

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1526-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240606

过表达 SLC7A5 基因对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响及其机制

张京顺, 邹颖刚, 郑连文

(吉林大学第二医院生殖中心, 吉林 长春 130041)

[摘要] **目的:** 探讨过表达溶质载体家族7成员5 (SLC7A5) 基因对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响, 并阐明其相关机制。**方法:** 4只3周龄SPF级SD雌性大鼠, 提取原代大鼠卵巢颗粒细胞, 分为阴性对照组 (NC组) 和促卵泡激素受体 (FSHR) 染色组 (FSHR组)。免疫荧光染色法观察大鼠卵巢颗粒细胞中FSHR蛋白表达情况, 鉴定原代大鼠卵巢颗粒细胞是否成功分离。将大鼠卵巢颗粒细胞分为对照组 (转染空载体质粒) 和OE-SLC7A5组 (转染SLC7A5过表达质粒), 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法和Western blotting法验证细胞转染效率。流式细胞术检测2组卵巢颗粒细胞凋亡率, 流式细胞术检测2组不同细胞周期卵巢颗粒细胞百分率, RT-qPCR法检测2组卵巢颗粒细胞中SLC7A5、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-3、Caspase-8和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA表达水平, Western blotting法检测2组卵巢颗粒细胞中SLC7A5、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Caspase-8、cleaved Caspase-8和TNF- α 蛋白表达水平。**结果:** 荧光显微镜下卵巢颗粒细胞呈长梭形或者不规则形, 特异性表达FSHR, NC组未见FSHR绿色荧光表达, FSHR组可见FSHR绿色荧光表达, 提示大鼠原代卵巢颗粒细胞成功分离。与对照组比较, OE-SLC7A5组卵巢颗粒细胞中SLC7A5 mRNA和蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), 提示SLC7A5过表达质粒成功转染卵巢颗粒细胞。流式细胞术检测, 与对照组比较, OE-SLC7A5组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, OE-SLC7A5组S期卵巢颗粒细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR法检测, 与对照组比较, OE-SLC7A5组卵巢颗粒细胞中TNF- α 、Caspase-3和Caspase-8 mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。Western blotting法检测, 与对照组比较, OE-SLC7A5组卵巢颗粒细胞中TNF- α 、Caspase-8、cleaved Caspase-8、Caspase-3、cleaved Caspase-3和SLC7A5蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论:** SLC7A5蛋白表达增加能够通过上调TNF- α 、Caspase-8和Caspase-3凋亡通路表达, 促进颗粒细胞凋亡。

[关键词] 溶质载体家族7成员5; 大鼠卵巢颗粒细胞; 细胞凋亡; 肿瘤坏死因子 α ; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶8

[中图分类号] R711.75 **[文献标志码]** A

Effect of over-expression SLC7A5 on apoptosis of ovarian granulosa cells in rats and its mechanism

ZHANG Jingshun, ZOU Yinggang, ZHENG Lianwen

(Reproductive Center, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of over-expression of solute carrier family 7 member 5 (SLC7A5) gene on the apoptosis of ovarian granulosa cells of the rats, and to clarify its related mechanism.

[收稿日期] 2024-01-08

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20210101268JC, YDZJ202201ZYTS084)

[作者简介] 张京顺 (1991-), 女, 辽宁省抚顺市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事多囊卵巢综合征发病机制方面的研究。

[通信作者] 郑连文, 主任医师, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: davezheng@sohu.com)

Methods: Four 3-week-old SPF grade SD female rats were used to extract the primary ovarian granulosa cells of the rats. These cells were divided into negative control group (NC group) and follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) staining group (FSHR group). Immunofluorescence staining was used to detect the expressions of FSHR protein in the ovarian granulosa cells of the rats to identify the successful isolation of the primary ovarian granulosa cells of the rats. The ovarian granulosa cells were divided into control group (transfected with empty vector plasmid) and OE-SLC7A5 group (transfected with SLC7A5 over-expression plasmid). Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to verify the transfection efficiency of the cells; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates and cell cycle percentages of the ovarian granulosa cells in two groups; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of SLC7A5, cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-3, Caspase-8, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in the ovarian granulosa cells in two groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of SLC7A5, Caspase-3, cleaved Caspase-3, Caspase-8, cleaved Caspase-8, and TNF- α proteins in the ovarian granulosa cells in two groups. **Results:** The fluorescence microscope observation results showed that the ovarian granulosa cells appeared spindle-shaped or irregular and specifically expressed FSHR. No FSHR green fluorescence was observed in NC group, while FSHR green fluorescence expression was observed in FSHR group, indicating successful isolation of primary ovarian granulosa cells of the rats. Compared with control group, the expression levels of SLC7A5 mRNA and protein in the ovarian granulosa cells in OE-SLC7A5 group were significantly increased ($P < 0.05$), indicating successful transfection of SLC7A5 over-expression plasmid into the ovarian granulosa cells. The flow cytometry results showed that compared with control group, the apoptotic rate of the cells in OE-SLC7A5 group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the percentage of the ovarian granulosa cells at S phase in OE-SLC7A5 group was significantly decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of TNF- α , Caspase-3, and Caspase-8 mRNA in the ovarian granulosa cells in OE-SLC7A5 group were significantly increased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of TNF- α , Caspase-8, cleaved Caspase-8, Caspase-3, cleaved Caspase-3, and SLC7A5 proteins in the ovarian granulosa cells in OE-SLC7A5 group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The increased expression of SLC7A5 protein promotes the apoptosis of the granulosa cells by upregulating the expressions of TNF- α , Caspase-8, and Caspase-3 apoptotic pathways.

