

文章编号:1000-5404(2013)16-1713-04

论著

apelin 对大鼠卵巢颗粒增殖与凋亡的影响

罗爽¹,王继东²,何佳¹,姚珍薇² (629000 四川遂宁,遂宁市中心医院妇产科¹;400010 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科²)

[摘要] 目的 探讨 apelin 对大鼠卵巢颗粒细胞增殖与凋亡的影响。方法 用 apelin 10^{-8} mol/L 培育 SD 大鼠卵巢原代颗粒细胞,小 RNA 干扰技术 (siRNA) 抑制颗粒细胞 APJ 表达,联合 PI3K/Akt 信号转导阻断剂 LY294002 和 HIMO 干预,MTT 法及流式细胞术观察细胞增殖与凋亡情况;Western blot 检测细胞凋亡相关信号蛋白表达。结果 MTT 检测 APJ-siRNA 组、LY294002 组、HIMO 组细胞增殖率,与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与对照组比较,APJ-siRNA 组、LY294002 组、HIMO 组颗粒细胞 Bad、Bax、Foxo3a 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$);与对照组比较,APJ-siRNA 组、LY294002 组、HIMO 组 Bcl-2 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$)。结论 apelin 通过 APJ/PI3K/Akt 信号通路促颗粒细胞增殖抗其凋亡。

[关键词] apelin; APJ; 卵巢颗粒细胞; PI3K/Akt

[中图分类号] R341; R394.3; R711.75

[文献标志码] A

Apelin promotes proliferation and suppresses apoptosis in rat ovarian granulosa cells via PI3K/Akt signaling pathway

Luo Shuang¹, Wang Jidong², He Jia¹, Yao Zhenwei² (¹Department of Gynecology and Obstetrics, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan Province, 629000; ²Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of apelin on the proliferation and apoptosis in rat ovarian granulosa cells (GCs) *in vitro*. **Methods** SD rat ovarian GCs were isolated and primary cultured, and then cultured with apelin at a concentration of 10^{-8} mol/L for 12, 24 and 48 h respectively, and then tested by MTT assay and flow cytometry (Annexin/PI). RNA interference (RNAi) was used to down-regulate the expression of APJ in GCs. PI3K/Akt inhibitor LY294002 and HIMO were used to determine the role of the signaling pathway. Western blotting was employed to determine the expression of cell apoptosis-related proteins. **Results** Apelin of 10^{-8} mol/L promoted the proliferation and anti-apoptosis in GCs ($P < 0.05$). Apelin activated the phosphorylation of Akt, while APJ-siRNA, inhibitor LY294002 and HIMO abolished apelin-induced activation of Akt. Western blotting showed that apelin enhanced the expression of Bcl-2 but suppressed the expression of Bax, Bad, and Foxo3a ($P < 0.05$). The effects were blocked by APJ-siRNA, inhibitor LY294002 and HIMO ($P < 0.05$). **Conclusion** Apelin promotes the proliferation and suppresses the apoptosis in GC *via* the PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] apelin; APJ; granulosa cells; PI3K/Akt

Supported by the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-003). Corresponding author: Yao Zhenwei, E-mail: a68892986@yeah.net

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见的生殖内分泌疾病,临床特征为卵泡闭锁和持续不排卵,患者双侧卵巢有大量小卵泡存在,但是不能周期性产生成熟卵泡,其机制可能与卵泡

的选择、发育及闭锁的调控失调有关。颗粒细胞凋亡是启动卵泡闭锁的重要机制,细胞外信号如激素、生长因子、细胞因子等均导致细胞发生增殖或凋亡。前期研究发现 PCOS 患者血清、PCOS 动物模型卵巢组织中 apelin 水平增高,apelin/APJ (apelin 受体) 系统在大鼠卵巢颗粒细胞、卵泡内膜细胞中表达^[1-2]。PCOS 患者高水平的 apelin 是否影响颗粒细胞发育? 我们拟采用小分子 RNA 干扰技术 (siRNA) 抑制 APJ 表达后,信号

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研重点项目 (2011-1-003)

[通信作者] 姚珍薇, E-mail: a68892986@yeah.net

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0902.006.html> (2013-04-25)

