

马丝, 夏薇, 温晓艳, 等. 干扰 OPN 基因对贵州黑山羊卵巢颗粒细胞增殖、凋亡及繁殖相关基因的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 1-8.
MA S, XIA W, WEN X Y, et al. Effects of interference with OPN gene on proliferation, apoptosis and reproduction related genes of ovarian granulosa cells in Guizhou black goat [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 1-8.

干扰 OPN 基因对贵州黑山羊卵巢颗粒细胞增殖、凋亡及繁殖相关基因的影响

马丝, 夏薇, 温晓艳, 潘智仁, 付业海, 刘彬, 陆情梅, 赵佳福*

(贵州大学动物科学学院/高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 旨在探究骨桥蛋白 (OPN) 基因与贵州黑山羊卵巢颗粒细胞 (OGCs) 增殖和凋亡间的关系。以贵州黑山羊为研究对象, 通过构建 OPN 基因的 4 个干扰载体, 转染至 OGCs, 并采用实时荧光定量 PCR 技术检测不同干扰载体对 OPN 基因的抑制效率, 筛选最佳干扰载体; 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK8) 检测细胞增殖活力, 细胞划痕试验检测其迁移能力; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测与其相关的繁殖标记基因和凋亡相关基因的表达情况。结果: 成功构建了 OPN 基因的 4 个干扰载体, 与 shRNA-NC 组相比, shRNA-OPN-222、shRNA-OPN-385 和 shRNA-OPN-741 均极显著抑制了 OPN 基因的表达 ($P < 0.01$), 且 shRNA-OPN-222 抑制效果最佳; CCK8 和细胞划痕试验结果表明, 与 shRNA-NC 组相比, shRNA-OPN-222 极显著抑制了 OGCs 的增殖活力和迁移能力 ($P < 0.01$); RT-qPCR 结果发现沉默 OPN 基因极显著抑制了核心蛋白聚糖 2 (DCN2)、细胞色素 P450 家族 19 亚家族 A 肽 1 (CYP19A1) 和雌激素受体 1 (ESR1) 的基因表达 ($P < 0.01$), 显著促进了 β -连环蛋白结合因子 2 (CTNNB2)、胱天蛋白酶 3 (Caspase-3) 和 Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bax) 的基因表达 ($P < 0.05$), 对铁蛋白重链 1 (FTH1)、胱天蛋白酶 9 (Caspase-9) 的基因表达无显著影响。结论: 干扰 OPN 基因, 可以有效抑制 OGCs 的增殖和迁移, 降低繁殖相关基因的表达水平, 同时促进细胞的凋亡进程, 这一研究为进一步阐明 OPN 基因影响山羊繁殖率的分子机制奠定了基础。

关键词: OPN 基因; 贵州黑山羊; 卵巢颗粒细胞; 细胞增殖; 繁殖相关基因

中图分类号: S814 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)05-0001-08

Effects of interference with OPN gene on proliferation, apoptosis and reproduction related genes of ovarian granulosa cells in Guizhou black goat

MA Si, XIA Wei, WEN Xiaoyan, PAN Zhiren, FU Yehai, LIU Bing, LU Qingmei, ZHAO Jiafu*

(College of Animal Science, Guizhou University/Key Laboratory of Genetics, Breeding and Reproduction of Plateau Mountain Animals of Ministry of Education/Guizhou Province Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Guiyang 550025, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the relationship between the osteopontin (OPN) gene and proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells (OGCs) in Guizhou black goats. Using Guizhou black goat as the research object, we screened the interfering vectors by constructing four interfering vectors of OPN gene, transfecting them into OGCs, and detecting the inhibition efficiency of different interfering vectors on the OPN gene by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). We used cell counting kit-8 (CCK8) to detect the proliferation viability of the cells, and the cell scratch assay to detect the migration ability. And we detected the expression of the reproductive marker genes and the apoptosis-related genes associated with them by fluorescence quantitative PCR. In this study, four interference vectors of the OPN gene were successfully constructed. shRNA-OPN-222, shRNA-OPN-385 and shRNA-OPN-741 all suppressed the gene expression of the OPN extremely significantly, compared with the shRNA-NC group ($P < 0.01$), and the suppression effect of shRNA-OPN-222 was the most effective. The results of the CCK8 and cell scratch assay showed that shRNA-OPN-222 highly significantly inhibited the

收稿日期: 2024-05-07; 修回日期: 2025-02-27

基金项目: 大学生 SRT 计划项目 (贵大 SRT 字 [2022] 085 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2022] 一般 089); 贵州省“生物育种先导性研究”项目 (黔科合支撑 [2022] 重点 033); 贵州省科技创新团队项目 (黔科合平台人才-CXTD [2023] 025)

第一作者: 马丝, 女, 回族, 本科

* 通信作者: 赵佳福, 高级实验师, 主要从事动物繁殖生理调控研究, E-mail: jfzhao@gzu.edu.cn.

proliferative vigour and migration ability of OGCs, compared with the shRNA-NC group ($P < 0.01$). The RT-qPCR results showed that silencing the OPN gene highly significantly inhibited the gene expression of the DCN2, CYP19A1 and ESR1 ($P < 0.01$), significantly promoted the gene expression of CTNNB2, Caspase-3 and Bax ($P < 0.05$), and had no significant effect on the gene expression of the FTH1, Caspase-9. In conclusion, this study indicated that interference with the OPN gene effectively inhibited the proliferation and migration of OGCs, lowered the expression level of the reproduction-related genes, and simultaneously promoted the apoptotic process of the cells. These results laid a foundation for further elucidation of the molecular mechanism by which the OPN gene affects the reproductive rate of goats.