KEYWORDS Solute carrier family 7 member 5; Ovarian granulosa cell; Apoptosis; Tumor necrosis factor- α ; Cysteinyl aspartate specific proteinase-3; Cysteinyl aspartate specific proteinase-8

溶质载体家族7成员5 (solute carrier family 7 member 5, SLC7A5) 基因定位于人16号染色体, 其编码产物为L型氨基酸转运体1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1), 主要功能是转运特定氨基酸, 为细胞的生长提供原料^[1-2]。不同组织和细胞中SLC7A5蛋白表达水平不同, 如在大脑、睾丸、卵巢和胎盘等组织中SLC7A5蛋白高表达, 而在肺、心脏和肝脏等组织中SLC7A5蛋白表达水平较低^[3]。研究^[4]显示: SLC7A5蛋白在多种肿瘤细胞中高表达, 提示其对肿瘤的快速生长和增殖可能起着重要的作用, 包括乳腺癌^[5]、卵巢癌^[6]和子宫内膜癌^[7]等女性常见的癌症。SLC7A5不仅与癌症的预后不良有关, 还与化疗耐药有密切关

联。此外, SLC7A5在胰岛素抵抗、炎症反应和神经系统疾病中也发挥重要作用^[8]。本课题组前期研究^[9]结果显示: 来曲唑诱导的多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 模型大鼠卵巢组织中SLC7A5 mRNA表达水平明显升高, 提示SLC7A5可能在PCOS的发生发展中发挥一定的作用。但SLC7A5在卵巢组织中的功能尚未完全阐明。卵巢颗粒细胞作为卵巢内重要的类固醇激素合成细胞, 在卵泡的发育及成熟过程中发挥重要作用^[10]。SLC7A5在颗粒细胞中的功能尚未见报道。本研究探讨SLC7A5对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响, 并阐明其具体的作用机制, 为研究SLC7A5在PCOS中的病理机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 4只3周龄SPF级SD雌性大鼠,体质量约50 g,购于辽宁长生生物有限公司,饲养于吉林大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(吉)2018-0001。血促性素购于宁波第二激素厂,DMEM/F12培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购于美国Hyclone公司,兔抗促卵泡激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)多克隆抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)标记山羊抗兔抗体、鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗、兔抗含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)-3抗体和兔抗Caspase-8抗体购于上海Bioworld分公司,pcDNA3.1质粒、SLC7A5过表达质粒和大肠杆菌菌株DH5A购于生工生物工程(上海)股份有限公司,无内毒素质粒大提试剂盒购于北京天根生化科技有限公司,FuGENE HD转染试剂购于瑞士Roche公司,细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术股份有限公司,兔抗SLC7A5抗体购于美国INVITROGEN公司,兔抗cleaved Caspase-8抗体购于美国Affinity Biosciences公司,兔抗cleaved Caspase-3抗体购于美国Cell Signaling Technology公司。3500P实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪(型号:MX3005P)购于美国安捷伦科技有限公司,微量紫外分光光度仪(型号:NANODROP 2000)购于美国Thermo公司,酶标仪(型号:EON)购于美国BIOTEX公司,流式细胞分析仪(型号:CYTOFLEX LX)购于美国BECKMAN公司。

1.2 大鼠卵巢原代颗粒细胞分离和培养 4只3周龄SPF级SD雌性大鼠,体质量约50 g,适应性喂养2 d,腹腔注射血促性素50 IU,48 h后处死。采用75%乙醇溶液彻底消毒,后置于超净台,逐层剪开大鼠腹部皮肤和腹膜,找到双侧卵巢,分离卵巢表面被覆筋膜及脂肪组织,PBS缓冲液冲洗3次,后置入DMEM/F12培养基中。在显微镜下,使用1 mL注射器针头充分刺破卵泡,加入适量