抑制剂 LY294002、HIMO 干预 apelin 培育的颗粒细胞,观察其增殖、Akt 磷酸化及 PI-3K 信号通路下游 Bax、Bad、Foxo3a、Bcl-2 蛋白表达,从细胞及分子水平探讨 apelin 对颗粒细胞具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于 Sigma 公司,卵泡刺激素受体 (FSHR) 兔多克隆抗体、Akt 多克隆抗体、磷酸化 Akt 多克隆抗体均购于博士德,Annexin V-FITC 试剂盒购于凯基生物公司,apelin-C 末端冻干粉购于杭州中肽,抑制剂 HIMO 购于联科生物,抑制剂 LY294002、Lipofectamine[®] 2000 购于 Invitrogen 公司,Bad 多克隆抗体、Foxo3a 单克隆抗体、Bcl-2 单克隆抗体、Bax 单克隆抗体购于碧云天,APJ-siRNA 购于锐博生物,APJ-siRNA 序列如下:正义链 5'-GAGAACCGAUGCAUGAGAAdTdT-3',反义链 5'-UUCUCAUGCAUCGGUUCUCTdTd-3'。

1.2 实验方法

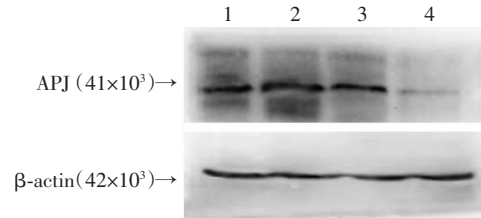
1.2.1 原代颗粒细胞培养及鉴定 从重庆医科大学实验动物中心购买 3 周龄雌性 SD 大鼠适应性喂养 2 d,皮下注射 PMSG 40 IU,48 h 后颈椎脱臼法处死,取出卵巢在无血清 DMEM/F12 培养基中用 1 mL 空针针头刺破卵泡,收集颗粒细胞,巴氏管轻轻吹打,200 目不锈钢细胞筛过滤。1 000 r/min 离心 8 min 后弃上清收集细胞。向离心管底的颗粒团中加 DMEM/F12 培养基。显微镜下计数后,按 3.0×10^5 /mL 接种于 25 mL 培养瓶中,DMEM/F12 培养基 (含 15% 胎牛血清),37 °C、5% CO₂ 培养箱中预培养 24 h 后见有细胞贴壁,换液继续培养。当细胞融合达 80% 可用胰酶消化细胞 10 min,1 000 r/min 离心 8 min 后弃上清收集细胞,传代。制作细胞爬片,细胞鉴定采用 HE 染色及 FSHR 免疫细胞化学染色,其操作方法如前期文献 [2] 所描述。

1.2.2 apelin 对颗粒细胞增殖、凋亡及 Akt 蛋白表达的影响

颗粒细胞按 2×10^3 /孔接种至 96 孔板,细胞生长达 50% 融合,无血清培养 24 h 后分 2 组:对照组加入等容量无血清培养基;实验组加入等容量 apelin 10^{-8} mol/L,2 组细胞继续培养 12、24、48 h 后去除培养液,每孔加入 MTT 溶液 20 μ L,继续孵育 4 h,倾去 MTT 溶液,每孔加入二甲基亚砜 200 μ L,振荡 10 min,并在酶标仪上 490 nm 波长处测光密度值,以检测其细胞增殖情况;细胞以 1×10^5 /孔传代至 6 孔板的培养皿,当细胞达 80% 融合,无血清培养 24 h 后,对照组:加入等容量 DMEM/F12 培养基;实验组:加入 apelin 10^{-8} mol/L 培养 12、24、48 h 后用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化后制成悬浮细胞,2 000 r/min 离心 5 min, PBS 漂洗细胞 2 次,并重悬,加入 5 μ L Annexin V-FITC、5 μ L Propidium iodide,混匀,避光反应,1 h 内用 Annexin/PI 检测细胞凋亡率 (每组设 5 个复孔)。提取每组细胞总蛋白,Western blot 测 Akt、p-Akt 蛋白表达,其操作方法如前期文献所描述 [2]。

