

SMAD4对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的调控作用

董安琪¹, 郑金丹¹, 于晓萌², 刘丽丽¹

(1. 锦州医科大学附属第一医院妇产科, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州市妇婴医院妇产科, 辽宁 锦州 121001)

摘要 目的 探讨SMAD4对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的影响。方法 脱氢表雄酮(DHEA)法构建PCOS大鼠模型,体外提取并培养颗粒细胞。实时定量PCR、Western blotting检测大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4表达水平。SMAD4-siRNA转染PCOS大鼠卵巢颗粒细胞,实时定量PCR检测转染后细胞中SMAD4 mRNA水平,Western blotting检测转染后细胞中SMAD4、PCNA、BAX、BCL-2蛋白表达水平。CCK-8法检测siRNA干扰PCOS大鼠卵巢颗粒细胞后细胞生长情况。结果 HE染色显示,PCOS组大鼠卵巢卵泡空泡增多,颗粒细胞层数和黄体数明显减少,造模成功。FSHR阳性率大于95%。与对照组相比,PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4表达水平升高($P < 0.05$)。siRNA可显著降低PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4表达水平($P < 0.01$),并可促进颗粒细胞增殖、抑制凋亡。结论 PCOS大鼠卵巢颗粒细胞发育障碍可能与SMAD4基因过表达有关,SMAD4有望成为治疗PCOS患者排卵障碍的潜在靶点。

关键词 多囊卵巢综合征; 颗粒细胞; SMAD4

中图分类号 R711.7 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2025)03-0223-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250318.1446.032>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2025.03.007

SMAD4 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome

DONG Anqi¹, ZHENG Jindan¹, YU Xiaomeng², LIU Lili¹

(1. Departments of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Departments of Obstetrics and Gynecology, Women and Children's Hospital of Jinzhou, Jinzhou 121001, China)

Abstract Objective To examine the effects of SMAD4 on the proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** A PCOS rat model was established using DHEA, and ovarian granulosa cells were extracted and cultured in vitro. The expression of SMAD4 in ovarian granulosa cells was detected by quantitative real-time PCR and Western blotting. SMAD4-siRNA was transfected into ovarian granulosa cells from PCOS rats. The expression of SMAD4 mRNA after transfection was determined by quantitative real-time PCR. Western blotting was performed to detect the expression levels of PCNA, BAX, and BCL-2 proteins after transfection. A CCK-8 assay was performed to evaluate cell growth after siRNA interference. **Results** The HE staining results revealed that the number of ovarian follicular vacuoles increased and that the number of granulosa cell layers and corpus luteum decreased, thus indicating the establishment of a PCOS model. The FSHR positivity rate exceeded 95%. SMAD4 expression in ovarian granulosa cells was higher in the PCOS group than in the control group ($P < 0.05$). Furthermore, siRNA effectively reduced SMAD4 expression in ovarian granulosa cells of PCOS rats ($P < 0.01$), promoted proliferation, and inhibited the apoptosis of granulosa cells. **Conclusion** The hindered growth of ovarian granulosa cells in PCOS rats may be linked to the overexpression of SMAD4 mRNA, which suggests that targeting SMAD4 could be a promising approach for treating ovulatory abnormalities in patients with PCOS.

Keywords polycystic ovary syndrome; granulosa cell; SMAD4

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是排卵功能障碍的主要原因,影响全世界约6%~20%的育龄期妇女^[1]。除不孕之外,PCOS的主要特征还

包括多囊卵巢、高雄激素血症、高胰岛素血症、慢性无排卵和代谢紊乱等。尽管PCOS的发病机制尚不明确,但颗粒细胞功能障碍被认为是造成PCOS卵泡发育异常的主要原因^[2]。颗粒细胞和卵母细胞处于同一个微环境中,颗粒细胞通过分泌营养物质和激素,参与卵母细胞的减数分裂和成熟。因此,颗粒细胞对卵母细胞成熟和排卵至关重要,颗粒细胞异常

基金项目:辽宁省科学技术计划(2022-MS-394)

