



干扰 KISS1 基因对猪卵巢颗粒细胞功能的影响

陆思羽¹, 何颖婷¹, 周小枫¹, 辛晓萍¹, 张爱玲², 袁晓龙¹, 张哲¹, 李加琪¹

(¹广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室/国家生猪种业工程技术研究中心/华南农业大学动物科学学院, 广州 510642;

²广东高校应用生态工程技术开发中心/广东第二师范学院生物与食品工程学院, 广州 510310)

摘要: 【背景】卵泡是卵巢的基本结构和功能单位,其主要功能是排卵和分泌激素。颗粒细胞能促进卵泡发育,其过度凋亡能抑制卵泡发育,诱导卵泡闭锁,进而降低雌性动物发情频率,影响雌性动物繁殖力。现已有研究发现, *KISS1* 在卵巢组织中发挥着重要作用。【目的】研究通过干扰 *KISS1*,以阐释 *KISS1* 对猪卵巢颗粒细胞凋亡、周期及分泌雌激素能力的影响,为完善 *KISS1* 在猪颗粒细胞中的分子调控机制提供一定的依据。【方法】设计 *KISS1* 的干扰片段 *KISS1*-siRNA,转染体外培养的母猪卵巢颗粒细胞,通过实时定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 检测干扰 *KISS1* 对母猪卵巢颗粒细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 信号通路部分基因转录水平的影响;采用流式检测法、Annexin V-FITC 及 ELISA 技术,分别探究干扰 *KISS1* 对颗粒细胞周期、凋亡及雌二醇 (estradiol, E₂) 分泌量的影响,最后使用 qRT-PCR 技术检测 *KISS1* 对雌激素受体及雌激素信号通路关键基因转录水平的影响。【结果】在猪颗粒细胞内,干扰 *KISS1* 后,PI3K 通路激活相关基因 *PIK3CG*、*PI3KI*、*PDK1* 及 *AKT1* 转录水平下降,其中关键基因 *AKT1* 的转录水平显著降低 ($P < 0.05$),PI3K 通路激活抑制相关基因 *FOXO3*、*TSC2* 及 *BAD* 转录水平也有所降低;干扰 *KISS1* 后,颗粒细胞周期在细胞分裂间期 (G₀/G₁) 阻断,细胞的凋亡率显著上升,细胞中 E₂ 的浓度显著降低 ($P < 0.01$),雌激素受体 *ESR1* 和 *ESR2* 及雌激素通路的基因 *Star*、*CYP17*、*3B-HSD*、*17B-HSD* 和 *CYP19A* 转录水平也相应显著下降 ($P < 0.05$)。【结论】*KISS1* 能够参与猪颗粒细胞 PI3K 和雌激素通路,干扰 *KISS1* 能够使卵巢颗粒细胞阻滞在细胞分裂间期,促进颗粒细胞凋亡,降低颗粒细胞分泌雌激素的能力,表明 *KISS1* 对于卵巢颗粒细胞的分裂与生长、雌激素分泌具有重要作用。

关键词: 母猪; 颗粒细胞; *KISS1*; PI3K; E₂

Effect of *KISS1* Interference on the Function of Porcine Granulosa Cells in Porcine Ovary

LU SiYu¹, HE YingTing¹, ZHOU XiaoFeng¹, XIN XiaoPing¹, ZHANG AiLing²,
YUAN XiaoLong¹, ZHANG Zhe¹, LI JiaQi¹

(¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;

²Guangdong Development Center of Applied Ecology and Ecological Engineering in Universities/Biology and Food Engineering Institute, Guangdong University of Education, Guangzhou 510310)

Abstract: 【Background】 As the basic structural and functional unit of ovary, the main functions of follicles are ovulation and

收稿日期: 2019-11-28; 接受日期: 2020-10-29

基金项目: 国家生猪现代农业产业技术体系 (CARS-35)、国家自然科学基金青年项目 (31902131)、广东省自然科学基金面上项目 (2019A1515010676)、广东省扬帆计划 (2014YT02H042)、广东省普通高校青年创新人才项目 (2018KQNCX019)、广州市科技计划项目 (201707010001)

联系方式: 陆思羽, E-mail: siyu_lu19@163.com. 通信作者李加琪, E-mail: jqli@scau.edu.cn

hormone secretion. Granulosa cells proliferation can promote the development of follicles, while the excessive apoptosis of granulosa cells will inhibit the development of follicles, induce follicular atresia, reduce the estrus frequency and affect the reproductive capacity of female animals. Recent studies have found that the *KISS1* plays an important role in ovary. 【Objective】 This study was aimed to explore the effects of *KISS1* on apoptosis, cell cycle and estrogen secretion of porcine granulosa cells, through interfering the expression of *KISS1*, so as to provide some useful information in molecular regulation mechanism of *KISS1* on porcine granulosa cells. 【Method】 To investigate the effect of knockdown *KISS1* on the transcription of key genes on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway in porcine granulosa cells, *KISS1*-siRNA were designed and transfected to porcine granulosa cells *in vitro*, and then quantitative real time PCR (qRT-PCR) was applied to detect the transcription of *KISS1*. Then, flow cytometry, Annexin V-FITC, and ELISA were utilized to explore the effects of *KISS1*-siRNA on granulosa cell cycle, apoptosis, and secretion of E_2 , respectively. Finally, qRT-PCR was applied to explore the effects of *KISS1*-siRNA on estrogen receptor and estrogen signaling pathway. 【Result】 In porcine granulosa cells, interfering *KISS1* gene could significantly decrease the transcription of *AKT1* ($P < 0.05$), while *PIK3CG*, *PI3CI* and *PDK1* decreased with no significant difference ($P > 0.05$). The mRNA levels of the genes, involving in activation of PI3K signaling pathway like *FOXO3*, *TSC2*, and *BAD*, were also decreased with no significant difference ($P > 0.05$). Transfecting *KISS1*-siRNA to porcine granulosa cells could significantly promote cell apoptosis ($P < 0.01$), arrest cell cycle at G0/G1 phase ($P < 0.01$), and decrease the E_2 secretion ($P < 0.01$). After knockdown *KISS1*, the transcription of estrogen receptor *ESR1* and *ESR2*, as well as *Star*, *CYP17*, *3B-HSD*, *17B-HSD* and *CYP19A* of estrogen pathway were also decreased significantly ($P < 0.05$). 【Conclusion】 This study confirmed that *KISS1* gene could participate in PI3K and estrogen signaling pathways. Interfering *KISS1* could promote porcine granulosa cells apoptosis, arrest cell cycle at G0/G1 phase ($P < 0.01$), and decrease the E_2 secretion. It suggested that *KISS1* played an important role in the division, growth and estrogen secretion of porcine granulosa cells.