0.25%胰蛋白酶,置入37℃、5%CO₂培养箱中彻底消化,间隔10 min从培养箱取出,用移液枪反复吹打。20 min后利用显微镜观察颗粒细胞形成单个细胞时,加入含FBS的培养液终止消化。将上述组织细胞液通过100 μm细胞筛过滤收集细胞悬液,离心后弃上清。加入含10% FBS和1%双抗的DMEM/F12培养基,显微镜下计数细胞后接种于相应的细胞培养板中^[11],用于后续实验。

1.3 免疫荧光染色法观察大鼠卵巢颗粒细胞中FSHR蛋白表达情况 取大鼠卵巢颗粒细胞,分为阴性对照组(NC组)和FSHR染色组(FSHR组)。将卵巢颗粒细胞接种于6孔细胞培养板,于细胞生长密度为70%~80%时,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min。预冷的冰甲醇室温固定20 min,PBS缓冲液洗涤3次,随后加入0.1% TritonX-100,室温放置10 min,PBS缓冲液洗涤3次。加入1% BSA,室温放置10 min,弃去封闭液,加入FSHR一抗,4℃孵育过夜。次日,弃去一抗,PBS缓冲液洗涤3次;加入FITC标记山羊抗兔二抗,室温避光孵育2 h;弃去二抗,PBS缓冲液洗涤3次;加入PI避光放置10 min,PBS缓冲液洗涤3次;95%甘油封片后,显微镜下观察2组大鼠卵巢颗粒细胞中FSHR蛋白表达情况并拍照。FSHR蛋白为颗粒细胞的标志性蛋白,FSHR阳性染色定位于细胞质,呈绿色荧光,细胞核呈红色荧光。显微镜下见FSHR绿色荧光即成功分离大鼠原代卵巢颗粒细胞^[12]。

1.4 SLC7A5过表达质粒的转化和扩增 载体质粒扩增:取1.5 mL EP管,加入30 mg·L⁻¹质粒2 μL,再加入50 μL菌株,混匀置于冰上30 min。后置于42℃环境中90 s,之后立即取出置于冰上2 min。加入1 mL LB液体培养基,37℃、200 r·min⁻¹震荡1~2 h。10 000 g离心5 min,弃上清,留约200 μL,吹打细菌,于超净台内涂板,37℃正置培养1 h后倒置过夜。次日,挑取单克隆菌落,放入5 mL液体培养基中摇菌,之后再转移至200 mL培养基中摇菌过夜。

质粒提取:按照无内毒素质粒提取试剂盒说明书进行操作。向吸附柱中加入2.5 mL平衡液,8 000 r·min⁻¹离心2 min,弃滤液。取200 mL菌液于无菌的离心管中,4℃、8 000 r·min⁻¹离心20 min,去上清。加入10 mL P1溶液,震荡离心。加入10 mL P2溶液,轻柔翻转6~8次,静置5 min。加入10 mL P4溶液,翻转6~8次,静置10 min后,4℃、

8 000 r·min⁻¹离心 15 min。倒入过滤器中。50 mL 离心管收集滤液, 加入 0.3 倍体积的异丙醇, 混匀后转移到平衡后的吸附柱中。4 °C、8 000 r·min⁻¹多次离心, 每次 2 min。加入 10 mL 漂洗液, 4 °C、8 000 r·min⁻¹离心 2 min, 弃滤液, 重复 1 次加入 3 mL 的无水乙醇, 4 °C、8 000 r·min⁻¹离心 2 min。弃滤液, 将吸附柱放回收集管中, 4 °C、8 000 r·min⁻¹离心 5 min。吸附柱开盖放置 5 min。将吸附柱置于新的收集管中, 加入 1 mL ddH₂O。室温放置 5 min, 4 °C、8 000 r·min⁻¹离心 5 min, 收集质粒, 检测质粒浓度和纯度, 适量分装, -20 °C 保存。

1.5 细胞转染和分组 实验分为对照组(转染空载体质粒)和 SLC7A5 过表达质粒组(OE-SLC7A5 组, 转染 SLC7A5 过表达质粒)。将颗粒细胞接种至适量完全培养基的 6 孔细胞培养板中, 使转染时的细胞密度为 50%~60%。每孔取 120 μL 的 opti-MEM 培养基, 加入 3 μg 质粒, 轻轻混匀; 向上述液体中加入每孔 6 μL FuGENE 转染试剂, 轻轻吹打混匀, 室温静置孵育 10 min; 再将上述混合液加入每孔含 1 874 μL 无抗生素培养基的 6 孔细胞培养板中, 轻轻混匀。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h。细胞转染 24~48 h 后, 采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法验证细胞转染效率。