1.2.3 APJ-siRNA 转染分组细胞制备 无血清 DMEM/F12 培养基稀释转染试剂 Lipofectamine[®] 2000, RNase-free H₂O 稀释 APJ-siRNA,两者混合形成 100 nmol/L siRNA-Lipo2000 备用。培育的颗粒细胞按 2×10^3 /孔接种于 96、6 孔细胞培养板,

DMEM/F12 (15% 血清) 培养,设立如下 4 组进行转染:对照组 (DMEM/F12),阴性对照组,siGFP 组,APJ-siRNA 组,每组设 6 个复孔。倒置荧光显微镜观察转染效率。48 h 提取 6 孔板细胞蛋白,转染 48 h 后 APJ-siRNA 可成功沉默颗粒细胞 APJ 蛋白表达 (图 1)。



1: 对照组; 2: 阴性对照组; 3: siGFP 组; 4: APJ-siRNA 组

图 1 Western blot 检测各组颗粒细胞 siRNA 转染 48 h 后 APJ 蛋白表达

1.2.4 apelin 对转染、抑制剂处理颗粒细胞增殖及凋亡相关蛋白表达的影响 将细胞接种于 96 孔和 6 孔细胞培养板中,分为对照组、APJ-siRNA 组、抑制剂 LY294002 组、抑制剂 HIMO 组。细胞融合达 40% 时,对照组加入等体积无血清 DMEM/F12 培养基组; APJ-siRNA 组加入等体积无血清 DMEM/F12 培养基混合的 siRNA-Lipo2000 (100 nmol/L APJ-siRNA); 抑制剂 LY294002 组加入等体积无血清 DMEM/F12 培养基溶解的 LY294002 (10 μ mol/L); 抑制剂 HIMO 组加入等体积无血清 DMEM/F12 培养基溶解的 HIMO (10 μ mol/L)。处理后继续细胞培养箱中培养 3 h,4 组均加入等体积 apelin 10^{-8} mol/L 培育。48 h 行 MTT 检测。提取 6 孔板细胞蛋白,Western blot 检测 Akt、p-Akt、Bad、Foxo3a、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。

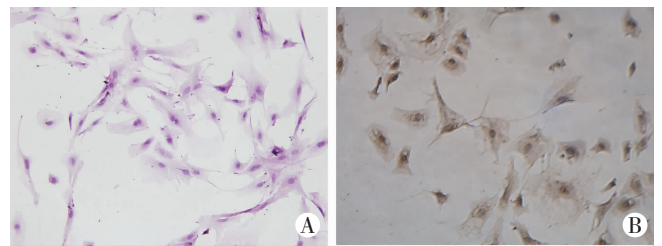
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠卵巢原代颗粒细胞鉴定

HE 染色见贴壁细胞形态完整,边缘清晰,呈不规则多角形,核卵圆形,呈蓝色,胞浆淡红色。FSHR 特异表达于卵巢颗粒细胞,免疫细胞化学染色见胞浆呈棕褐色,FSHR 阳性率 >90%,满足实验需求 (图 2)。



A: HE 染色观察 ($\times 200$); B: 免疫组化染色观察 (S-P $\times 400$)

图 2 大鼠卵巢原代颗粒细胞鉴定

2.2 MTT 检测 apelin 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

apelin 10^{-8} mol/L 促颗粒细胞增殖,与对照组比较,其增殖率约 2 倍以上;实验组 12、24、48 h,光密度值分别为 0.30 ± 0.03 、 0.58 ± 0.06 、 0.64 ± 0.02 ,与对照组 (0.13 ± 0.02 、 0.33 ± 0.07 、 0.35 ± 0.02) 同一时间点比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 Annexin/PI 法检测 apelin 对卵巢颗粒细胞的影响

apelin 10^{-8} mol/L 在 12、24、48 h 颗粒细胞凋亡率分别为 $(8.15 \pm 0.43)\%$ 、 $(7.16 \pm 0.86)\%$ 、 $(6.07 \pm 0.33)\%$ ，对照组颗粒细胞凋亡率分别为 $(8.85 \pm 0.57)\%$ 、 $(10.24 \pm 0.25)\%$ 、 $(15.43 \pm 0.85)\%$ ，2 组同一时间点比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 apelin 对颗粒细胞 PI-3K/Akt 信号通路 Akt 磷酸化影响

apelin 10^{-8} mol/L 作用颗粒细胞在 5 min 开始激活信号蛋白 Akt，磷酸化 Akt 表达在 15 min 达高峰，Akt 磷酸化提示 PI3K/Akt 信号通路活化；APJ-siRNA、抑制剂 LY294002、HIMO 处理后，其磷酸化 Akt 蛋白未见表达，而在对照组可见阳性表达，提示 apelin 促 PI3K/Akt 磷酸化可被 PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂 HIMO、APJ-siRNA 取消 (图 3、4)。