Key words: sows; granulosa cells; *KISS1*; PI3K; E_2

0 引言

【研究意义】卵巢是母畜繁育的基础,其主要功能是产生和排出成熟的卵子。卵巢卵泡中的颗粒细胞能够分泌性激素,促进母畜性征的发育及维持,卵巢能否健康发育关系着母畜繁殖能力的强弱及利用年限的长短^[1]。卵泡生长发育的本质是颗粒细胞增殖和分化^[2],卵泡闭锁的主要标志是颗粒细胞凋亡,颗粒细胞能够为卵巢和卵泡的生长发育提供促性腺激素受体、类固醇激素、细胞因子、生长因子等物质^[3],颗粒细胞过度凋亡会导致雌激素分泌减少,孕激素分泌增加^[4]等。综上所述,颗粒细胞作为卵泡的重要组成部分,其功能会直接影响卵泡的生长发育,进而影响雌性动物的繁殖能力。本研究将颗粒细胞作为探究卵泡体外发育的细胞模型,通过设计 *KISS1* 的干扰片段,基于实时定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 试验证明干扰 *KISS1* 能够影响 PI3K/AKT 通路的信号传导,并进一步在细胞水平和分子水平探究了干扰 *KISS1* 对猪卵巢颗粒细胞凋亡、周期及雌激素分泌能力的影响,为完善 *KISS1* 调控颗粒细胞功能的机制研究提供了一定的理论基础。【前人研究进展】1997 年 Lee 通过原位杂交和差异显示技术首次发现并命名了 *KISS1*,该基因位于人类 1 号染色体 1q32-41 区,能

够抑制肿瘤生长^[5],因此可作为区分转移性黑色素瘤和非转移性黑色素瘤的标志物^[6]。近年来有研究表明,*KISS1* 基因在母畜发情、卵泡生长发育、排卵等生理过程中起着重要的作用^[7]。对成年大鼠使用 Kisspeptin 治疗后,*KISS1* 的表达量与大鼠的排卵数成正相关^[8-9],而突变 *KISS1*,会导致大鼠和小鼠的卵巢功能衰退,卵泡发育异常,进而阻碍卵泡成熟,影响小鼠卵巢黄体组织的形成^[9-10]。此外,当小鼠到达初情期时,*KISS1* 和 *GPR54* 在下丘脑-垂体-性腺轴中的表达量显著增高,表明 *KISS1*/*GPR54* 信号可由性腺轴传导,在哺乳动物中枢和神经内分泌系统中发挥作用^[8]。这些研究结果表明,*KISS1* 在一定程度上影响着母畜的繁殖性能。前期研究已经证实过表达 *KISS1* 能够促进卵巢卵泡的发育和排卵^[8],且 *KISS1* 在卵泡生长发育的过程中起到重要性作用^[7],但目前干扰 *KISS1* 在猪卵泡颗粒细胞中的作用尚不清楚。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 可以磷酸化磷脂酰肌醇^[11],其作为细胞中典型的信号转导通路^[12-13],参与调节细胞的生长、分化、增殖和凋亡。PI3K/AKT 是调控原始卵泡激活和发育的经典信号通路,*PTEN* 是 PI3K/AKT 通路的终止信号,在初级和次级卵泡中敲除卵母细胞的该基因,PI3K/AKT 信号通路仍能够正常激活^[14],敲除成年小鼠卵母细胞中的 *PTEN*,小

鼠的原始卵泡在卵泡池就会发生早衰,且FSH和LH分泌异常,使小鼠丧失生育能力^[15],但是敲除颗粒细胞中的 *PTEN*,能够减缓颗粒细胞凋亡^[16],并促进颗粒细胞增殖。此外蔡竞等证实 *P-AKT*、*p-mTOR*、*p-p70S6* 等表达水平下调能够抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活性,抑制颗粒细胞增殖,进而影响卵泡发育^[17],综上可知卵巢卵泡的发育与 PI3K/AKT 通路活性相关。【本研究切入点】PI3K 信号通路与卵巢卵泡的生长发育密切相关,笔者前期研究表明过表达 *KISS1* 能够显著降低猪卵巢颗粒细胞的凋亡率,促进颗粒细胞分泌雌二醇 (estradiol, E_2),显著上调 PI3K 信号通路关键基因及雌激素受体 *ESR1* 和 *ESR2* 的 mRNA 水平^[18],基于干扰猪卵巢颗粒细胞中 *KISS1* 基因的表达,能够影响 PI3K 信号通路部分标志基因的表达,我们推测干扰 *KISS1* 同样也能够影响颗粒细胞功能,因此本研究拟通过干扰 *KISS1*,进一步阐释 *KISS1* 对猪卵巢颗粒细胞功能的影响机制。【拟解决的关键问题】本研究以长大二元杂母猪卵巢卵泡颗粒细胞为试验材料,在转录水平证实干扰 *KISS1* 能够影响 PI3K 信号通路相关基因的表达,并拟在细胞和分子水平研究干扰 *KISS1* 对颗粒细胞凋亡、周期及 E_2 分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

母猪卵巢颗粒细胞:采集广州市嘉禾望岗屠宰场的长大二元杂母猪卵巢,迅速置于 4℃ 含 2% 双抗 (青霉素和链霉素) 的 PBS 中,尽快返回实验室,并迅速分离卵巢颗粒细胞。

主要试剂:DMEM 基础培养基、含 EDTA 的胰酶稀释液、PBS 缓冲液、胎牛血清、青霉素和链霉素购自 Hyclone (美国); Lipofectamine® 3000 转染试剂盒、Opti-MEM® 试剂购自 Invitrogen (美国); *KISS1* 的干扰片段 *KISS1*-siRNA (CAACAAGAAGTGGGAGCAGAA) 及对照 Scrambled-siRNA 由广州锐博生物科技有限公司 (中国) 合成; Trizol、PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒购自 TAKARA (日本); 无水乙醇、4% 甲醛、氯仿、异丙醇购自广州鼎国生物有限公司 (中国); SYBR Green qPCR Mix 购自 Thermo (美国); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司 (中国); 猪雌二醇试剂盒购自江苏酶免实业有限公司 (中国); 其他均为常规化学试剂。