Keywords: OPN gene; Guizhou black goat; ovarian granulosa cell; cell proliferation; reproduction-related genes

贵州黑山羊具有肉质好、食性广、耐粗饲、抗逆性强, 适宜高寒山区放牧饲养等特点, 是云贵高原最具代表性的本地山羊品种之一^[1]。相比于黔北麻羊和贵州白山羊, 贵州黑山羊繁殖性能较低, 年平均产羔率仅为 152%^[2], 严重制约了贵州黑山羊产业的发展。因此, 对贵州黑山羊现有群体进行提纯复壮, 选育出贵州黑山羊高繁品系, 就显得尤为重要。骨桥蛋白 (OPN) 是一种含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的分泌型糖基化磷蛋白, 具有多种生物学活性。1985 年, Frann 等^[3]将其正式命名为 OPN。随后的研究发现, OPN 在动物睾丸、胎盘、骨组织和卵巢等组织中均表达, 具有介导细胞聚集、黏附和增殖等作用^[4], 参与动物受精、胎盘形成^[5-6]、胚胎着床^[7]等生殖过程, 与动物繁殖性能密切相关。在卵巢癌上, 易韬等^[8]和魏苏等^[9]通过干扰卵巢癌细胞中 OPN 基因表达, 发现 OPN 基因具有抑制卵巢癌细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。在小鼠和绵羊上, Kramer 等^[10]证实 OPN 基因参与了小鼠的胚胎植入和胎盘形成, 在发情周期和妊娠早期, OPN 基因在小鼠输卵管中的表达可能受到雌激素调节, 说明 OPN 基因可能在卵母细胞受精和胚胎植入发育中发挥重要作用^[11]; Seo 等^[12]发现 OPN 与整联蛋白的相互作用, 与绵羊妊娠期间的胚胎着床和胎盘形成相关。在牛和湖羊上, Monaco 等^[13]在雄性个体中发现 OPN 能够提高牛体外胚胎生产的效率及影响牛的精子获能过程; Zhang 等^[14]研究表明, OPN 的表达与湖羊精子发生和精子功能密切相关。但目前针对 OPN 基因对山羊卵泡发育及卵母细胞成熟的影响还鲜有报道。

卵巢颗粒细胞 (OGCs) 作为卵巢组织的基本成分, 在维持激素合成、排卵等正常卵巢功能中发挥着重要作用^[15]。研究发现, OGCs 数量的多少与雌激素和孕激素的分泌水平密切相关, 间接影响了卵泡的发育, 而 OGCs 的过早凋亡不仅会导致卵泡的闭锁, 还会导致母体生育力下降、卵巢早衰、多囊卵巢综合征等卵巢源性疾病的发生^[16]。雌激素受体 1 (ESR1)、铁蛋白重链 1 (FTH1)^[17]、细胞色素 P450 家族 19 亚家族 A 肽 1 (CYP19A1)^[18]、核心蛋白聚糖 2 (DCN2)^[19]、 β -连环蛋白结合因子 2 (CTNNB2)^[20]

等基因在促进卵泡发育及成熟, 维持卵巢正常功能等方面发挥了积极作用, 通常作为卵泡发育和衡量哺乳动物繁殖性能高低的标志基因进行研究。但是, 目前关于 OPN 基因调控 OGCs 细胞增殖、凋亡对卵泡发育及繁殖标记基因表达之间的关系还不清楚。

因此, 本研究以贵州黑山羊 OGCs 为研究对象, 通过构建 OPN 基因的干扰载体, 用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术筛选出最佳干扰组, 并检测干扰 OPN 后对山羊繁殖相关基因 ESR1、DCN2、CYP19A1、FTH1、CTNNB2 和细胞凋亡相关基因胱天蛋白酶 3 (Caspase-3)、Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bax)、胱天蛋白酶 9 (Caspase-9) 转录水平的影响, 同时采用 CCK8 和细胞划痕技术检测干扰 OPN 对 OGCs 增殖、迁移的影响, 为进一步解析 OPN 基因影响贵州黑山羊卵泡发育的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验所用的贵州黑山羊卵巢组织, 采集于贵阳市花溪区麦坪黑山羊养殖基地, 年龄在 2 周岁左右。屠宰后的母羊立即采集其处于卵泡期的卵巢组织, 使用浓度为 75% 的酒精和含有双抗的 PBS 缓冲液分别冲洗离体卵巢组织 3 次, 并迅速将组织保存至装有 PBS 缓冲液的无菌离心管中, 置于冰上, 1 h 内带回实验室。随即在无菌环境下, 选取直径为 1~3 mm 的卵泡分离培养 OGCs。山羊屠宰试验经贵州大学实验动物伦理委员会审核批准 (编号: EAE-GZU-2023-T077)。

1.2 主要试剂

荧光定量 PCR Mix (伯乐生命医学产品有限公司, 美国); TAE 缓冲液, 限制性内切酶 *Bbs* I、*Pst* I、*Bam*H I, DNA Marker, 胎牛血清, Opti-MEM 培养基, DMEM/F12 (1:1) 培养基, TRIzol 裂解液, 逆转录试剂盒, Lipofectamine 2000 转染试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 细胞计数试剂盒-8 (CCK8) 细胞增殖检测试剂盒 (优兰迪生物科技有限公司, 中国); 氯仿、异丙醇、DEPC 水、PBS 缓冲液等试剂耗材 (贵州西宝生物科技有限公