1.6 流式细胞术检测 2 组卵巢颗粒细胞凋亡率

按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 处理后, PBS 缓冲液冲洗细胞, 加入胰酶, 观察细胞为单个细胞后终止消化。细胞悬液收集至离心管中, 1 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 缓冲液重悬细胞; 1 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清; 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液、5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染色液, 轻轻混匀; 室温避光孵育 15 min; 随后冰浴避光存放, 1 h 内放入流式细胞仪中检测细胞凋亡率。FITC (+) 和 PI (-) 为早期凋亡细胞; FITC (+) 和 PI (+) 为晚期凋亡细胞。细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 细胞总数 × 100%。

1.7 流式细胞术检测 2 组不同细胞周期卵巢颗粒细胞百分率

根据细胞周期检测试剂盒说明书进行操作。卵巢颗粒细胞接种于 6 孔细胞培养板中。处理后, PBS 缓冲液冲洗细胞, 放入适量的胰

酶, 观察细胞成单个细胞后终止消化, 细胞悬液收集到离心管中, 1 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 缓冲液重悬细胞, 重复 1 次; 加入预冷的 70% 乙醇溶液吹打混匀, 4 °C 放置 12~24 h; 1 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 缓冲液重悬细胞, 重复 1 次; 每管细胞中加入 0.5 mL PI 染色液, 重悬细胞, 37 °C 避光温浴 30 min。随后冰浴避光存放。24 h 内放入流式细胞仪中检测 2 组不同细胞周期卵巢颗粒细胞百分率。

1.8 RT-qPCR 法检测 2 组卵巢颗粒细胞中 SLC7A5、Caspase-3、Caspase-8 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) mRNA 表达水平

弃去原有培养液, 加入 TRIzol 裂解液, 吹打后静置 5 min; 细胞裂解液收集至 RNases Free EP 管中, 加入三氯甲烷充分振荡, 静置 2 min, 12 000 g 离心 3 min; 收集上层的溶液至新的 EP 管中, 加入等体积 96% 乙醇溶液, 混匀; 转移至核酸吸附柱中, 12 000 g 离心 1 min; 弃滤液, 加入 0.4 mL 3M 乙酸钠, 12 000 g 离心 1 min; 弃滤液, 加入 0.4 mL 75% 乙醇, 12 000 g 离心 1 min; 重复上步操作 1 次; 弃滤液, 12 000 g 离心 2 min; 弃滤液, 开盖室温干燥 2 min; 将核酸吸附柱放入新的 RNases Free EP 管中, 加入 30~50 μL DEPC 水, 静置 2 min; 12 000 g 离心 2 min。采用微量紫外分光光度仪检测 RNA 浓度和纯度。采用 5X All-In-One RT Master Mix 反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 并检测其浓度和完整性。RT-qPCR 反应体系: SYBR Mix 10 μL, 10 μmol·L⁻¹ 上游引物 0.5 μL, 10 μmol·L⁻¹ 下游引物 0.5 μL, RNase-Free H₂O 5 μL, cDNA 4 μL。置入荧光定量 PCR 仪中, 按步骤设置程序。引物序列: GAPDH F 5'-CAAG-TTCAACGGCACA-3', GAPDH R 5'-CAGTAG-ACTCCACGACAT-3'; SLC7A5 F 5'-CTCTGC-GTGCTACTACTC-3', SLC7A5 R 5'-TTGTCC-TATGTCCTTTCCC-3'; Caspase-3 F 5'-GCGAT-GACTCAGCACCTCCATG-3', Caspase-3 R 5'-GCGATGACTCAGCACCTCCATG-3'; Caspase-8 F 5'-ACTCGGCGACAGGTTACAGC-3', Caspase-8 R 5'-AGGGCAGCCAGTTCTTCGTT-3'; TNF-α F 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG-3', TNF-α R 5'-GGGCTACGGGCTTG TCACTC-3'。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因表达水平, 实验重复 3 次。

