-2* 过度表达的细胞虽然可以幸免于生长因子缺乏所诱导的细胞凋亡,但这些细胞一直处于静止期(G<sub>0</sub>期),从而第一次提出 *Bcl-2* 与细胞周期间存在着某种关系<sup>[14]</sup>。随后在对 *Bcl-2* 过度表达的细胞系和转基因动物的研究中也发现它在细胞周期的 G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub> 期水平上发挥抗增殖作用,体现为延缓细胞从 G<sub>0</sub> 期进入细胞周期的进程<sup>[15]</sup>。此外,Susan 等研究发现当颗粒细胞处于 G<sub>0</sub> 或 G<sub>1</sub> 期时对凋亡有一定的抵抗力,当细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡时则易发生凋亡<sup>[16]</sup>,而且凋亡与增殖间呈正相关<sup>[17-18]</sup>。本研究显示,干扰组颗粒细胞的增殖指数显著高于对照组,与上述报道基本一致,表明 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰诱导颗粒细胞凋亡是通过促进颗粒细胞增殖实现的。

#### 3.5 *Bcl-2* 基因 RNA 干扰与颗粒细胞 P 分泌

*Bcl-2* 干扰组 P 水平高于对照组,似乎很难理解,因为 P 主要由颗粒细胞分泌,干扰后细胞凋亡增多,P 的合成应减少才对,对于这点似乎可以从以下 2 点来解释:(1)早期的研究发现在诱导卵巢凋亡的过程中伴随着血浆 P 水平的上升。Amsterdam 等也发现,诱导原代培养的颗粒细胞和永生颗粒细胞凋亡的前几个小时,因合成类固醇的细胞器的结构未破坏,P 的

合成没有降低反而升高<sup>[19]</sup>; (2) P 可以抑制颗粒细胞的凋亡<sup>[20]</sup>, 这似乎是颗粒细胞自身的一种保护机制, 以避免更多的颗粒细胞发生凋亡。但是, *Bcl-2* 基因是如何影响 P 水平的, 还有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] TILLY J L, KOWALSKI K I, JOHNSON A L, et al. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression[J]. *Endocrinology*, 1991, 129: 2 799-2 801.
- [2] GARRETT W, GUTHRIE H. Steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs[J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 56 (6): 1 424-1 431.
- [3] SHEAU Y, ROASNNA J, MILTON F, et al. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis [J]. *Endocrinology*, 1996, 137 (11): 4 837-4 843.
- [4] LIN S L, CHUONG C M, YING S Y. A Novel mRNA-cDNA interference phenomenon for silencing Bcl-2 expression in human LNCaP cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 81: 639-644.
- [5] OCKER M, NEUREITER D, LUEDERS M, et al. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing anti-apoptotic bcl-2 in pancreatic cancer[J]. *Gut*, 2005, 54: 1 298-1 308.
- [6] HUANG S L, WU Y, YU H, et al. Inhibition of Bcl-2 expression by a novel tumor-specific RNA interference system increases chemosensitivity to 5-fluorouracil in Hela cells[J]. *Pharmacological Sinica*, 2006, 27 (2): 242-248.
- [7] KUMIKO U T, YUKI N, FUMITAKA T, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucleic Acid Research*, 2004, 32: 936-948.
- [8] PER-ARNE S, MAGNUS S C, CHARLOTTE L, et al. Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 1999, 140 (6): 2 494-2 500.
- [9] JOHNSON A L, BRIDGHAM J T, WITTY J P, et al. Expression of bcl-2 and nr-13 in hen ovarian follicles during development [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57: 1 096-1 103.
- [10] YU J Y, STACY L D, DAVID L T. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J]. *PNAS*, 2002, 99 (9): 6 047-6 052.
- [11] THIJN R B, REN B, AND REUVEN A. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296: 550-553.
- [12] KOICHI Y, MAKOTO M, KAZUNARI T. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the target region [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (2): 691-699.
- [13] KATHY Q L, DONALD C C. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318: 303-310.
- [14] VAUX D L, CORY S, ADAMS J M. *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells [J]. *Nature*, 1988, 335 (6 189): 440-442.
- [15] SYLVIE B, MARCELINE C, DENIS L, et al. Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells [J]. *Gynecologic Oncology*, 2005, 97 (3): 796-806.
- [16] SUSAN M Q, ROBERT G C, REBECCA M H. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle [J]. *Endocrinology*, 2006, 189: 441-453.
- [17] YANG W Y, LIU C H, CHANG C J, et al. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours [J]. *Comparative Pathology*, 2006, 134 (1): 70-79.
- [18] GREGORASZCZUK E L, SOWA M, KAJTA M, et al. Effect of PCB 126 and PCB 153 on incidence of apoptosis in cultured theca and granulosa cells collected from small, medium and large preovulatory follicles [J]. *Reproductive Toxicology*, 2003, 17(4): 465-471.
- [19] AMSTERDAM A, DANTES A, SELVARAJ N, et al. Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis [J]. *Steroids*, 1997, 62: 207-211.
- [20] LAWRENCE E, RALF L, MARTIN W, et al. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism [J]. *Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 91 (12): 4 962-4 968.