作者简介:董安琪(1996-),女,硕士研究生。

通信作者:刘丽丽, E-mail: liulili20231214@163.com

收稿日期:2024-04-26

网络出版时间:2025-03-19 11:12:23

增殖或凋亡可能是造成PCOS排卵障碍的根本原因。

转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 1是TGF- β 超家族的多肽成员,具有多种细胞学功能,参与成熟生物体发育中胚胎的许多细胞过程,包括生长、分化、凋亡、动态平衡等^[3]。TGF- β 1是一个在雌性哺乳动物生殖系统中高表达的多功能因子,其表达或功能缺失会导致颗粒细胞转录组变化。SMAD家族蛋白是细胞内重要的TGF- β 信号传导和调节分子,可将TGF- β 信号由细胞膜直接传导至细胞核内,且不同的SMAD介导不同的TGF- β 信号转导。最近的一项研究^[4]证实,依赖SMAD4核转录活性和配体依赖性途径是TGF- β 1调控卵巢颗粒细胞转录组变化的普遍机制。然而,SMAD4蛋白在PCOS颗粒细胞增殖和凋亡中的调控作用目前仍不清楚。本研究探讨了SMAD4在PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中的功能,及其作为临床治疗PCOS排卵障碍分子靶点的潜力。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SD大鼠,购自锦州医科大学实验动物中心,所有动物实验方案获得锦州医科大学实验动物伦理委员会批准(编号:2022121201)。

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RNA提取试剂盒,购自哈尔滨新海基因检测有限公司;逆转录试剂盒和实时定量PCR扩增试剂盒,购自宝日生物技术(北京)有限公司;组织蛋白提取试剂盒,购自上海贝博生物科技有限公司;兔抗鼠GAPDH单克隆一抗,购自南京巴傲得生物科技有限公司;兔抗鼠Smad4、BAX单克隆一抗,购自艾博抗(上海)贸易有限公司;兔抗鼠PCNA多克隆一抗,购自沈阳万类生物科技有限公司;FSHR多克隆一抗、Cy3山羊抗兔二抗,购自美国爱博泰克生物科技有限公司;BCA试剂盒、ECL发光液,购自北京兰杰柯科技有限公司;CCK-8试剂盒、DMEM/F12培养基,购自武汉塞维尔生物科技有限公司;干扰小RNA (small interfering RNA, siRNA),购自湖州河马生物科技有限公司;转染试剂CALNPTM RNAi in vitro,购自北京多纳医药科技有限公司;胎牛血清,购自以色列Biological Industries公司。

1.2 方法

1.2.1 PCOS模型构建:选取3周龄雌性SD大鼠54只,随机分为PCOS组和对照组,每组27只。PCOS组采用DHEA法构建^[5]PCOS大鼠模型,大鼠每日注射0.2 mL芝麻油+DHEA (6 mg/100 g),对照组大鼠注射等量芝麻油,连续注射20 d。

1.2.2 细胞提取和培养:用颈椎脱臼法处死大鼠,收集卵巢。PBS清洗后剔除脂肪和结缔组织,转移到培养基中,刺破卵泡。加入1 mL胰酶,37 °C孵育30 min。使用40 μ m过滤筛孔过滤,离心后弃上清,加入红细胞裂解液吹打悬浮,静置5 min后离心。加入完全培养基(DMEM/F12+10%胎牛血清+2%青链霉素)吹打悬浮,接种在培养皿中,37 °C、5%CO₂培养箱中孵育,48 h换液。

1.2.3 HE染色:卵巢组织固定、脱水、石蜡包埋,切片厚度为5 μ m,进行HE染色。光学显微镜下观察和拍照。

1.2.4 免疫荧光染色:将颗粒细胞接种于24孔板中,细胞生长至60%时,室温固定、封闭,FSHR一抗、荧光二抗孵育。加入DAPI溶液,荧光显微镜下观察和拍照。细胞表达阳性率(%)=FSHR阳性细胞数/总细胞数 \times 100,表达阳性率>95%时进行下述实验。

1.2.5 siRNA干扰:将密度为 3×10^5 /mL的PCOS大鼠卵巢颗粒细胞悬液分为PCOS+si-SMAD4和PCOS+si-scramble组,接种于培养板中,生长至70%后,分别转染siRNA和阴性对照(10 nmol/L)。37 °C培养箱中孵育,24 h测定mRNA水平,48 h测定蛋白水平和细胞增殖情况。转染siRNA序列,正向5'-GGUUCACAAUGAGCUUGCAUUTT-3',反向5'-AAUGCAAGCUCAUUGUGAACCTT-3'。