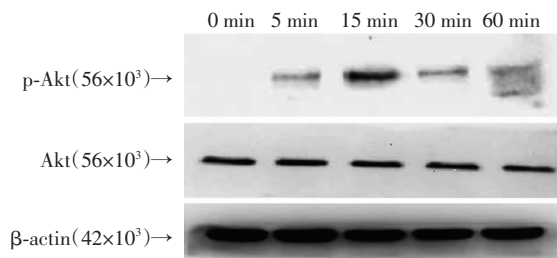
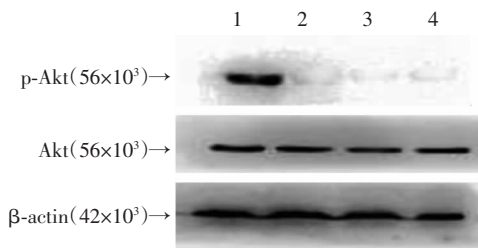


图3 Western blot 检测 apelin 在不同时间点对颗粒细胞 Akt 激活的影响



1: 对照组; 2: APJ-siRNA 组; 3: 抑制剂 LY294002 组; 4: 抑制剂 HIMO 组
图4 Western blot 检测信号抑制剂、RNA 干扰 apelin 对各组颗粒细胞 Akt 激活的影响

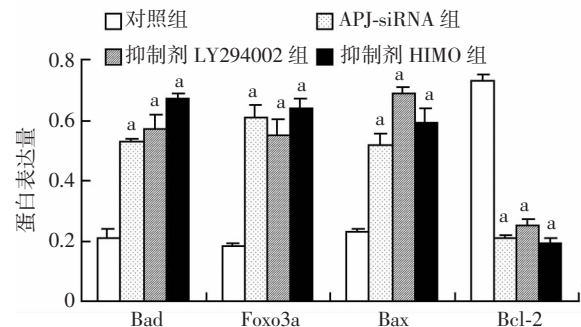
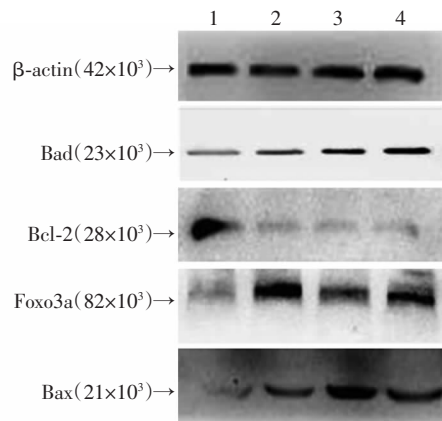
2.5 干预处理后细胞增殖分析

带荧光标记 siRNA 转染颗粒细胞 12、24、48 h 后在倒置荧光显微镜下取 5 个高倍镜观察，可见每组细胞的形态均未见异常，成功转染的细胞发出绿色荧光，48 h 达到最大转染效率约 80%。APJ-siRNA、抑制剂 LY294002 及 HIMO 组细胞光密度值分别为 0.34 ± 0.03 、 0.36 ± 0.01 、 0.38 ± 0.04 ，与对照组 (0.61 ± 0.03) 比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示 APJ-siRNA、抑制剂 LY294002、抑制剂 HIMO 均可取消 apelin 促细胞增殖作用；其中以 APJ-siRNA 组抑制细胞增殖最明显，与其他组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 干预处理后相关蛋白表达分析

APJ-siRNA 组、LY294002 组和 HIMO 组细胞 Bad 蛋白的相对表达量分别与对照组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；对照组 Bax 促蛋白的相对表达量与 APJ-siRNA 组、LY294002 组和 HIMO 组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；对照组 Foxo3a 蛋白表达量与 APJ-siRNA 组、LY294002 组和 HIMO 组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；对照组与 APJ-siRNA