司)。

1.3 引物设计与合成

根据 NCBI 上发表的相关基因的序列, 以 β -actin

为内参基因, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因引物。合成引物来源于上海擎科生物科技有限公司, 引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	GenBank 登录号	片段大小/bp	退火温度/℃
OPN	F: AGATGCCACAGAGGAGGACT R: TCTTCGCTGTGGTCAGTCAG	NM_001285667.1	96	59
ESR1	F: TGGGAGCAAATAGGAGC R: CTGGGCAAAGAGGGTG	XM_018053364.1	143	53
DCN2	F: AATGCCGGATGTAGGAG R: AAAGTGCGAAAGTCTGTG	NM_001285555.1	132	49
CYP19A1	F: AAGTGCTGAACCCAAGGCAT R: TCCAGTGAGCAGCAGGATTG	NM_001285747.1	89	60
CTNNB2	F: TCCGTAAGCCGAGAATG R: CAGCAGTTATCCGTGTTT	XM_056479179.1	271	52
FTH1	F: GCATTCAGCCCGTTCTC R: TTGCCAAATACTTCTTCAC	NM_001285609.1	145	52
Bax	F: CATCGGAGATGAATTGGACACTAA R: GGCCTTGAGCACCAGTTTGC	XM_018062750.1	147	62
Caspase-3	F: CCTGGACTGTCGTATTGAGA R: TAACCCGAGTAAGAATGTGC	NM_001284409.1	218	58
Caspase-9	F: TGAAGACCAGCAGACAAGC R: AGTGAATCCTCCAGAACCAA	XM_011527242.3	167	53
β -actin	F: GGTGCCCATCTACGAGG R: CTTGATGTCACGGACGATT	NM_001314342.1	154	54

1.4 OGCs 的培养及鉴定

将新鲜卵巢样品用 75% 酒精与含有双抗的 PBS 分别冲洗 3 次, 并将其转置于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的完全培养基 (含 15 mmol/L HEPES 缓冲液、L-谷氨酰胺和酚红) 中, 并用 10 mL 注射器将卵巢上多个 1~3 mm 成熟卵泡刺破, 使颗粒细胞充分释放。其次, 将装有细胞悬液的培养基转移至规格为 10 mL 的离心管中, 并以 1 000 r/min 的转速高速离心 5 min。弃上清液, 将沉淀重新悬浮于新的培养基中, 再重复上一步操作。最后将细胞以 1.5×10^6 个/mL 的密度接种在 75T 细胞培养瓶中, 并置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 培养期间需及时换液并及时冻存, 以便于后续试验。OGCs 采用间接免疫荧光法进行鉴定, 具体步骤参考文献 [21]。

1.5 shRNA 引物设计与合成

根据 NCBI 上公布的山羊 OPN 基因 CDS 序列 (XM_018064893.1), 采用 Clontech 公司的 shRNA 设计软件, 根据 shRNA 设计原则挑选出 4 条 OPN 基因效率最高的 shRNA 干扰靶序列, 并设计 1 对阴性对照序列。将 4 对 shRNA 引物和 1 对阴性对照引物分

别命名为 shRNA-OPN-222、shRNA-OPN-385、shRNA-OPN-536、shRNA-OPN-741 和 shRNA-NC, 序列由上海吉玛制药技术有限公司合成, 序列信息见表 2。

1.6 OPN 基因干扰载体构建

取 OPN 基因相应的正义链和反义链进行退火处理, 随后将退火产物连接到线性化的 pGPU6/GFP/Neo 载体上。将链接成功的载体转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 阳性质粒经测序鉴定成功后, 保存于 -80 ℃ 冰箱备用。构建的阳性质粒分别命名为 shRNA-OPN-222、shRNA-OPN-385、shRNA-OPN-536、shRNA-OPN-741, 阴性质粒为 shRNA-NC。

1.7 细胞转染

将颗粒细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 90% 时开始转染细胞。细胞转染步骤严格按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染, 设置 shRNA-OPN-222、shRNA-OPN-385、shRNA-OPN-536、shRNA-OPN-741 和 shRNA-NC 共 5 个处理组, 并设置空白对照组。转染细胞 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观

察细胞转染情况。

表 2 shRNA 干扰序列信息

质粒名称	引物序列 (5'→3')
shRNA-OPN-741	F: CACCGCAAGCTAGACCTAGATCATAATTCAAGAGATTATGATCTAGGTCTAGCTTGTTTTTTG R: GATCCAAAAACAAGCTAGACCTAGATCATAATCTCTTGAATTATGATCTAGGTCTAGCTTGC
shRNA-OPN-222	F: CACCGCCCGAGTAAGTCCAATGAAAGTTCAAGAGACTTTCATTGGACTTACTCGGGTTTTTTG R: GATCCAAAAAACCCGAGTAAAGTCCAATGAAAGTCTCTTGAACCTTCATTGGACTTACTCGGGC
shRNA-OPN-385	F: CACCGCCCACTGACATTCCAACAATCTTCAAGAGAGATTGTTGGAATGTCAGTGGGTTTTTTG R: GATCCAAAAAACCCACTGACATTCCAACAATCTCTTGAAGATTGTTGGAATGTCAGTGGGC
shRNA-OPN-536	F: CACCGAGACTTCACATCACACATAGTTCAAGAGACTATGCTGTATGTAAGTCTTTTTTTG R: GATCCAAAAAAGGACTTCACATCACACATAGTCTCTTGAACCTATGCTGTATGTAAGTCTCT
shRNA-NC	F: CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG R: GATCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAAC

1.8 CCK8 试验检测细胞增殖能力

待细胞密度达 90% 左右, 对其进行计数, 并按照 5 000 个/孔的细胞密度接种到 96 孔板, 随后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 使细胞充分贴壁。待细胞贴壁后, 转染 shRNA-OPN-222 与 shRNA-NC 干扰质粒, 每组设置重复孔 5 个, 转染方法同 1.7。在转染后 0、24 和 48 h, 避光条件下分别向每孔加入 10 μL 的 CCK8 溶液, 在培养箱内孵育 2 h, 随后用酶标仪测定其 OD_{450 nm} 值, 并绘制细胞增殖曲线。

1.9 细胞划痕检测细胞迁移能力

使用马克笔在 6 孔板背面, 每隔 0.5~1 cm 划一条直线穿过孔, 每孔至少穿过 3 条线。处理完的 6 孔板中布板 OGCs, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 待细胞长满至 90%; 用 10 μL 枪头参照直尺, 按照与标记线垂直的方向在培养细胞上划一条直线, 且枪头垂直于 6 孔板; 后用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 以去除划痕处的细胞, 并加入无血清培养基, 将处理完的细胞, 按照 1.7 的方法进行转染, 最后将 6 孔板放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 取培养 0、24、48 h 的细胞于显微镜下观察、拍照, 最后通过 ImageJ 软件计算划痕区域的面积, 比较 shRNA-NC 组和 shRNA-OPN-222 组转染 24 和 48 h 后细胞迁移能力的大小。

1.10 RT-qPCR 检测基因的表达

转染细胞 48 h 后, 采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 随后采用超微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度和质量, 并用 DEPC 水将 RNA 浓度调整至统一浓度, 置于 -80 °C 冰箱保存备用。将提取的 OGCs 总 RNA 反转录为 cDNA, 采用 RT-qPCR 检测干扰 OPN 基因后, 对山羊繁殖相关基因 DCN2、CYP19A1、

ESR1、FTH1、CTNNB2 和凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Bax 基因表达的影响。反应体系: cDNA 1 μL, 2×RealStar FastSYBR RT-qPCR Mix 10 μL, High/Low ROX Reference Dye 0.4 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 反应 40 个循环。在 RT-qPCR 试验中, β-actin 为内参基因, 每组 3 个重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析。

1.11 数据统计与分析

试验均进行了 3 次以上的生物学重复。所有试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 使用 GraphPad Prism 9 软件处理图表。结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 OPN 基因干扰载体转染效率

转染细胞 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞转染情况。结果显示, 干扰组 (图 1A~D) 及阴性对照组 (图 1E) 在倒置荧光显微镜下均可见明显的绿色荧光, 且转染效率基本一致, 而空白对照组 (图 1F) 则未见荧光, 说明每组干扰载体的转染效率完全满足后续试验要求, 可进行下一步试验。

2.2 RT-qPCR 检测不同干扰载体的干扰效率

转染不同干扰载体后, 对 OPN 基因的干扰效果见图 2。与 shRNA-NC 组相比, shRNA-OPN-222、shRNA-OPN-385 和 shRNA-OPN-741 均极显著下调了 OPN 基因的表达 ($P<0.01$), 而 shRNA-OPN-536 极显著上调了 OPN 基因的表达 ($P<0.01$)。由结果可知, shRNA-OPN-222 是干扰 OPN 基因表达的最佳载体, 可作为后续功能验证的主要干扰载体。

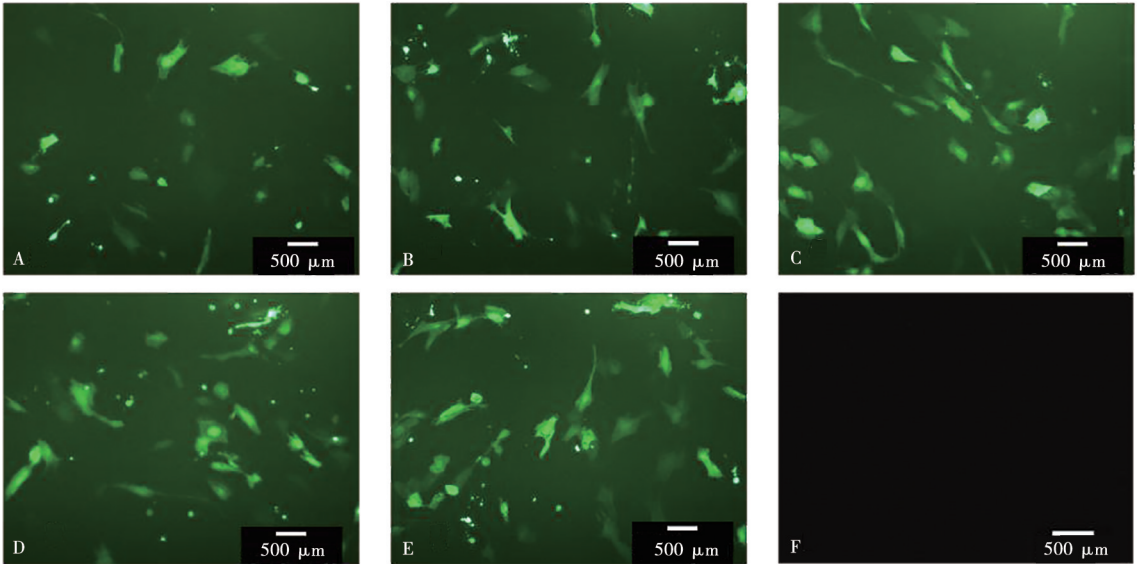
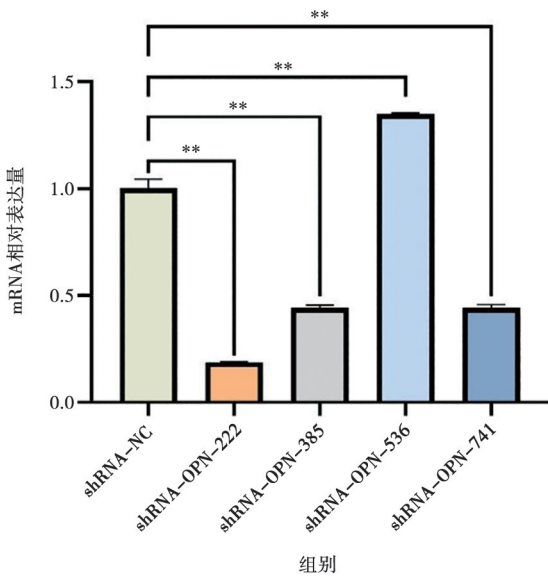