1.2 原代颗粒细胞的分离与培养

从屠宰场采集的母猪卵巢,迅速置于 4℃ 含 2% 双抗 (青霉素和链霉素) 的 PBS 试剂中,迅速带回实验室,在准备室用 PBS 清洗数次。在细胞房超净台取 5 mL DMEM 于 15 mL 离心管,使用镊子夹取母猪卵巢,用 1 mL 注射器小心多次吸取卵泡液共 2 mL 于 15 mL 离心管 (卵泡直径为 3—5 mm); 25℃ 800 r/min 离心 5 min,弃上清,再加入预热的 PBS (含 1% 双抗),轻柔吹打以重悬沉淀细胞,清洗沉淀细胞两次。先加入 10 mL 完全培养基 (含 10% 小牛血清和 1% 双抗) 于 75 cm² 细胞培养瓶,再加入 5 mL 细胞悬液,轻柔摇晃均匀。将培养瓶置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱,48 h 后观察颗粒细胞的生长状况,用 PBS 清洗颗粒细胞两次,加入 15 mL 的完全培养基,再培养 24 h 可进行后续相关试验。

1.3 颗粒细胞的接种和转染

铺板:观察细胞状态,当细胞汇合度达到 80% 左右,用预热的 PBS (含 1% 双抗) 清洗颗粒细胞两次;使用 5 mL 0.25% 的胰蛋白酶消化 75 cm² 培养瓶中的细胞 3—5 min,快速加入 5 mL 不完全培养基 (含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液) 终止消化,25℃ 800 r/min 离心 5 min;用预热的 PBS (含 1% 双抗) 清洗细胞两次。将细胞悬液均匀加入细胞培养孔中,用完全培养基补充体积,轻柔地摇晃均匀,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养。

转染:铺板后细胞的汇合度达到 80% 左右,即可转染。用预热的 PBS 清洗颗粒细胞两次,转染方法参照 Lipofectamine® 3000 试剂盒说明书 (每个试验组设计 4 个重复,使用 24 孔细胞培养板进行),步骤如下:在灭菌的 1.5 mL 离心管中加 100 μL Opti-MEM 和 4 μL Lipofectamine® 3000 试剂,离心混匀;在新的离心管中依次加入 95 μL Opti-MEM、5 μL 稀释好的 Scrambled-siRNA 和 *KISS1*-siRNA (此时干扰片段及其对照终浓度为 50 nmol·L⁻¹) 及 4 μL P3000™,离心混匀;将 Lipofectamine® 3000 混合液加到 P3000™ 混合液中,离心混匀,在室温下孵育 10 min;在每孔细胞中加入 450 μL 不完全培养基及 50 μL 混合液;转染后将细胞培养板置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养,6—12 h 后换液 (防止转染试剂对细胞影响过大)。

1.4 颗粒细胞 RNA 抽提

从细胞中抽提 RNA,不需要对细胞进行消化,直接加入 Trizol (10 cm²·mL⁻¹) 在冰上放置 10—15 min,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,将含 RNA 的上清转移

至新的 RNase-free 管，加入氯仿（氯仿：Trizol 为 1：5），激烈震荡，室温下放置 5 min，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，将上层水相小心移至新的 RNase-free 管，加入异丙醇（异丙醇：Trizol 为 1：2），轻微颠倒混匀，室温下放置 10 min，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，去上清。加入与 Trizol 等量的 75%乙醇，清洗抽提的 RNA，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，去上清，此步骤重复两次。将 RNA 于室温干燥 5—10 min，加入 30 μL 的 DEPC 水溶解 RNA 沉淀。

RNA 质检：制备浓度为 1%的琼脂糖凝胶，将 2 μL RNA 样品与 2 μL Loading Buffer 混匀，15 V/cm 电压

电泳 20 min，使用凝胶成像仪拍照，观察条带，使用紫外分光光度计检测样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值；-80℃ 保存备用。

1.5 检测关键基因的转录水平

RNA 反转录参照 TAKARA 的 PrimerScript™ RT Reagent Kit 说明书。RNA 反转录反应体系（10 μL）：5×PrimeScriptRT Master Mix，2 μL；Total RNA≤500 ng；补充 RNase Free dH₂O 至总体积达 10 μL。RNA 反转录反应条件：37℃ 15 min，85℃ 5 s。

参照 NCBI 公布的序列信息，使用 Primer primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物（表 1）。以母猪卵巢颗粒细

表 1 定量引物
Table 1 Quantitative primer

引物名称 Primer name	Gene ID	引物序列 Primer sequence	产物大小 Size (bp)
qRT-KISS1	100145896	F: AACCAGCATCTTCTCACCAGG R: CTTTCTCTCCGCACAACGC	192
qRT-PIK3CG	396979	F: AACGGGCTTTGAGATAGTGAA R: AAGTTGCTTGTTGGTGGATA	184
qRT-PIK3C1	5290	F: CAAGTGAGAAATGGTCCGAATG R: GTGGAAGAGTTTGCCTGTTTT	152
qRT-PDK1	100286871	F: AAATCACCAGGACAGCCAATA R: CTTCTCGGTCACTCATCTTCAC	190
qRT-AKT1	100126861	F: CTGCACAAACGAGGCGAGT R: CGCTCCTTGTAGCCGATGAA	89
qRT-FOXO3	733621	F: ACAAACGGCTCACTCTGTCCCA R: GAACTGTTGCTGTGCCCCTTATC	85
qRT-TSC2	100505408	F: CGAGGTGGTGTCTACGAGAT R: GAGCAGGCGTTCAATGATGTT	115
qRT-BAD	100521065	F: AGTCGCCACTGCTCTTACCC R: TCTTGAAGGAACCCTGGAAATC	172
qRT-ESR1	10013276	F: GATGCCTTGGTCTGGGTGAT R: AGTGTTCCGTGCCCTTGTTA	124
qRT-ESR2	396697	F: AAGGGAAAAGGAGGATGGGACA R: CAGATAGGGACTGCGTGGAGGT	202
qRT-Star	396597	F: GGAAAAGACACAGTCATCACCCAT R: CAGCAAGCACACACACGGAAC	121
qRT-CYP17	100157047	F: AAGCCAAGACGAACGCAGAAAG R: TAGATGGGGCACGATTGAAACC	228
qRT-3BHSD	445539	F: GGGGCTTCTGTCTTGATTCCA R: GGTTTTCAGTGCTTCCTTGTGC	284
qRT-17BHSD	397574	F: CCCAACGCAGGAGACTCAAAAT R: CCAGAGCCCATAACGAAGACAGA	149
qRT-CYP19A	403332	F: GCTGGACACCTCTAACAACCTCTT R: TTGCCATTATCAAAATAACCCCT	91