组、LY294002 组和 HIMO 组 Bcl-2 蛋白相对表达量比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。



A: Western blot 检测结果; 1: 对照组; 2: APJ-siRNA 组; 3: LY294002 组; 4: HIMO 组; B: 半定量结果; a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图5 Western blot 检测 4 组颗粒细胞 Bad、Foxo3a、Bax、Bcl-2 表达

3 讨论

apelin 是 1998 年 Tatemoto 从牛胃中分离，基因位于人 x 染色体；apelin 受体 APJ 是孤独 G 蛋白偶联受体，由 377 个氨基酸残基组成的含有 7 个螺旋跨膜区段蛋白，属于血管紧张素 I 型受体的相关蛋白，apelin/APJ 系统广泛分布中枢神经系统及外周组织^[3]。apelin 不仅是一种血管活性多肽，也是一种脂肪源性激素和神经介质，参与高血压、动脉粥样硬化、心血管疾病、糖尿病、肥胖症等许多疾病的发病过程^[3-4]。研究发现 apelin 通过 PI-3K/Akt 促进成骨细胞、血管平滑肌细胞增殖抑制凋亡、视网膜血管生成^[5-6]，前期研究发现 apelin/APJ 系统在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞、卵泡内膜细胞中异常表达^[2]。卵泡内颗粒细胞增殖或凋亡异常可导致更多数量卵泡进入募集，成为 PCOS 多个卵泡同时发育的病理基础。本研究进一步发现 apelin 10^{-8} mol/L 可促进大鼠离体卵巢颗粒细胞增殖抗凋亡作用，其促细胞增殖与凋亡呈时间依赖性。apelin 对小鼠脑微血管内皮细胞增殖能力是随着浓度的增加而增强，但是当浓度大于 10 ng/mL 时，细胞的增殖能力没有进一步增加，考虑 10 ng/mL 为细胞可接受的最高生理浓度剂量^[7]，因此 apelin 10^{-8} mol/L 促

细胞增殖、抑制凋亡效果可作为后续研究采用。

apelin 促进离体大鼠颗粒细胞增殖,但具体作用机制不明。近期发现 apelin 可诱导血管平滑肌细胞内信号蛋白 PI3K/Akt 磷酸化,促其增殖,PI-3K 信号抑制剂 LY294002 和 Akt 信号抑制剂 1701-1 可明显抑制 apelin 促增殖作用,研究认为 apelin 促血管平滑肌细胞增殖可能与 PI3K/Akt 信号通路有关^[6];另有研究证实 apelin 通过 PI3K/Akt 信号通路促进成骨细胞增殖、抑制其凋亡,信号抑制剂 LY294002、HIMO 可抑制 apelin 对成骨细胞的增殖作用^[5]。PI-3K 属于生长因子超家族信号转导通路中的重要成员,胰岛素、胰岛素样生长因子等可使 PI3K 构象改变,在细胞膜产生具有第二信使作用的激酶,使下游信号蛋白 Akt 磷酸化(p-Akt),p-Akt 通过抑制线粒体蛋白释放、调控细胞周期等途径促进细胞的增殖和分化,具有抗凋亡作用。我们发现细胞中加入 apelin 5 min 后可测到 p-Akt 蛋白,15 min 达高峰,进一步研究发现 APJ-siRNA、LY294002、HIMO 培育细胞,apelin 促细胞增殖效应被抑制,Akt 磷酸化效应被取消。以上提示,apelin 与受体 APJ 结合后通过 PI3K/Akt 促进颗粒细胞增殖;其效应可被 APJ-siRNA、抑制剂 LY294002、HIMO 取消。