图 1 shRNA-OPN-222; B. shRNA-OPN-385; C. shRNA-OPN-536; D. shRNA-OPN-741; E. shRNA-NC; F. 空白对照。

图 1 荧光蛋白法检测 OPN 基因不同干扰载体的转染效率



组间比较，**表示差异极显著 ($P < 0.01$)，下同。

图 2 不同干扰载体对 OPN 基因的抑制效率

2.3 干扰 OPN 基因对 OGCs 增殖能力的影响

通过 CCK8 试验检测干扰 OPN 基因 0、24、48 h 后的结果见图 3。与 shRNA-NC 组相比，转染 shRNA-OPN-222 (shRNA-222) 48 h 后，OGCs 增殖能力极显著减弱 ($P < 0.01$)，表明干扰 OPN 基因后，能够明显抑制 OGCs 的增殖。

2.4 干扰 OPN 基因对 OGCs 迁移能力的影响

shRNA-222 和 shRNA-NC 两组细胞经划痕处理后，在 0、24、48 h 细胞迁移情况如图 4 所示。用

ImageJ 软件计算细胞迁移率，结果发现，干扰组 OGCs 在 48 h 迁移距离极显著低于 shRNA-NC 组 ($P < 0.01$)。由该试验结果可知干扰 OPN 的表达显著抑制了 OGCs 的迁移能力。

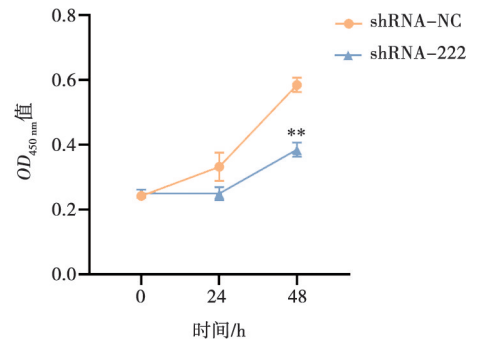


图 3 CCK8 检测转染 shRNA-OPN-222 后 OGCs 的增殖曲线

2.5 干扰 OPN 基因对繁殖相关基因转录水平的影响

干扰 OPN 基因后，对山羊繁殖相关基因 DCN2、ESR1、CYP19A1、FTH1 和 CTNNB2 转录水平的影响见图 5。干扰 OPN 基因后，繁殖相关基因 ESR1、DCN2、CYP19A1 的 mRNA 表达量极显著低于 shRNA-NC 组 ($P < 0.01$)；CTNNB2 基因的 mRNA 表达量与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$)；FTH1 基因的 mRNA 表达量与对照组相比无显著差异。以上结果表明，体外沉默 OPN 基因可以抑制山羊繁殖相关基因 DCN2、CYP19A1 和 ESR1 的表达。

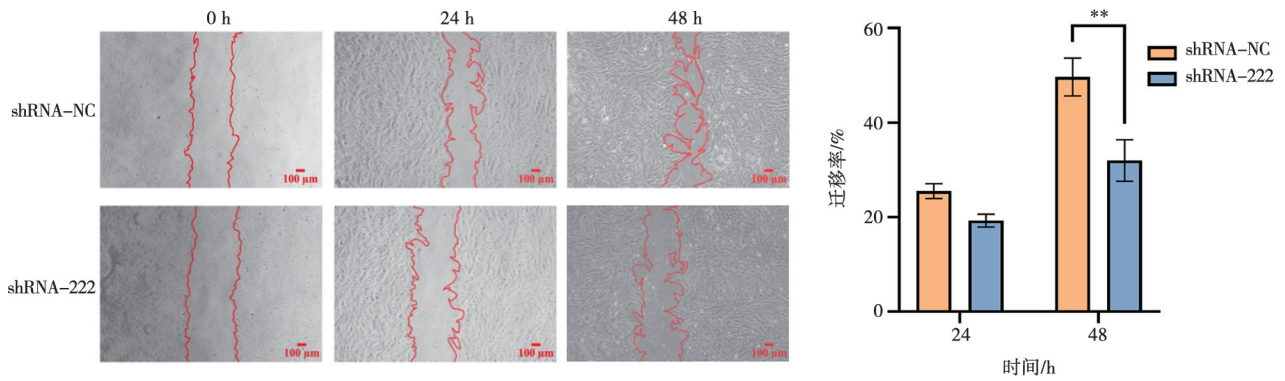
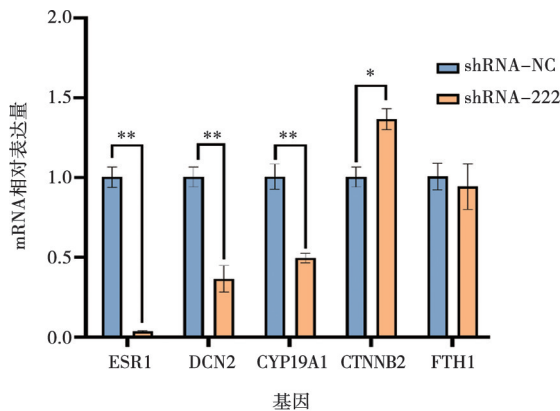