1.2.6 Western blotting:收集PCOS组和对照组、PCOS+si-SMAD4组和PCOS+si-scramble组细胞并提取蛋白,经电泳、转膜至PVDF膜上,室温封闭2 h。SMAD4、PCNA、BAX、BCL-2蛋白抗体作为一抗,4 °C孵育过夜。二抗室温孵育1 h。化学发光成像仪拍照。

1.2.7 实时定量PCR:使用RNA提取试剂盒提取PCOS组和对照组、PCOS+si-SMAD4组和PCOS+si-scramble组总RNA。按照说明书进行逆转录、扩增。引物序列:SMAD4,正向5'-CAGCCAGGACAGCAGCAGCAATG-3',反向5'-CAGGAGCAGGATGATTGGAAATGGG-3';GAPDH,正向5'-ACTCCGATTCTTCCACCTTTG-3',反向5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAT

ATT-3'。

1.2.8 CCK-8实验:设置空白孔和样本孔,将PCOS+si-SMAD4组和PCOS+si-scramble组颗粒细胞接种并培养于96孔板中。每孔加入10 μL CCK-8溶液,37 °C避光孵育1 h,酶标仪测定光密度值,波长为450 nm。

1.3 统计学分析

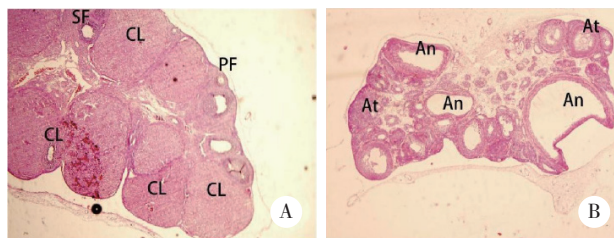
采用GraphPad Prism 9.5对数据进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验,2组间比较采用独立样本*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCOS大鼠模型鉴定

大鼠卵巢组织HE染色结果(图1)显示,与对照组比较,PCOS组大鼠卵巢闭锁卵泡和囊性卵泡增多,颗粒细胞层数、黄体数明显减少,提示PCOS大鼠模型构建成功。

2.2 大鼠卵巢颗粒细胞鉴定



A, control group; B, PCOS group. PF, primary follicle; SF, secondary follicle; An, sinus follicle; At, atretic follicle; CL, corpus luteum.

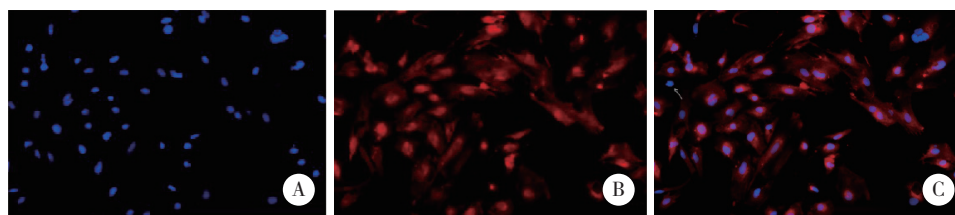
图1 大鼠卵巢组织HE染色 × 40

Fig.1 HE staining of rat ovarian tissue × 40

FSHR在颗粒细胞中特异性表达,FSHR 阳性染色定位于细胞质,呈红色荧光染色,DAPI染核呈深蓝色,表达阳性率>95%,可进行后续实验(图2)。

2.3 PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4表达水平

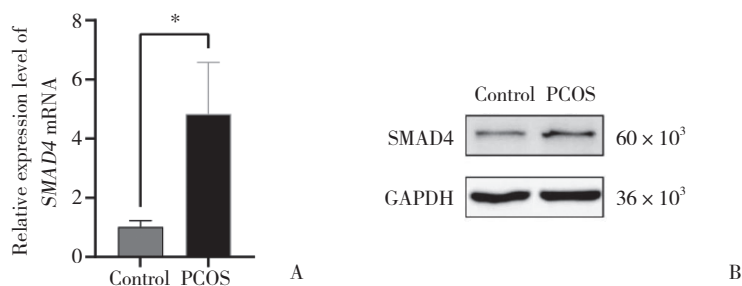
实时定量PCR结果(图3A)显示,PCOS组大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4 mRNA表达水平升高($P < 0.05$)。Western blotting结果(图3B)显示,与对照组相比,PCOS组大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。



A, DAPI; B, FSHR; C, merge. White arrows indicate negative staining.