胞的 cDNA 为模板, GAPDH 为内参。qPCR 反应体系 (20 μL): 2 \times SYBR Green PCR Master Mix, 10 μL ; PCR Forward Primer, 0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; PCR Reverse Primer, 0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; cDNA, 2 μL ; 补充 dd H₂O 至总体积达 20 μL 。qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 42 个循环。引物由上海捷瑞生物科技有限公司合成。

1.6 颗粒细胞凋亡检测

参照江苏凯基生物技术股份有限公司的 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进行颗粒细胞凋亡检测。取细胞接种于 6 孔板, 当细胞汇合度达到 80% 左右, 转染 Scrambled-siRNA 和 KISS1-siRNA 于颗粒细胞培养 24 h, PBS 清洗细胞, 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 再次用 PBS 溶液清洗细胞。取 0.5 mL 细胞悬液 (约 5×10^5 个细胞), 加入 500 μL 1 \times Binding Buffer, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 再加入室温预热的 5 μL Propidium Iodide, 室温避光孵育 5 min, 立即用流式细胞仪检测分析 (每个试验组设计 3 个重复)。

1.7 颗粒细胞周期检测

使用江苏凯基生物技术股份有限公司的流式检测细胞周期试剂盒, 取细胞接种于 6 孔细胞板, 当细胞汇合度达到 80% 左右, 转染 Scrambled-siRNA 和 KISS1-siRNA 于颗粒细胞培养 24 h, PBS 清洗细胞, 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 再次用 PBS 溶液清洗细胞。使用 70% 的乙醇溶液固定细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 4 h 以上, 将固定好的颗粒细胞用预冷的 PBS 洗两次, 室温 2 000 r/min 离心 5 min, 用 400 μL 的碘化丙啶轻柔重悬细胞, 加入 100 μL RNase, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。24 h 内用流式细胞仪检测分析 (每个试验组设计 3 个重复)。

1.8 颗粒细胞上清中 E₂ 含量检测

使用 ELISA 检测细胞上清中 E₂ 的含量, 参照江苏酶免实业有限公司的猪雌二醇 ELISA 试剂盒说明书。确定标准品孔和样本孔, 在标准品孔中加不同浓度的标准品 50 μL ; 取细胞接种于 6 孔板, 当细胞汇合度达到 80% 左右, 转染 Scrambled-siRNA 和 KISS1-siRNA 于颗粒细胞培养 24 h, 吸取细胞上清 1 000 r/min 离心 20 min, 取 50 μL 于 96 孔板即为样本孔, 空白孔不加; 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 弃去液体, 在吸水纸上拍干, 每孔加入 350 μL 的洗涤液, 静置 1 min, 弃去液体, 在吸水纸上拍干, 该步骤重复 5 次; 每孔加入 100 μL 的辣根过氧化物酶标记

的检测抗体 (除空白孔), 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 弃去液体, 在吸水纸上拍干; 每孔加入 350 μL 的洗涤液, 室温静置 1 min, 弃去液体, 在吸水纸上拍干, 该步骤重复 5 次; 每孔加入各 50 μL A 和 B 底物, 用锡箔纸包裹以避光, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min; 每孔加入 50 μL 的终止液, 在 15 min 内用酶标仪 A450 测定 OD 值。

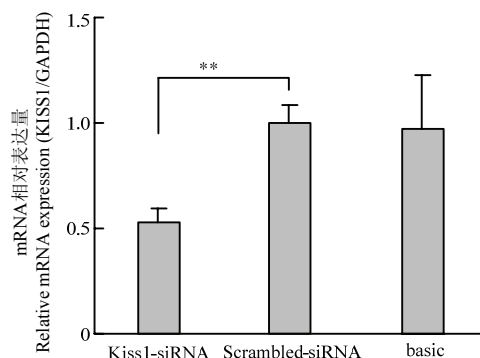
1.9 数据的统计分析

每个试验 3—4 个生物学重复, 数据均用平均值 \pm 标准差表示, 并经双尾 T-test 检验差异是否具有统计学意义。**代表 $P<0.01$, *代表 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 干扰猪 *KISS1* 的效果

转染 Scrambled-siRNA 和 KISS1-siRNA (序列: CAACAAGAAGTGGGAGCAGAA) 至颗粒细胞后的 qRT-PCR 结果如图 1, KISS1-siRNA 组的 *KISS1* 的表达水平显著低于 Scrambled-siRNA 对照组 ($P<0.01$), 结果表明干扰片段 KISS1-siRNA 具有良好的干扰效果, 可以用于后续试验。



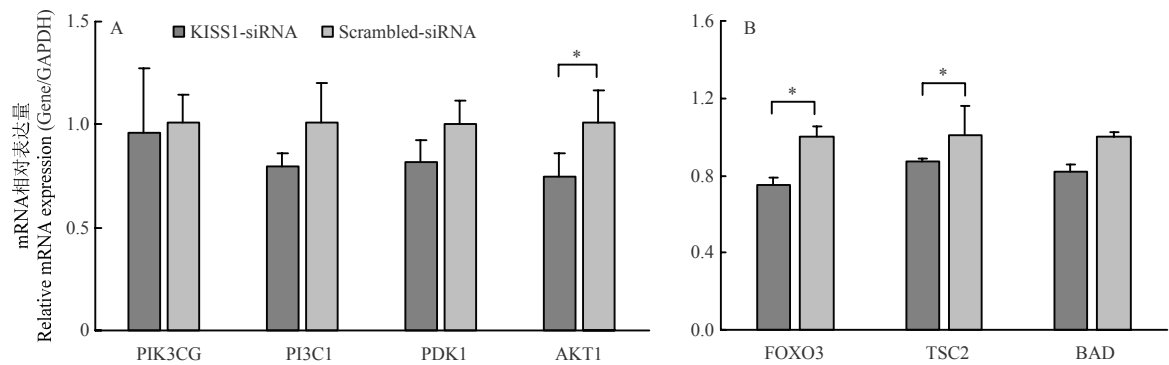
* $P<0.05$, ** $P<0.01$. 下同 The same as below