图4 干扰 OPN 后 OGCs 24 和 48 h 的细胞迁移比较



* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 干扰 OPN 基因对山羊繁殖相关基因的影响

2.6 干扰 OPN 基因对凋亡相关基因转录水平的影响

干扰 OPN 基因对 Caspase-3、Caspase-9 和 Bax 的转录水平影响如图 6 所示。shRNA-222 与 shRNA-NC 组相比，可以有效促进 Caspase-3 和 Bax 的转录，且差异极显著 ($P < 0.01$)，进一步说明干扰 OPN 可以促进 OGCs 的凋亡；但 Caspase-9 基因表达与 shRNA-NC 组相比，无显著性差异。

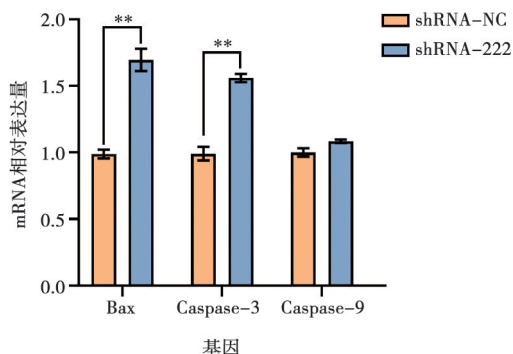


图6 干扰 OPN 对凋亡相关基因表达量的影响

3 讨论

3.1 OPN 基因与 OGCs 增殖

OGCs 是卵巢中重要的体细胞之一，通过表达、分泌促卵泡激素受体 (FSHR) 和促黄体激素受体 (LHR) 等，为卵母细胞提供营养，参与调控卵泡发育、卵母细胞成熟及排卵整个过程^[22]。研究发现，OGCs 的增殖和卵泡液的分泌有助于原始卵泡发育为有腔卵泡，并促进格拉夫 (成熟) 卵泡的形成，而 OGCs 凋亡、肥大或退化会导致代谢功能障碍或增殖异常，进而诱导卵泡闭锁^[23-25]。OPN 作为一种基质细胞外糖磷酸蛋白，在细胞增殖方面具有重要的生理学意义。在 Zeng 等^[26]对 T/miR-181a-5p/OPN 轴的研究发现，miR-181a-5p 能直接靶向 OPN 抑制 DNA 合成，降低软骨细胞活力，同时促进软骨细胞凋亡。Chen 等^[27]通过构建 OPN 干扰和过表达模型，研究不同 OPN 表达水平对细胞增殖和侵袭的影响，结果表明干扰 OPN 后裸鼠的肿瘤体积和重量明显减小；在人体卵巢上的研究表明敲除 OPN 基因后，卵巢癌细胞增殖率明显降低，反之卵巢癌细胞的增殖活率升高^[28]。以上结果说明 OPN 基因可促进细胞增殖。本研究发现，干扰 OPN 基因后，能够明显抑制山羊 OGCs 的增殖和迁移能力，进一步证明了 OPN 基因可促进细胞增殖。

3.2 OPN 基因与山羊繁殖相关基因的关系

繁殖性状通常具有低至中等遗传力，通过传统的表型选择效果并不佳，大多数绵羊、山羊品种产羔数和遗传力均较低^[29]。目前，科研人员已借助转录组、全基因组、蛋白组等测序技术挖掘出 BMP15、GDF9、FSHR、ESR1、DCN2、CYP19A1、FTH1 和 CTNNB2 等与绵羊、山羊多胎性状密切相关的候选基因，对加快高繁绵羊、山羊新品系的培育奠定了重要基础^[30]。研究发现，OPN 基因与上述繁殖相关基因相互作用，在调节激素合成分泌、卵泡生长发育、卵

子成熟等方面同样发挥了重要作用。DCN 基因主要定位于卵巢的颗粒细胞、垂体细胞或子宫内膜上皮细胞等细胞中^[31]；而 OPN、DCN 与细胞外基质蛋白质之间的相互作用，对卵泡膜细胞内部环境具有潜在的影响，进而调控排卵过程^[32]。DCN2 是生物机体中独特的排卵基因，在排卵前期及排卵过程中起重要的作用，可为某些类型的不育症提供治疗^[33]。CYP19A1 基因主要在卵巢、下丘脑表达^[34]。有研究表明干扰 OPN5 基因的表达，能够抑制 OGCs 的表达，同时能降低 CYP19A1 基因的表达水平^[35]。本研究发现，干扰 OPN 基因后，同样能抑制 CYP19A1 基因的表达，这说明 OPN 基因与 CYP19A1 基因间必定存在内在联系。杨安琪等^[36]在兔的 OGCs 中发现，CYP19A1 可以促进 OGCs 的增殖并调控雌激素合成相关基因的表达，而在蔡明芳^[37]的研究中发现雌激素可以促进 OPN 基因的表达。ESR1 是 ER α 的编码基因之一，ESR1 不仅参与子宫的发育、对雌激素的反应和蜕膜化，还在卵巢功能中发挥作用^[38-39]。ESR1 缺失小鼠表现出无排卵和囊性卵巢表型，表明 ESR1 在卵巢发育和功能中的重要性。有研究表明 OPN 基因的生物效应是相对独立的，并未受 ESR 限制，可同时选择 ESR 和 OPN 同时进行标记，以提高母猪的窝产仔数^[40]。刘乙等^[41]通过分析 ESR 和 OPN 两者的基因多态性，发现两者对产活仔数、健仔数、窝重等繁殖性状均有影响。在本研究中，沉默 OPN 基因后导致 ESR1 基因的表达量下调，与前人 OPN 基因和 ESR1 基因的生物效应是相对独立的研究结果不符，而 OPN 基因是如何下调 ESR1 基因表达的分子机制需要进一步研究。在 Arora 等^[42]的研究中发现，FTH1 和 OPN 基因在泌乳早期、中期和晚期几乎等量表达，这表明这两个基因可能在乳汁中起到类似的作用，也可能与动物繁殖性状有关。本试验干扰 OPN 基因后 FTH1 基因虽未达到显著性差异水平，但其总体表达趋势有所下降。因此，可以推测 FTH1 与 OPN 基因在不同生理阶段的表达量具有的一定的关联。