抑凋亡/促凋亡蛋白比值决定着细胞增殖或凋亡^[8-9]。我们发现颗粒细胞分泌的转录调节因子叉头转录蛋白(Foxo3a)在 APJ-siRNA、抑制剂 LY294002、HIMO 组内均呈高表达,与对照组比较,差异均有统计学意义。Foxo3a 是叉头转录因子家族成员之一,磷酸化的 Akt 可直接磷酸化 Foxo3a 并与 14-3-3 蛋白结合后从胞核转移到胞浆失去其转录活性,胞核内 Foxo3a 可抑制细胞周期蛋白使细胞周期停滞在 G₀/G₁期,过表达也可诱导细胞发生凋亡^[10-11]。细胞中 Bad 促凋亡作用主要与 Bcl-2 和 Bcl-xL 结合形成异源二聚体,当激活的 Akt 使 Bad 中的 Ser136 磷酸化,导致 14-3-3 蛋白与 Bad 结合从而抑制 Bad 诱导细胞发生凋亡^[12-13]。本研究发现实验组颗粒细胞 Bad 蛋白表达量明显高于对照组,表明 APJ-siRNA、抑制剂 LY294002、HIMO 均可抑制 apelin 抗颗粒细胞凋亡效应。在细胞程序性死亡中,以 Bcl-2 为代表的抑凋亡基因和以 Bax 为代表的促凋亡相关基因亦发挥重要作用,前者可抑制氧自由基和 P53 等多种诱导细胞凋亡因素,后者将导致由白细胞介素-3 介导的细胞凋亡。本研究发现实验组促凋亡基因 Bax 蛋白均明显高表达,而抑凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达明显低于对照组(P<0.05),提示,apelin 可抑制离体颗粒细胞发生凋亡,而 APJ-siRNA、抑制剂 LY294002 及 HIMO 均可取消其抗颗粒细胞抗凋亡作用。

根据以上结果,我们推测 PCOS 大鼠卵巢内高表

达的 apelin 与 APJ 结合通过 PI3K/Akt 信号通路促进卵泡内颗粒细胞增殖,抑制凋亡,可能导致卵泡内颗粒细胞增殖,小窦状卵泡内颗粒细胞凋亡被抑制而不能及时发生闭锁,从而出现卵巢多囊样改变,然而 PCOS 是复杂的生殖内分泌疾病,apelin 对颗粒细胞的内分泌功能影响如何? apelin 促颗粒细胞增殖的 PI3K 通路是否是其唯一通路? 本研究由于尚未深入探讨,因此,apelin/APJ 系统与 PCOS 病因值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 罗爽,王继东,姚珍薇. 多囊卵巢综合征患者血清 apelin 蛋白水平及意义[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(7): 1336-1338.
- [2] 罗爽,王继东,潘红娟,等. Apelin/APJ 在 PCOS 模型大鼠卵巢中的表达及意义[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(8): 503-508.
- [3] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(2): 471-476.
- [4] Kleinz M J, Davenport A P. Emerging roles of apelin in biology and medicine[J]. Pharmacol Ther, 2005, 107(2): 198-211.
- [5] 谢辉,李辉,梁秋华,等. Apelin 抑制人成骨细胞的凋亡[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2008, 1(1): 39-45.
- [6] Liu C, Su T, Li F, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(6): 396-402.
- [7] Olszanecka-Glinianowicz M, Madej P, Nylec M, et al. Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, [Epub ahead of print].
- [8] Shimojo N, Jesmin S, Zaedi S, et al. Changes in important apoptosis-related molecules in the endothelin-1-induced hypertrophied cardiomyocytes: effect of the pretreatment with eicosapentaenoic Acid[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2006, 231(6): 932-936.
- [9] Dorn G W 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 465-473.
- [10] Shen M, Lin F, Zhang J, et al. Involvement of the up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2012, 287(31): 25727-25740.
- [11] Karman B N, Basavarajappa M S, Hannon P, et al. Dioxin exposure reduces the steroidogenic capacity of mouse antral follicles mainly at the level of HSD17B1 without altering atresia[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 264(1): 1-12.
- [12] Parborell F, Abramovich D, Irusta G, et al. Angiotensin II reduces rat follicular atresia mediated by apoptosis through the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 343(1/2): 79-87.
- [13] Yoo N J, Kim M S, Lee S H. Expression and mutation analyses of Fas, FLIP and Bcl-2 in granulosa cell tumor of ovary[J]. Tumori, 2012, 98(5): 118e-121e.

(收稿:2013-02-01;修回:2013-03-13)

(编辑 吴培红)