图 1 颗粒细胞 *KISS1* 的干扰效果

Fig. 1 Interference effect of porcine *KISS1* in granulosa cells

2.2 干扰 *KISS1* 抑制 PI3K 信号通路

干扰 *KISS1* 后, 激活 PI3K 信号通路的 *AKT1* 转录水平显著降低 ($P<0.05$), *PIK3CG*、*PI3CI*、*PDK1* 转录水平降低, 但差异不显著 (图 2-A); 抑制 PI3K 通路的 *FOXO3* 和 *BAD* 转录水平显著降低 ($P<0.05$), *TSC2* 的 mRNA 表达水平降低, 但差异不显著 (图 2-B)。结果表明, 干扰 *KISS* 能够抑制 PI3K 信号通路部分标志基因的表达。



A. PI3K 信号通路激活相关基因的表达；B. PI3K 信号通路抑制相关基因的表达
A. PI3K signaling pathway activates expression of related genes. B. PI3K signaling pathway inhibits the expression of related genes

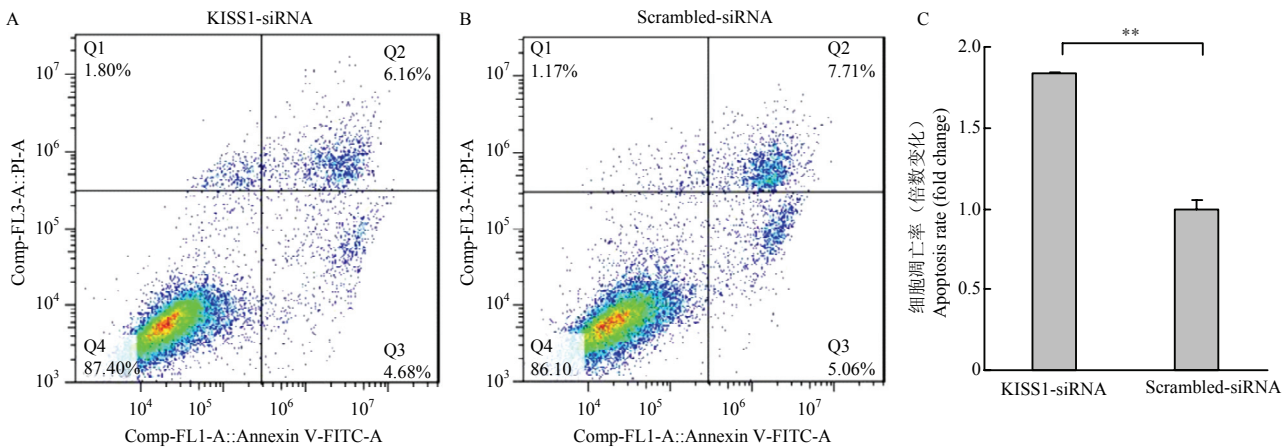
图 2 干扰 *KISS1* 抑制 PI3K 信号通路

Fig. 2 Interfering *KISS1* inhibits PI3K signaling pathway

2.3 干扰 *KISS1* 的表达促进颗粒细胞的凋亡

颗粒细胞 Annexin FITC/PI 检测结果如图 3，其中 Q1 区域为机械损伤细胞，Q2 (FITC+/PI+) 区域为晚期凋亡或坏死细胞，Q3 (FITC+/PI-) 区域为早期凋亡

细胞，Q4 (FITC-/PI-) 区域为活细胞 (图 3-A 和 B)。KISS1-siRNA 组颗粒细胞的凋亡率显著高于 Scrambled-siRNA 对照组 ($P<0.01$) (图 3-C)，结果表明，干扰 *KISS1* 促进颗粒细胞凋亡。



A. 转染 KISS1-siRNA 的流式检测结果；B. 转染 Scrambled-siRNA 的流式检测结果；C. 干扰 *KISS1* 促进颗粒细胞凋亡
A. Flow cytometry of KISS1-siRNA transfection. B. Flow cytometry of Scrambled-siRNA transfection. C. Interfering *KISS1* promotes granulosa cell apoptosis

图 3 干扰 *KISS1* 促进颗粒细胞凋亡

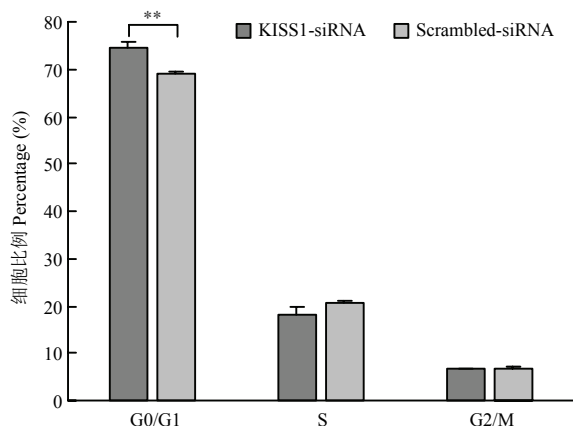
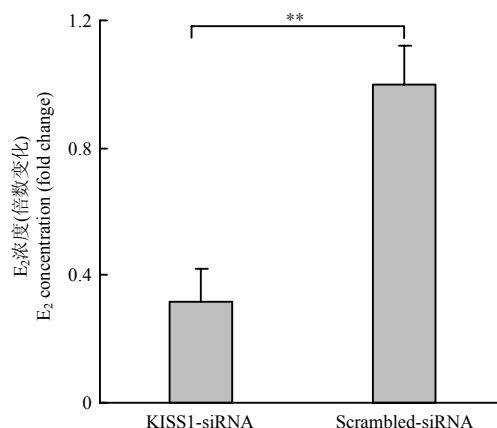
Fig. 3 Interfering *KISS1* promotes granulosa cell apoptosis

2.4 干扰 *KISS1* 的表达影响颗粒细胞的细胞周期

为探究 *KISS1* 对颗粒细胞周期的影响，流式检测结果如图 4，单因素方差分析证实 KISS1-siRNA 组处于 G1/G0 期的颗粒细胞比例显著高于 Scrambled-siRNA 对照组的颗粒细胞 ($P<0.01$)，即干扰 *KISS1* 后，颗粒细胞阻滞在分裂间期。