1.9 Western blotting法检测2组卵巢颗粒细胞中SLC7A5、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Caspase-8、cleaved Caspase-8和TNF- α 蛋白表达水平 去除原有细胞培养基,加入胰酶消化,收集至EP管中,2 000 r·min⁻¹离心5 min。弃上清,加入细胞裂解液,振荡混匀。4℃、静置5 min,取出振荡,重复3次。4℃、12 000 g离心15 min。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品95℃变性10 min。加入SDS-PAGE胶加样孔内。电泳时,60 V恒压电泳40 min后,120 V、1.5 h。采用半干转膜仪恒压转膜,放入5% BSA封闭液中,室温封闭60~120 min。分别采用抗TNF- α 抗体(1:1 000)、抗Caspase-3抗体(1:2 000)、抗cleaved Caspase-3抗体(1:500)、抗Caspase-8抗体(1:2 000)、抗cleaved Caspase-8(1:1 000)和抗GAPDH抗体(1:5 000)于4℃孵育过夜。TBST溶液洗涤8 min,重复4次。加入HRP标记的羊抗兔或羊抗鼠抗体(1:2 000)室温避光孵育60 min。TBST溶液洗涤8 min,重复4次。使用

Tanon化学发光检测仪进行蛋白检测。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH作为内参蛋白,计算目的蛋白表达水平,实验重复3次。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析 采用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析。2组卵巢颗粒细胞凋亡率、S期卵巢颗粒细胞百分率、卵巢颗粒细胞中细胞凋亡相关基因mRNA表达水平和凋亡相关蛋白表达水平均符合正态分布且方差齐,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代大鼠卵巢颗粒细胞中FSHR蛋白表达情况 荧光显微镜下观察,卵巢颗粒细胞镜下呈长梭形或者不规则形,特异性表达FSHR,NC组未见FSHR绿色荧光表达,FSHR组可见FSHR绿色荧光表达,提示大鼠原代卵巢颗粒细胞成功分离。见图1。

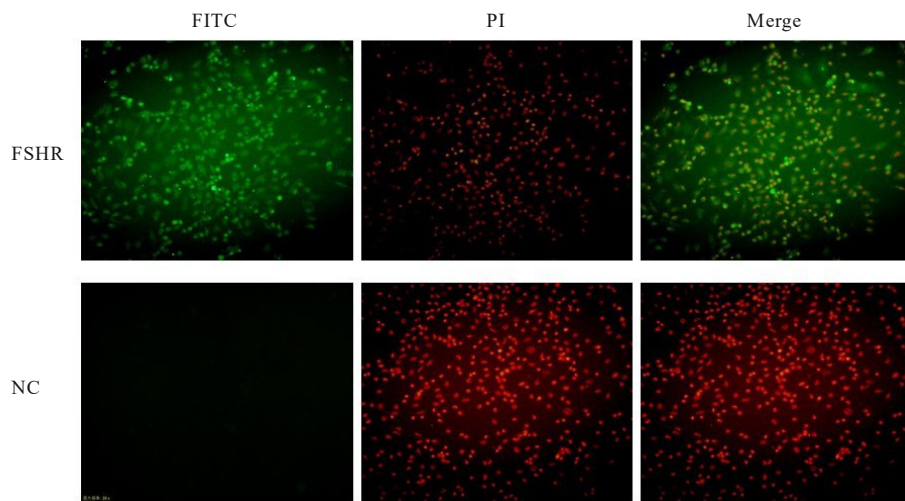


图1 大鼠原代卵巢颗粒细胞鉴定(免疫荧光,×40)

Fig. 1 Identification of primary ovarian granulosa cells of rats(Immunofluorescence, ×40)

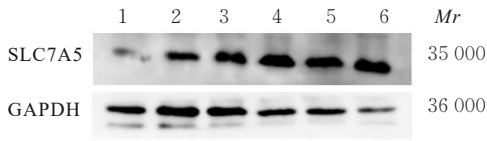
2.2 SLC7A5过表达质粒细胞转染效率验证 与对照组(1.00±0.26和0.51±0.24)比较,OE-SLC7A5组卵巢颗粒细胞中SLC7A5 mRNA和蛋白表达水平(361.81±176.30和2.16±1.26)均明显升高($P<0.05$),提示SLC7A5过表达质粒成功转染卵巢颗粒细胞。见图2。

2.3 2组卵巢颗粒细胞凋亡率 与对照组(16.59%±1.96%)比较,OE-SLC7A5组细胞凋

亡率(50.07%±6.66%)明显升高($P<0.05$)。见图3。

2.4 2组不同细胞周期卵巢颗粒细胞百分率 与对照组(11.94%±0.02%)比较,OE-SLC7A5组S期卵巢颗粒细胞百分率(10.17%±0.53%)明显降低($P<0.05$)。见图4。

2.5 2组卵巢颗粒细胞中凋亡相关基因mRNA表达水平 与对照组比较,OE-SLC7A5组卵巢



Lane 1-3: Control group; Lane 4-6: OE-SLC7A5 group.