3.3 干扰 OPN 与山羊 OGCs 凋亡的关系

研究表明 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 是判断细胞凋亡的重要指标，在参与细胞凋亡的级联反应中发挥了重要作用。Bax 通过胞质转移至线粒体并与线粒体膜相结合，导致线粒体外膜通透化，从而释放细胞色素 C 等促凋亡物质^[43]。线粒体途径关键酶 Caspase-9 通过与凋亡酶激活因子 1 (Apaf-1) 结合，最终形成多蛋白复合物，Caspase-9 的激活又激活了 Caspase-3，最终导致细胞的凋亡^[44]。Luo 等^[45]通过调节 NR4A1 基因介导的线粒体机制抑制大鼠卵巢膜

间质细胞的凋亡，从而改善卵巢功能早衰大鼠的生殖功能，进而证实线粒体机制对卵巢发育具有重要作用。曾强等^[46]通过研究富含亮氨酸的 α 蛋白对 OPN 基因的表达进行下调，显著促进了 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 凋亡相关蛋白的表达。另外，徐伟等^[47]研究发现，干扰 OPN 后，卵巢癌细胞的侵袭和迁移能力显著降低。本研究结果表明，在山羊 OGCs 中干扰 OPN 基因的表达，显著抑制了 OGCs 的增殖和迁移，并促进了相关凋亡基因表达量的升高，这与前人的研究结果相契合。因此，可推测干扰 OPN 基因能够引起 OGCs 的凋亡。

综上所述，干扰 OPN 基因抑制了 OGCs 的增殖、迁移及繁殖相关基因的表达，促进了细胞的凋亡，相关研究结果为 OPN 作为贵州黑山羊多羔品系选育的重要候选基因提供了参考。

参考文献：

- [1] 许茹琳, 孔德顺. 贵州黑山羊的遗传资源特点及开发利用 [J]. 中国畜禽种业, 2014, 10 (2): 54-55.
- [2] 周明帅, 温晓艳, 张艳, 等. COL1A1 基因在贵州黑山羊性腺轴中的表达及其对产羔相关基因的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30 (11): 2152-2162.
- [3] FRANZEN A, HEINEGARD D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix [J]. Biochem J, 1985, 232 (3): 715-724.
- [4] 罗仍卓么, 王立贤. 猪 OPN 基因与繁殖性状的关联分析 [J]. 农业生物技术学报, 2008 (3): 412-416.
- [5] 毛建文. 山羊 OPN 基因多态性及其与胎盘效率、产羔数的关联分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [6] KIM S, SHIN T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis [J]. J Vet Sci, 2007, 8 (2): 107-110.
- [7] 杨启鑫. SPP1 蛋白在小鼠早期妊娠子宫中的表达研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [8] 易韬, 蔡小蓉. 骨桥蛋白 RNA 干扰对人卵巢癌 SKOV3 细胞作用的研究 [J]. 四川解剖学杂志, 2011, 19 (2): 7-9.
- [9] 魏苏, 陆晓媛. RNA 干扰 OPN 对人卵巢癌细胞 HO-8910PM 体外增殖的影响 [J]. 徐州医学院学报, 2010, 30 (8): 504-506.
- [10] KRAMER A C, ERIKSON D W, MCLENDON B A, et al. SPP1 expression in the mouse uterus and placenta: implications for implantation [J]. Biol Reprod, 2021, 105 (4): 892-904.
- [11] LIU Q, XIE Q Z, ZHOU Y, et al. Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse [J]. Zygote, 2015, 23 (4): 622-630.
- [12] SEO H, FRANK J W, BURGHARDT R C, et al. Integrins and OPN localize to adhesion complexes during placentation in sheep [J]. Reproduction, 2020, 160 (4): 521-532.
- [13] MONACO E, GASPARRINI B, BOCCIA L, et al. Effect of osteopontin (OPN) on *in vitro* embryo development in cattle [J]. Theriogenology, 2009, 71 (3): 450-457.