2.5 干扰 *KISS1* 的表达抑制颗粒细胞分泌 E_2

颗粒细胞的主要功能之一是分泌 E_2 ，为研究 *KISS1* 对颗粒细胞分泌 E_2 能力的影响，ELISA 法检测结果如图 5，KISS1-siRNA 组细胞上清中 E_2 的浓度显著低于 Scrambled-siRNA 对照组 ($P<0.01$)，即干扰 *KISS1* 的表达，可以抑制颗粒细胞分泌 E_2 。

图 4 干扰 *KISS1* 能够将颗粒细胞阻滞在分裂间期Fig. 4 Interfering *KISS1* arrests granulosa cells in interphase图 5 干扰 *KISS1* 抑制颗粒细胞分泌 E_2 Fig. 5 Interfering *KISS1* inhibits granulosa cell secretion of E_2

2.6 干扰 *KISS1* 的表达能影响雌激素信号通路相关基因的表达

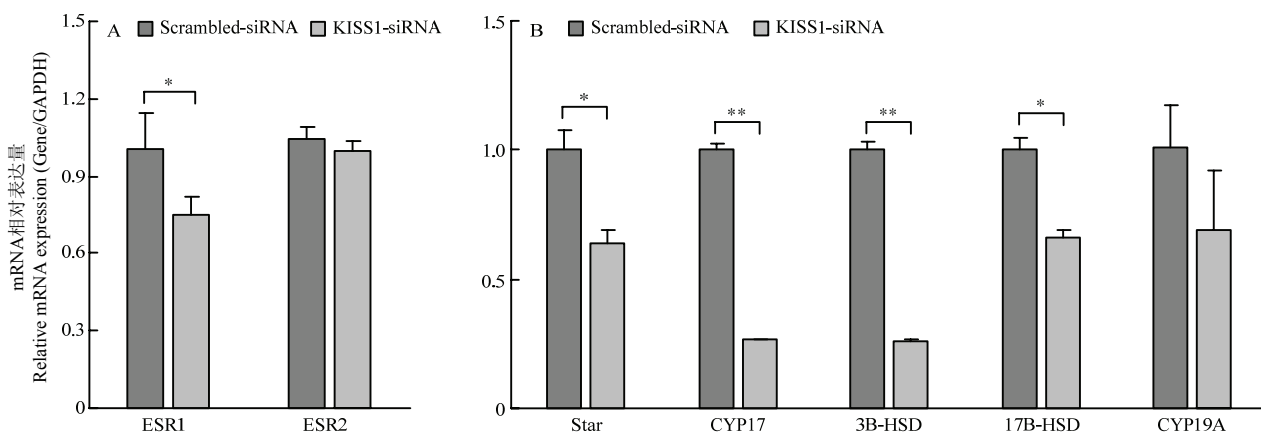
干扰 *KISS1* 能够影响颗粒细胞的凋亡和周期, 并影响颗粒细胞分泌 E_2 的能力, 为进一步探究 *KISS1* 能否影响雌激素合成相关基因及雌激素受体的转录水平, qRT-PCR 结果证实, 干扰 *KISS1*, 雌激素受体 *ESR1* 的转录水平显著低于 Scrambled-siRNA 组 ($P < 0.05$), *ESR2* 的转录水平低于 Scrambled-siRNA 组, 差异不显著 (图 6-A), 说明干扰 *KISS1* 能够抑制 *ESR1* 和 *ESR2* 表达。此外, qRT-PCR 结果证实, 干扰 *KISS1* 后, 雌激素合成通路基因 *Star* ($P < 0.05$)、*CYP17* ($P < 0.01$)、

3B-HSD ($P < 0.05$) 和 *17B-HSD* ($P < 0.05$) 转录水平显著低于 Scrambled-siRNA 组, *CYP19A* 的转录水平低于 Scrambled-siRNA 组 (图 6-B), 说明干扰 *KISS1* 能够影响雌激素合成通路基因转录水平。

3 讨论

3.1 *KISS1* 与 PI3K 信号通路的联系

猪的 *KISS1* 位于 9 号染色体^[19], 包含 2 个外显子, CDS 区长度约为 417 bp, 编码 138 个氨基酸^[20], 广泛分布于人和动物的各个组织中, 在人的胎盘中表达量最高^[6, 21], 在大鼠的下丘脑中表达量最高^[22], 在



A. 干扰 *KISS1* 抑制 *ESR1* 和 *ESR2* 表达; B. 干扰 *KISS1* 抑制雌激素通路基因的表达
A. Interfering *KISS1* inhibits *ESR1* and *ESR2* expression; B. Interfering *KISS1* inhibits the expression of estrogen pathway genes

图 6 雌激素分泌相关通路基因转录水平

Fig. 6 Gene transcription level of estrogen secretion related pathway

猪的下丘脑、垂体、卵巢等组织中都有不同水平的表达^[20]。早期有关 *KISS1* 的研究主要集中在癌细胞的转移抑制^[23]，之后的研究更多集中在 *KISS1* 对哺乳动物中枢调节和神经内分泌的作用^[24]，近期已有研究证实，*KISS1* 在哺乳动物的卵巢中表达，但关于 *KISS1* 在猪卵巢中表达调控机制的研究较少。此外，PI3K/AKT 信号通路是调控原始卵泡激活和发育的经典信号通路，于是本研究首先探究了干扰 *KISS1* 对 PI3K 信号通路中部分基因转录水平的影响。又因为卵泡是卵巢的组成单位，圆形泡状卵泡位于卵巢皮质部，主要由卵母细胞、颗粒细胞和膜细胞组成，根据卵母细胞及颗粒细胞不同时期的生长状况，可将卵泡分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡及成熟卵泡。原始卵泡的卵母细胞仅包裹着单层扁平状的颗粒细胞，随着卵泡的发育，包裹卵母细胞的颗粒细胞逐渐增至数层，形态也由扁平状变为柱状，并在卵泡排卵前逐渐分化为包裹卵母细胞的卵丘颗粒细胞和紧贴卵泡内壁的壁层颗粒细胞^[25-27]。颗粒细胞的发育优先于卵母细胞的发育^[28]，因而颗粒细胞的生长分化是原始卵泡生长和启动的关键因素，而颗粒细胞的凋亡是卵泡闭锁的主要标志，于是本研究将母猪卵巢颗粒细胞作为探究卵泡体外发育的细胞模型。干扰 *KISS1* 后，发现能够激活 PI3K 信号通路的 *AKT1* 转录水平显著降低 ($P<0.05$)，抑制 PI3K 信号通路激活的 *FOXO3* 转录水平也显著降低 ($P<0.05$)，该结果初步说明干扰 *KISS1* 可能微调 PI3K 信号通路的基因转录水平，并影响 PI3K 信号通路活性。