图2 Western blotting法检测2组卵巢颗粒细胞中SLC7A5蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of SLC7A5 protein in plasmid cells in two groups detected by Western blotting method

颗粒细胞中凋亡相关基因 TNF- α 、Caspase-3 和 Caspase-8 mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。见表1。

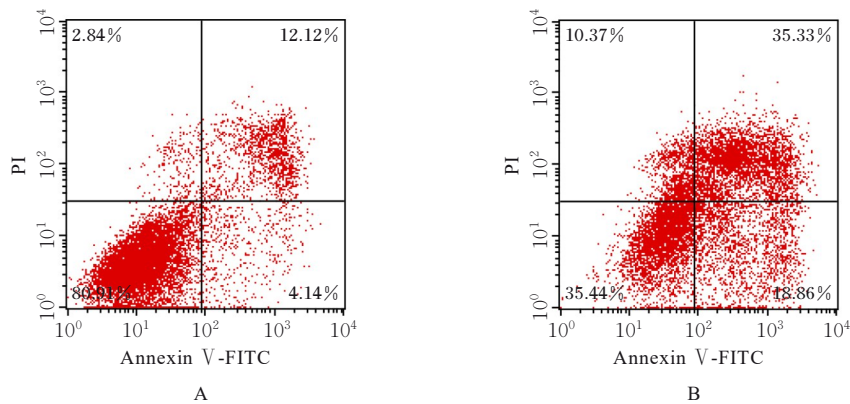
2.6 2组卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白表达水平与对照组比较, OE-SLC7A5组卵巢颗粒细胞中

凋亡相关蛋白 TNF- α 、Caspase-8、cleaved Caspase-8、Caspase-3、cleaved Caspase-3 和 SLC7A5 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。见图5和表2。

3 讨论

本课题组前期研究^[13]结果显示: 大鼠PCOS模型卵巢中SLC7A5表达明显增加, 提示SLC7A5可能在PCOS发生发展中具有重要作用, 然而SLC7A5在卵巢中的相关作用尚未完全阐明。因此, 本研究通过一系列体外实验探讨过表达SLC7A5对卵巢颗粒细胞凋亡的影响。

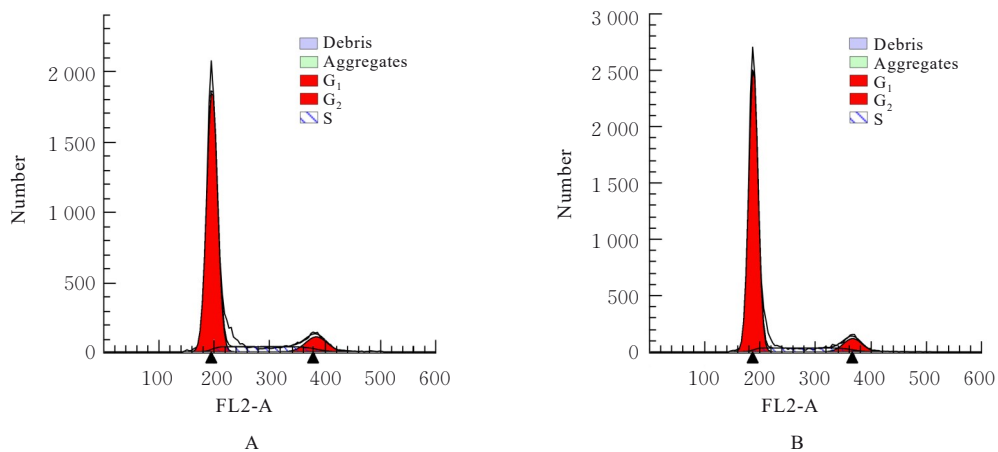
细胞凋亡不仅参与调节和选择人类原始卵泡池中的卵子, 也被认为是卵泡闭锁的机制和人卵巢中卵泡周期性生长及消退的基础^[14-15]。在卵泡发育的



A: Control group; B: OE-SLC7A5 group.

图3 流式细胞术检测2组卵巢颗粒细胞凋亡情况

Fig. 3 Apoptosis of granulosa cells in two groups detected by flow cytometry



A: Control group; B: OE-SLC7A5 group.