图2 大鼠卵巢颗粒细胞免疫荧光染色 × 200

Fig.2 Immunofluorescence staining of rat ovarian granulosa cells × 200



A, quantitative real-time PCR; B, Western blotting. * $P < 0.05$.

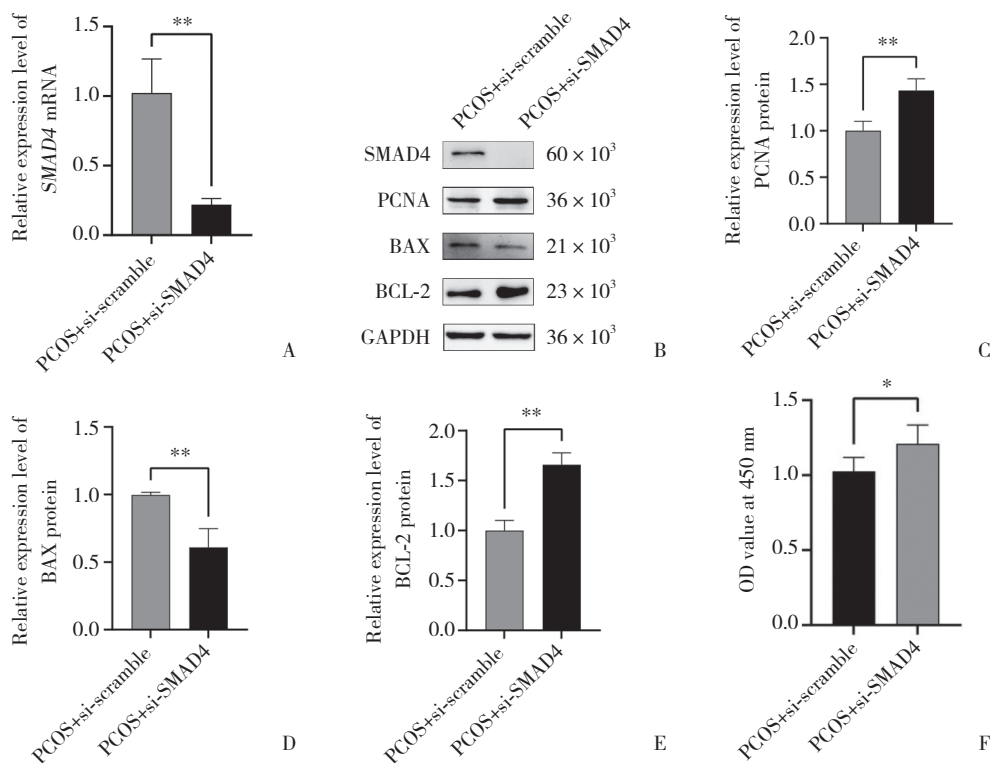
图3 2组大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4表达水平的比较

Fig.3 Comparison of SMAD4 expression in rat ovarian granulosa cells between the two groups

2.4 转染siRNA对大鼠卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的影响

实时定量PCR结果显示,siRNA显著降低PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4 mRNA表达水平。Western

blotting结果显示,siRNA显著降低PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4蛋白表达水平,PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中PCNA、BCL-2蛋白表达水平升高,BAX蛋白表达水平降低。siRNA可促进颗粒细胞的增殖(图4)。



A, quantitative real-time PCR; B, Western blotting; C, PCNA protein; D, BAX protein; E, BCL-2 protein; F, cell viability. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图4 SMAD4-siRNA对大鼠卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的影响

Fig.4 Effect of SMAD4-siRNA on the apoptosis of rat ovarian granulosa cells

3 讨论

PCOS是一种病因不明的异质性疾病,是引起女性排卵障碍性不孕、月经失调和高雄激素的重要原因^[6]。PCOS的发病基础是卵泡的程序化发育发生改变,即窦前卵泡生成过多和窦卵泡发育停滞。卵泡发育成熟是卵子发育成受精胚胎的必然条件,颗粒细胞作为卵泡内最大的功能细胞群,其增殖和分化直接影响卵泡发育,其凋亡异常可能是PCOS发病的主要原因^[7]。本研究采用DHEA法诱导SD大鼠,成功构建PCOS大鼠模型,体外分离、鉴定大鼠卵巢颗粒细胞,探讨PCOS大鼠卵巢颗粒细胞发育障碍的可能机制。