3.2 *KISS1* 与颗粒细胞功能的联系

基于干扰 *KISS1* 能够影响 PI3K/AKT 信号通路标志基因的表达量，于是进一步检测干扰 *KISS1* 对颗粒细胞功能的影响。前期研究发现，过表达 *KISS1* 能够促进颗粒细胞增殖，抑制颗粒细胞凋亡^[18]；本研究发现，干扰 *KISS1*，凋亡的颗粒细胞比例显著增加，这部分结果与前期研究结果相呼应，证明 *KISS1* 的转录水平能够影响颗粒细胞的增殖和凋亡，于是进一步研究干扰 *KISS1* 对颗粒细胞周期的影响。已知细胞周期分为 G0/G1、S 和 G2/M 期，其中 G0/G1 期为细胞处于阻留的状态，细胞在未受刺激时会暂时停止分裂，但 DNA 合成与细胞分裂的潜力仍然存在，在一定适宜刺激下，又可进入周期进行分裂增殖^[29]，G0/G1 期阻滞是机体调节细胞周期的重要手段^[30]。S 期为 DNA 合成时期，DNA 数目在此时期加倍，一般情况下细胞一旦进入 S 期，细胞分裂就会继续进行下去，直到下

一周期^[31]。本研究发现干扰 *KISS1*，阻滞在 G0/G1 期的颗粒细胞显著高于对照组 ($P<0.01$)，而处于 S 期的颗粒细胞则低于对照组，但差异不显著，细胞周期结合细胞凋亡的结果，也说明干扰 *KISS1* 能够显著影响颗粒细胞的功能。

3.3 *KISS1* 与颗粒细胞 E_2 分泌的联系

KISS1/GPR54 信号传导是下丘脑回路的一部分，该信号能够促性腺激素释放，进而促进卵巢中 E_2 释放^[32]、性器官发育^[33]等，于是本研究拟通过干扰 *KISS1*，探究 *KISS1* 与颗粒细胞 E_2 分泌的联系，结果表明体外干扰颗粒细胞中的 *KISS1*，培养基上清中 E_2 的浓度显著降低 ($P<0.01$)，该部分结果与前人研究结果一致。

同时已有研究表明，雌激素受体 *ESR1* 和 *ESR2* 在动物机体内具有重要的生理作用^[34-35]， E_2 与受体 *ESR1* 和 *ESR2* 结合才能发挥作用^[36]，且在卵巢发育的过程中，随着颗粒细胞的生长，*ESR1* 的表达水平也随之增加^[37-38]。当雌激素受体与其配体结合时，可协同 PI3K 通路，激活原始卵泡，促进卵泡成熟^[39]，但当小鼠体内的雌激素受体缺失时，小鼠血清中 FSH、LH、 E_2 等含量显著高于正常小鼠，小鼠排卵功能发生障碍^[40]。综上所述，*ESR1* 和 *ESR2* 基因的转录水平，能够反映颗粒细胞分泌 E_2 的能力。此外，雌激素受体的表达除了可以调节相关激素的分泌，还能够升高雌激素合成相关基因 *CYP17* 和 *HSD17b* 的转录水平，促进排卵^[41]。于是本研究将 Scrambled-siRNA 和 *KISS1*-siRNA 转染至颗粒细胞，抽取细胞 RNA，并使用 qRT-PCR 分析颗粒细胞中雌激素受体及 E_2 信号通路关键基因的转录水平。结果证实，干扰 *KISS1*， E_2 受体 *ESR1* 表达量显著下调， E_2 信号通路关键基因 *Star*、*CYP17*、*3B-HSD* 和 *17B-HSD* 也显著下调，该结果与 ELISA 结果一致，从分子水平佐证了干扰 *KISS1* 能够抑制颗粒细胞 E_2 分泌。

4 结论

干扰 *KISS1* 能够抑制猪卵巢颗粒细胞中 PI3K 信号通路的激活，同时能够促进颗粒细胞的凋亡，将颗粒细胞阻滞于分裂间期。干扰 *KISS1* 能够抑制颗粒细胞中雌激素受体 *ESR1* 和 *ESR2* 及雌激素合成信号通路基因 *Star*、*CYP17*、*3B-HSD* 和 *17B-HSD* 的转录水平，抑制 E_2 的分泌。

References

- [1] VANDERHYDEN B C, ARMSTRONG D T. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent

- development of rat oocytes. *Biology of Reproduction*, 1989, 40(4): 720-728.
- [2] MAALOUF S W, LIU W S, PATE J L. MicroRNA in ovarian function. *Cell and Tissue Research*, 2016, 363(1). DOI: 10. 1007/s00441-015-2307-4.
- [3] EPPIG J J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 2001, 122(6): 829-838.
- [4] UDA M, OTTOLENGHI C, CRISPONI L. *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(11): 1171-1181.
- [5] WEST A, VOJTA P J, WELCH D R. Chromosome localization and genomic structure of the *KISS-1* metastasis suppressor gene (*KISS1*). *Genomics*, 1998, 54(1): 145-148.
- [6] LEE J H, MIELE M E, HICKS D J. *KISS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [7] HU K L, ZHAO H, CHANG H M. Kisspeptin/Kisspeptin receptor system in the ovary. *Front Endocrinology (Lausanne)*, 2017, 8: 365.
- [8] GAYTAN F, GAYTAN M, CASTELLANO J M. *KISS-1* in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in *KISS-1* mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2009, 296(3): E520-531.
- [9] 郭美君. 高泌乳素血症通过 *Kiss1/GPR54* 系统影响小鼠卵泡发育及排卵[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- GUO M J. Hyperprolactinemia affects the follicles development and ovulation by *Kiss1/GPR54* system in mice[D]. Nanchang: Nanchang University. 2016. (in Chinese)
- [10] 赖丽丹. 高泌乳素血症通过 *Kiss1/GPR54* 系统对大鼠卵巢黄体细胞内分泌功能的影响及其机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- LAI L D. The effect and mechanism of hyperprolactinemia on endocrine function of rat luteal cell by *Kiss1/GPR54* system[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016. (in Chinese)
- [11] 王笑, 王甄真, 陈雁. PI3K/AKT 信号通路在维持血糖平衡中的作用. *生命科学*, 2013, 25(2): 133-139.
- WANG X, WANG Z Z, CHEN Y. The functions of PI3K/AKT signaling pathway in glucose homeostasis. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(2): 133-139. (in Chinese)
- [12] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [13] ENGELMAN J A, LUO J, CANTLEY L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(8): 606-619.
- [14] JAGARLAMUDI K, LIU L, ADHIKARI D. Oocyte-specific deletion of *Pten* in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6186.
- [15] REDDY P, LIU L, ADHIKARI D. Oocyte-specific deletion of *Pten* causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 2008, 319(5863): 611-613.
- [16] FAN H Y, LIU Z, CAHILL N. Targeted disruption of *Pten* in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Molecular Endocrinology*, 2008, 22(9): 2128-2140.
- [17] 蔡竞. 基于 PI3K/AKT 信号通路研究新加归肾丸促卵泡发育的分子机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- CAI J. Based on PI3K/AKT signaling pathway to study the molecular mechanism of Xinjiaguishen pill promoting follicular development[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM. 2013. (in Chinese)
- [18] XIN X, LI Z, ZHONG Y. *KISS1* Suppresses apoptosis and stimulates the synthesis of E2 in porcine ovarian granulosa cells. *Animals (Basel)*, 2019, 9(2). DOI: 10. 3390/ani9020054.
- [19] TOMIKAWA J, HOMMA T, TAJIMA S. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic *KISS1* gene in the pig. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(2): 313-319.
- [20] 臧猛, 晁利刚, 张志强, 台玉磊, 王静, 武宇晓, 杨国宇. 猪 *KISS-1* 基因克隆、序列分析. *江西农业学报*, 2008, 20(11): 5-7.
- ZANG M, CHAO L G, ZHANG Z Q, TAI Y L, WANG J, WU Y X, YANG G Y. Molecular cloning and sequence analysis of porcine gene *KISS-1*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2008, 20(11): 5-7. (in Chinese)
- [21] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S. Metastasis suppressor gene *KISS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001, 411(6837): 613-617.
- [22] IRWIG M S, FRALEY G S, SMITH J T. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KISS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 2004, 80(4): 264-272.
- [23] FUNES S, HEDRICK J A, VASSILEVA G. The *KISS-1* receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(4): 1357-1363.
- [24] PAPAICONOMOU E, MSAOUEL P, MAKRI A. The role of kisspeptin/GPR54 in the reproductive system. *In Vivo*, 2011, 25(3): 343-354.
- [25] HUNTER M G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 2000, 5(2): 122-130.
- [26] MCGEE E A, HSUEH A J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(2): 200-214.

- [27] SIMPSON E R, CLYNE C, RUBIN G. Aromatase-A brief overview. *Annual Review of Physiology*, 2002, 64: 93-127.
- [28] 魏泽辉, 贾存灵. 家禽卵泡选择过程中颗粒细胞的分子调控机制. *中国家禽*, 2017, 39(21): 1-5.
- WEI Z H, JIA C L. The molecular regulation mechanism of granulosa cells in the process of poultry follicle selection. *Chinese Poultry*, 2017, 39(21): 1-5. (in Chinese)
- [29] MISHIMA T, TODA S, ANDO Y. Rapid proliferation of activated lymph node CD4(+) T cells is achieved by greatly curtailing the duration of gap phases in cell cycle progression. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2014, 19(4): 638-648.
- [30] CHEN H, XU X, WANG G. CDK4 protein is degraded by anaphase-promoting complex/cyclosome in mitosis and reaccumulates in early G1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(24): 10131-10141.
- [31] CROSSIN P E, PATHAK S, ARRIGHI F E. A high resolution study of the DNA replication patterns of Chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining technique. *Chromosoma*, 1975, 52(4): 339-347.
- [32] GOTTSCH M L, CUNNINGHAM M J, SMITH J T. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4073-4077.
- [33] FINDLAY J K, BRITT K, KERR J B. The road to ovulation: The role of oestrogens. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2001, 13(7/8): 543-547.
- [34] TORAN-ALLERAND C D. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: Where will it end? *Endocrinology*, 2004, 145(3): 1069-1074.
- [35] BAKER L, MELDRUM K K, WANG M. The role of estrogen in cardiovascular disease. *Journal of Surgical Research*, 2003, 115(2): 325-344.
- [36] 杜彦博. 雌激素及其相关炎症因子对卵泡发育的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- DU Y B. The effects of estrogen and related inflammatory factors on the development of follicle[D]. Shanghai: Fudan University, 2012. (in Chinese).
- [37] 屈超, 刘中洋, 袁荣刚, 王晓波. 雌激素信号通路概述. *生物技术通讯*, 2014, 25(3): 448-450.
- QU C, LIU Z Y, XI R G, WANG X B. Estrogen signaling review. *Letters in Biotechnology*, 2014, 25(3): 448-450. (in Chinese)
- [38] 岳占碰, 张学明, 马琳. 雌激素对哺乳动物卵泡发育的影响研究进展. *中国畜牧杂志*, 2007(1): 41-43.
- YUE Z P, ZHANG X M, MA L. The production of estrogens in mammalian follicle and its effect on follicular development. *Chinese Journal of Animal Science*, 2007(1): 41-43. (in Chinese)
- [39] 罗峰, 谢琪璇, 秋山泰身, 秦俊文. 调节卵子发育成熟的信号转导通路. *生殖与避孕*, 2011, 31(7): 495-501.
- LUO F, XIE Q X, QIUSHAN T S, QIN J W. Signal transduction pathways that regulate egg development and maturation. *Reproduction and Contraception*, 2011, 31(7): 495-501. (in Chinese)
- [40] 詹晓庆, 王鲜忠, 张家骅. 雌激素受体和雌性生殖研究进展. *动物医学进展*, 2005(12): 35-39.
- ZHAN X Q, WANG X Z, ZHANG J H. Progress on estrogen receptor and female reproduction. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005(12): 35-39. (in Chinese)
- [41] 艾芳, 丘彦. 雌激素受体亚型与多囊卵巢综合征. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2009, 28(3): 190-193.
- AI F, QIU Y. Estrogen receptor subtypes and polycystic ovarian syndrome. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2009, 28(3): 190-193. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)