图4 流式细胞术检测2组卵巢颗粒细胞周期

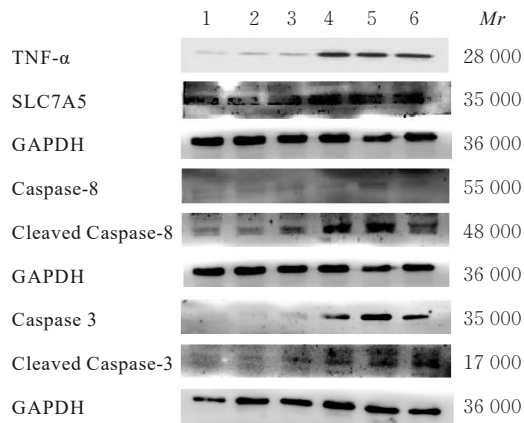
Fig. 4 Cell cycles of granulosa cells in two groups detected by flow cytometry

表1 RT-qPCR法检测2组卵巢颗粒细胞中凋亡相关基因mRNA表达水平

Tab. 1 Expression levels of apoptosis-related gene mRNA in granulosa cells in two groups detected by RT-qPCR method ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	TNF- α	Caspase-3	Caspase-8
Control	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.28
OE-SLC7A5	3.19 \pm 1.18*	2.17 \pm 0.26*	2.02 \pm 0.08*

* $P < 0.05$ compared with control group.



Lane 1-3: Control group; Lane 4-6: OE-SLC7A5 group.

图5 Western blotting法检测2组卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of apoptosis-related proteins in granulosa cells in two groups detected by Western blotting method

早期阶段, 闭锁是由卵母细胞和周围颗粒细胞凋亡共同引起的。而成熟卵泡的闭锁则以颗粒细胞凋亡为主^[16]。研究^[17-18]显示: 颗粒细胞的异常凋亡可

能是PCOS中卵泡异常发育的原因之一。因此, 本研究采用流式细胞术检测过表达SLC7A5对颗粒细胞凋亡及细胞周期的影响, 结果显示: 过表达SLC7A5能够促进颗粒细胞凋亡。因此, SLC7A5可能通过影响颗粒细胞的凋亡, 影响卵泡发育和成熟障碍, 进而促进PCOS的发生。

本研究结果显示: 过表达SLC7A5后, 颗粒细胞中凋亡相关基因TNF- α 、Caspase-3和Caspase-8 mRNA及蛋白表达水平均明显升高。研究^[19-20]显示: TNF- α 参与调节卵巢的多种生理过程, 对细胞增殖、分化、卵泡成熟、类固醇生成和细胞凋亡均有一定的影响。一般情况下, 细胞凋亡是通过死亡受体和线粒体2种介导方式实现的^[21]。研究^[22-23]发现: TNF- α 可以通过死亡受体途径促进细胞凋亡。当TNF- α 表达和生成增加时, TNF- α 受体与肿瘤坏死因子受体相关死亡域蛋白结合, 激活下游的Caspase-8, 触发一系列级联反应, 进而激活其下游的凋亡因子Caspase-3^[24-25]。激活的Caspase-3能够活化内源性核酸内切酶, 阻碍细胞DNA修复并启动受损的DNA降解, 诱导细胞凋亡^[26]。因此, 颗粒细胞过表达SLC7A5可能通过激活TNF- α /Caspase-8/Caspase-3凋亡通路促进颗粒细胞凋亡。本研究结果显示: cleaved Caspase-8和cleaved Caspase-3蛋白表达水平均明显升高, 进一步证实了SLC7A5通过激活Caspase-8和Caspase-3促进细胞凋亡。研究^[27-28]显示: Fas/Fas配体/Caspase-8通路在DHEA诱导的PCOS大鼠卵巢闭锁卵泡内的颗粒细胞凋亡中起关键作用。LIU等^[29]发现: PCOS患者颗粒细胞凋亡明显增加, 并伴有Caspase-3表达增加, 与本研究结果相似。

表2 2组卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白表达水平

Tab. 2 Expression levels of apoptosis-related proteins in granulosa cells in two groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	SLC7A5	TNF- α	Caspase-8	Cleaved Caspase-8	Caspase-3	Cleaved Caspase-3
Control	1.07 \pm 0.50	1.59 \pm 0.53	0.96 \pm 0.35	1.19 \pm 0.33	0.93 \pm 0.09	1.34 \pm 0.50
OE-SLC7A5	4.55 \pm 2.65*	12.40 \pm 1.00*	7.04 \pm 4.47*	2.20 \pm 0.54*	3.92 \pm 2.50*	2.79 \pm 0.50*

* $P < 0.05$ compared with control group.