TGF- β 是一种多效性细胞因子,可以调节细胞生长、分化、细胞外基质重构、上皮-间质转化等^[8]。已发现哺乳动物中TGF- β 家族包括3种不同的亚型(TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3),它们的序列和结构具有较高的相似性,在体内也具有相似的生物功能,其中TGF- β 1在各种组织中的表达水平、生物活性较好。SMAD4基因编码的蛋白属于SMAD家族,目前

已知的SMAD蛋白至少有9种,其中SMAD4为唯一的共同介质,是TGF- β 信号的重要胞质内信号级联分子。SMAD4可以自身形成同源复合物或与其他激活型SMAD家族成员形成异源复合物,转移到细胞核内,与其他转录因子协同作用,调节TGF- β 应答基因的转录。本研究体外培养PCOS大鼠卵巢颗粒细胞,结果发现,PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中SMAD4基因表达水平明显高于正常大鼠。

既往研究^[9]发现,SMAD4表达水平降低可使TGF- β 介导的信号通路转录调控障碍。在体外培养的猪颗粒细胞中,SMAD4过表达会促进颗粒细胞增殖^[10],SMAD4可激活Wnt信号通路,抑制猪颗粒细胞凋亡^[11]。在敲除SMAD4基因的小鼠模型中,TGF- β 1信号的敏感性降低^[12]。研究^[13]证实,SMAD4和SMAD4依赖性TGF- β 信号通路与卵泡闭锁有关。另有研究^[14]发现,敲低SMAD4可以显著延长人颗粒细胞的细胞周期,抑制凋亡。以上研究均提示,SMAD4基因表达与颗粒细胞增殖、凋亡有关。为了进一步验证SMAD4基因过表达是否与PCOS大鼠卵巢颗粒细胞增殖、凋亡相关,本研究采用siRNA干扰SMAD4基因

表达,结果发现,敲低SMAD4后PCOS大鼠卵巢颗粒细胞中PCNA、BCL-2蛋白表达水平升高,BAX蛋白表达水平降低。提示敲低SMAD4可促进PCOS大鼠卵巢颗粒细胞增殖,抑制凋亡。

综上所述,本研究发现PCOS大鼠卵巢颗粒细胞发育障碍可能与SMAD4基因过表达有关,SMAD4有望成为治疗PCOS患者排卵障碍的潜在靶点。但SMAD4基因调控PCOS大鼠卵巢颗粒细胞发育障碍的具体机制尚不清楚,需要更多的动物和细胞实验证实。

参考文献:

- [1] 乔杰,齐新宇,徐雅兰,等. 关注影响女性健康的重要生殖内分泌疾病多囊卵巢综合征[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2020,36(1):1-9. DOI:10.19538/j.fk2020010101.
- [2] XING J, QIAO G, LUO X, et al. Ferredoxin 1 regulates granulosa cell apoptosis and autophagy in polycystic ovary syndrome [J]. Clin Sci (Lond), 2023, 137(6):453-468. DOI:10.1042/CS20220408.
- [3] CHAPMAN HA, WEI Y, MONTAS G, et al. Reversal of TGFβ1-driven profibrotic state in patients with pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2020, 382(11):1068-1070. DOI:10.1056/NEJMc1915189.
- [4] LI Q, HUO Y, WANG S, et al. TGF-β1 regulates the lncRNA transcriptome of ovarian granulosa cells in a transcription activity-dependent manner [J]. Cell Prolif, 2023, 56(1):e13336. DOI:10.1111/cpr.13336.
- [5] ZHANG Y, YU X, LIU L, et al. Mechanisms of DHEA-induced AMH increase in the ovarian tissues of PCOS rat [J]. Reprod Biol, 2023, 23(4):100797. DOI:10.1016/j.repbio.2023.100797.
- [6] HUDDLESTON HG, DOKRAS A. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. JAMA, 2022, 327(3):274-275. DOI:10.1001/jama.2021.23769.
- [7] 徐秋霞,乔岩岩. 颗粒细胞凋亡影响多囊卵巢综合征患者卵泡闭锁的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2024,32(1):214-219. DOI:10.3969/j.issn.1672-1993.2023.05.021.
- [8] LEE JH, MASSAGUÉ J. TGF-β in developmental and fibrogenic EMTs [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 2):136-145. DOI:10.1016/j.semcancer.2022.09.004.
- [9] IKENO S, NAKANO N, SANO K, et al. PDZK1-interacting protein 1 (PDZK1IP1) traps Smad4 protein and suppresses transforming growth factor-β (TGF-β) signaling [J]. J Biol Chem, 2019, 294(13):4966-4980. DOI:10.1074/jbc.RA118.004153.
- [10] LIU J, DU X, ZHOU J, et al. MicroRNA-26b functions as a proapoptotic factor in porcine follicular Granulosa cells by targeting Sma- and Mad-related protein 4 [J]. Biol Reprod, 2014, 91(6):146. DOI:10.1095/biolreprod.114.122788.
- [11] DU X, LI Q, YANG L, et al. SMAD4 activates Wnt signaling pathway to inhibit granulosa cell apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5):373. DOI:10.1038/s41419-020-2578-x.
- [12] DA ROS F, CARNEVALE R, CIFELLI G, et al. Targeting interleukin-1β protects from aortic aneurysms induced by disrupted transforming growth factor β signaling [J]. Immunity, 2017, 47(5):959-973.e9. DOI:10.1016/j.immuni.2017.10.016.
- [13] MCFEE RM, ROMEREIM SM, SNIDER AP, et al. A high-androgen microenvironment inhibits granulosa cell proliferation and alters cell identity [J]. Mol Cell Endocrinol, 2021, 531:111288. DOI:10.1016/j.mce.2021.111288.
- [14] BAO D, LI M, ZHOU D, et al. miR-130b-3p is high-expressed in polycystic ovarian syndrome and promotes granulosa cell proliferation by targeting SMAD4 [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 209:105844. DOI:10.1016/j.jsbmb.2021.105844.