- [14] ZHANG G, LAN S, JIA R, et al. Age-associated and tissue-specific expression of osteopontin in male Hu sheep reproductive tract [J]. *Tissue Cell*, 2016, 48 (5): 496-502.
- [15] ZHOU R, LIU D. The function of exosomes in ovarian granulosa cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 394 (2): 257-267.
- [16] TU J, CHEUNG A H, CHAN C L, et al. The role of microRNAs in ovarian granulosa cells in health and disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 174.
- [17] 王丽, 李万宏, 李发弟, 等. FTH1 基因多态性与湖羊和小尾寒羊产羔数的关联分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39 (4): 1529-1534.
- [18] ZHANG Y, CHEN X, ZHOU Z, et al. CYP19A1 may influence lambing traits in goats by regulating the biological function of granulosa cells [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12 (15): 1911.
- [19] 曹秋瑜, 姚望, 杜星, 等. Dcn 基因在猪卵巢颗粒细胞凋亡中的作用 [J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44 (4): 748-755.
- [20] WANG W, TENG J, HAN X, et al. miR-458b-5p regulates ovarian granulosa cells proliferation through Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting CTNBN1 [J]. *Anim Biosci*, 2021, 34 (6): 957.
- [21] 陈祥, 敖叶, 李诚兰, 等. NGF 基因在黔北麻羊卵巢颗粒细胞及组织的表达分析 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43 (7): 1558-1566.
- [22] 汪鸽, 韩延华. 早发性卵巢功能不全的颗粒细胞凋亡机制及中医药干预研究进展 [J]. *中医药信息*, 2022; 39 (2): 83-88.
- [23] LIU L, MA J, WEI Z, et al. Effects of zearalenone on apoptosis and copper accumulation of goat granulosa cells *in vitro* [J]. *Biology (Basel)*, 2023, 12 (1): 100.
- [24] MATSUDA F, INOUE N, MANABE N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells [J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58 (1): 44-50.
- [25] MANABE N, MATSUDA-MINEHATA F, GOTO Y, et al. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries [J]. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43: 268-272.
- [26] ZENG S, TU M. The lncRNA MIAT/miR-181a-5p axis regulates osteopontin (OPN)-mediated proliferation and apoptosis of human chondrocytes in osteoarthritis [J]. *J Mol Histol*, 2022, 53 (2): 285-296.
- [27] CHEN B, LIANG S, GUO H, et al. OPN promotes cell proliferation and invasion through NF- κ B in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Genet Res (Camb)*, 2022, 2022: e5.
- [28] HU H, LIU Z, LIU C. Correlation of OPN gene expression with proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells and prognosis of patients [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17 (3): 2788-2794.
- [29] NOSRATI M, ASADOLLAHPOUR N H, AMIRI G Z, et al. Whole genome sequence analysis to detect signatures of positive selection for high fecundity in sheep [J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54 (2): 358-364.
- [30] 毛静艺. 基于转录组测序鉴定济宁青山羊多胎性状相关基因及通路 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2023.
- [31] YAO X, YANG F, EL-SAMAHY M A, et al. Identification and characterization of unique and common lncRNAs and mRNAs in the pituitary, ovary, and uterus of Hu sheep with different prolificacy [J]. *Genomics*, 2022, 114 (6): 110511.
- [32] KULUS J, KULUS M, KRANC W, et al. Transcriptomic profile of new gene markers encoding proteins responsible for structure of porcine ovarian granulosa cells [J]. *Biology*, 2021, 10 (11): 1214.
- [33] KEDEM A, ULANENKO-SHENKAR K, YUNG Y, et al. Elucidating Decorin's role in the preovulatory follicle [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13: 1-12.
- [34] 田志龙, 刘秋月, 王翔宇, 等. CYP11A1、CYP17A1、CYP19A1 基因在小尾寒羊下丘脑-垂体-卵巢轴的表达 [J]. *中国农业大学学报*, 2019, 24 (4): 87-93.
- [35] 刘付德, 潘建秋, 江丹莉, 等. OPN5 对鸭颗粒细胞凋亡, 增殖及类固醇激素生成的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021 (12): 52.
- [36] 杨安琪, 李嘉诚, 宋颖, 等. CYP19A1 对兔卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (10): 4209-4219.
- [37] 蔡明芳. 雌激素经由调控骨桥蛋白促进肺腺癌细胞生长及移行之信息传递路径 [D]. 台北: 台北医学大学医学科学研究所, 2010: 1-85.
- [38] FORREST D, TSAI S. Preface [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 125: xv-xvi.
- [39] PELLETIER G, EL-ALFY M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85 (12): 4835-4840.
- [40] 赵默然, 李平华, 黄瑞华. 与猪产仔性状相关的候选基因研究进展 [C]. 第九届南京农业大学畜牧兽医学学术年会暨生猪标准化与生产效益持续提升研讨会, 南京, 2015.
- [41] 刘乙, 马力鹏, 李涛, 等. ESR、OPN 和 RBP4 基因多态性对大白猪繁殖性状的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44 (1): 8.
- [42] ARORA R, SHARMA A, SHARMA U, et al. Buffalo milk transcriptome: a comparative analysis of early, mid and late lactation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 5993.
- [43] 冯健愉, 朱玉山, 陈佳, 等. Bel-2 家族蛋白的生理功能及结构基础 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41 (8): 1477-1489.
- [44] DU C, FANG M, LI Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [J]. *Cell*, 2000, 102 (1): 33-42.
- [45] LUO Q, TANG Y, JIANG Z, et al. hUCMSCs reduce theca interstitial cells apoptosis and restore ovarian function in premature ovarian insufficiency rats through regulating NR4A1-mediated mitochondrial mechanisms [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20 (1): 125.
- [46] 曾强, 张宇, 陈辉, 等. 富含亮氨酸的 α 2 糖蛋白 1 通过 RUNX1/OPN 信号调节非小细胞肺癌细胞的增殖, 迁移和侵袭 [J]. *临床外科杂志*, 2023, 31 (6): 562-567.
- [47] 徐伟, 张岚, 施薇. 骨桥蛋白 shRNA 表达载体下调骨桥蛋白表达对卵巢癌细胞侵袭性的影响 [J]. *现代妇产科进展*, 2013 (2): 22.