综上所述, SLC7A5蛋白表达增加可能通过上调TNF- α 、Caspase-8和Caspase-3凋亡通路表达, 促进颗粒细胞的凋亡, 本研究结果为SLC7A5在PCOS中病理机制的探讨提供了新的理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张京顺参与实验操作和论文撰写, 邹颖刚参与数据整理和分析, 郑连文参与论文审阅和修改。

[参考文献]

- [1] KANAI Y, SEGAWA H, et al. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98)[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(37): 23629-23632.
- [2] SUN Y M, WEN J J, XU T, et al. Reduction of peritoneal cavity B1a cells in adult SLC7A5 knockdown mice via dysregulating the mTOR pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 109939.
- [3] PRASAD P D, WANG H, HUANG W, et al. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 255(2): 283-288.
- [4] KANAI Y. Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107964.
- [5] ZHU Q N, WANG J, SHI Y N, et al. Bioinformatics prediction and *in vivo* verification identify SLC7A5 as immune infiltration related biomarker in breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 14: 2545-2559.
- [6] SEKINE M, KOH I, NAKAMOTO K, et al. Selective inhibition of L-type amino acid transporter 1 suppresses cell proliferation in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(6): 2509-2517.
- [7] SIDORKIEWICZ I, JÓŹWIK M, BUCZYŃSKA A, et al. Identification and subsequent validation of transcriptomic signature associated with metabolic status in endometrial cancer[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 13763.
- [8] ZHANG J S, XU Y, LI D D, et al. Review of the correlation of LAT1 with diseases: mechanism and treatment[J]. *Front Chem*, 2020, 8: 564809.
- [9] 张京顺. SLC7A5在大鼠多囊卵巢综合征模型卵巢上的表达及其功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [10] 肖晓青, 邱思花, 谢芳, 等. 多模态子宫输卵管超声造影评估输卵管堵塞性病变的诊断价值[J]. *中国医学物理学杂志*, 2023, 40(10): 1246-1250.
- [11] 许川, 舒为群, 张亮, 等. 大鼠卵巢颗粒细胞的原代培养与鉴定[J]. *癌变·畸变·突变*, 2009, 21(3): 234-237.
- [12] 李婉玉, 郑喜. 血清及卵泡液AMH水平检测在辅助生殖领域中的应用研究进展[J]. *延边大学医学学报*, 2023, 46(4): 347-350.
- [13] 付璐璐. 多囊卵巢综合征动物模型卵巢中的mRNA/lncRNA表达谱及相关功能的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [14] STRINGER J M, ALES I L R, WINSHIP A L, et al. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life[J]. *Hum Reprod Update*, 2023, 29(4): 434-456.
- [15] CACCIOTTOLA L, CAMBONI A, CERNOGORAZ A, et al. Role of apoptosis and autophagy in ovarian follicle pool decline in children and women diagnosed with benign or malignant extra-ovarian conditions [J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(1): 75-88.
- [16] KASHI O, MEIROW D. Overactivation or apoptosis: which mechanisms affect chemotherapy-induced ovarian reserve depletion?[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16291.
- [17] GONG Y, LUO S, FAN P, et al. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 121.
- [18] JIANG X L, TAI H, XIAO X S, et al. Cangfudaotan decoction inhibits mitochondria-dependent apoptosis of granulosa cells in rats with polycystic ovarian syndrome [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 962154.
- [19] LLIBEROS C, LIEW S H, ZAREIE P, et al. Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 278.
- [20] YE H Y, SONG Y L, YE W T, et al. Serum granulosa cell-derived TNF- α promotes inflammation and apoptosis of renal tubular cells and PCOS-related kidney injury through NF- κ B signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2432-2444.
- [21] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-592.
- [22] SPERANSKII A I, KOSTYUK S V, KALASHNIKOVA E A, et al. Enrichment of extracellular DNA from the cultivation medium of human peripheral blood mononuclears with genomic CpG rich fragments results in increased cell production of IL-6 and TNF- α via activation of the NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Khim*, 2016, 62(3): 331-340.
- [23] 贺鹏翼, 董宁, 吴瑶, 等. 脓毒症小鼠脾脏树突状细胞焦亡及其对炎症反应和免疫功能的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(5): 537-544.
- [24] ZHAO X Q, LIN Y, JIANG B J, et al. Icaritin inhibits lung cancer-induced osteoclastogenesis by suppressing the expression of IL-6 and TNF- α and through AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2020, 31(10): 1004-1011.
- [25] JUNG H, LEAL-EKMAN J S, LU Q H, et al. Atg14 protects the intestinal epithelium from TNF-triggered

- villus atrophy[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1990-2001.
- [26] MAZUMDER S, PLESCA D, ALMASAN A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 13-21.
- [27] 肖丽君, 甘苡榕, 刘春丽, 等. 大黄灵仙方对胆固醇结石豚鼠模型胆囊Cajal间质细胞中scf/c-kit信号通路的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(2): 376-382.
- [28] HONNMA H, ENDO T, HENMI H, et al. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9): 1525-1533.
- [29] LIU Y, ZHAI J J, CHEN J, et al. PGC-1 α protects against oxidized low-density lipoprotein and luteinizing hormone-induced granulosa cells injury through ROS-p38 pathway[J]. *Hum Cell*, 2019, 32(3): 285-296.