(编辑 陈 姜)

(上接第222页)

- [1] Med, 2015, 373(15):1445-1456. DOI:10.1056/NEJMra1315399.
- [2] MOHR A, SIMON M, JOHA T, et al. Epidemiology of candidemia and impact of infectious disease consultation on survival and care [J]. Infection, 2020, 48(2):275-284. DOI:10.1007/s15010-020-01393-9.
- [3] ZUO XS, LIU YN, HU K. Epidemiology and risk factors of candidemia due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2021, 63:e20. DOI:10.1590/S1678-9946202163020.
- [4] 张可,王金宇,夏翠萍,等. 念珠菌血症患者的流行病学及死亡危险因素分析[J]. 中国抗生素杂志,2022,47(6):616-620. DOI:10.13461/j.cnki.cja.007353.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 现代实用医学,2003,15(7):460-465. DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2003.07.045.
- [6] CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts:CLSI supplement M60 (2nd ed)[S]. Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [7] CLSI. Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing:CLSI supplement M59 (3rd ed)[S]. Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [8] BILAL H, ZHANG DX, SHAFIQ M, et al. Six-year retrospective analysis of epidemiology, risk factors, and antifungal susceptibilities of candidiasis from a tertiary care hospital in South China [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(4):e0070823. DOI:10.1128/spectrum.00708-23.
- [9] 俞晓晨,郭大文,孙妍,等. 血培养分离出212株念珠菌的菌种分布及耐药性分析[J]. 中国真菌学杂志,2022,17(1):27-31. DOI:10.3969/j.issn.1673-3827.2022.01.006.
- [10] YLIPALOSAARI P, ALA-KOKKO TI, KARHU J, et al. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment [J]. Crit Care, 2012, 16(2):R62. DOI:10.1186/cc11307.
- [11] ORSETTI E, BRESCINI L, MAZZANTI S, et al. Characterisation of candidemia in patients with recent surgery: a 7-year experience [J]. Mycoses, 2019, 62(11):1056-1063. DOI:10.1111/myc.12988.
- [12] 乔莉,曹洋,袁宏勋,等. ICU中心静脉导管相关性血流感染的危险因素及病原菌分析[J]. 首都医科大学学报,2020,41(1):125-130. DOI:10.3969/j.issn.1006-7795.2020.01.024.
- [13] DEMIR KK, BUTLER-LAPORTE G, DEL CORPO O, et al. Comparative effectiveness of amphotericin B, azoles and echinocandins in the treatment of candidemia and invasive candidiasis: a systematic review and network meta-analysis [J]. Mycoses, 2021, 64(9):1098-1110. DOI:10.1111/myc.13290.

(编辑 于 溪)