

李硕,李念,周小枫,等. *RSPO2* 对卵巢颗粒细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(12): 59-69.
Li S, Li N, Zhou XF, et al. Effects of *RSPO2* on oxidative stress and apoptosis in ovarian granulosa cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(12): 59-69.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.12.007

RSPO2 对卵巢颗粒细胞氧化应激和凋亡的影响

李 硕,李 念,周小枫,袁晓龙*

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

【摘要】 目的 以人卵巢颗粒肿瘤细胞为模型,探究特异性顶部盘状底板反应蛋白 2(*RSPO2*)对卵巢颗粒细胞氧化应激和凋亡的影响。方法 在 COV434 细胞中瞬时转染 *RSPO2* 过表达质粒和小干扰 RNA (siRNA),实时荧光定量 PCR (qPCR)、蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测过表达和干扰效率,利用活性氧检测试剂盒测定细胞内活性氧含量,流式细胞术检测凋亡水平,qPCR、Western blot 测定氧化应激和凋亡相关基因表达量,免疫共沉淀检测互作蛋白。结果 成功实现 *RSPO2* 的过表达和干扰。过表达 *RSPO2* 显著抑制颗粒细胞内活性氧的水平 ($P<0.05$),极显著抑制颗粒细胞早期凋亡 ($P<0.01$),干扰 *RSPO2* 可得到相反的试验结果。过表达 *RSPO2* 能显著上调 *SOD1*、*SOD2*、*CAT* mRNA 和蛋白表达水平 ($P<0.05$),显著下调 *Caspase 3*、*Caspase 8* 表达水平 ($P<0.05$)。相反,干扰 *RSPO2* 显著下调 *SOD1*、*CAT* 表达水平 ($P<0.05$),显著上调 *Caspase 3*、*Caspase 8* 表达水平 ($P<0.05$),并发现 *RSPO2* 和 *SOD1*、*CAT*、*Caspase 3* 存在明显的蛋白互作现象。结论 干扰 *RSPO2* 促进细胞内活性氧的积累,下调 *SOD1* 和 *CAT* 的表达,从而促进氧化应激;干扰 *RSPO2* 上调 *Caspase 3* 和 *Caspase 8* 的表达,促进细胞的凋亡,提示 *RSPO2* 在卵巢颗粒细胞中发挥着重要的作用。

【关键词】 *RSPO2*;卵巢颗粒细胞;氧化应激;凋亡

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2024) 12-0059-11

Effects of *RSPO2* on oxidative stress and apoptosis in ovarian granulosa cells

LI Shuo, LI Nian, ZHOU Xiaofeng, YUAN Xiaolong*

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

【Abstract】 **Objective** We aimed to investigate the effect of roofplate-specific spondin 2 (*RSPO2*) on oxidative stress and apoptosis in ovarian granulosa cells, using human ovarian granulosa tumor cells as a cellular model. **Methods** We transiently transfected COV434 human granulosa cells with *RSPO2* overexpression plasmid and small interfering RNA (siRNA). The efficiencies of the overexpression and interference were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot. Intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected using a ROS assay kit, and apoptosis was detected by flow cytometry. Expression levels of oxidative stress- and apoptosis-related genes were determined

【基金项目】广东省基础与应用基础研究基金(2024A1515012999,2023A1515010364,2022A1515012490);国家生猪产业技术体系(CARS-35)。

【作者简介】李硕(2000—),女,硕士研究生,研究方向:动物遗传与育种与繁殖。E-mail:ls06414000@163.com

【通信作者】袁晓龙(1989—),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:小型猪雌性生殖发育。E-mail:yx1@scau.edu.cn

by qPCR and Western blot, and interacting proteins were detected by co-immunoprecipitation. **Results** *RSP02* overexpression and interference were successfully realized. Overexpression of *RSP02* significantly inhibited ROS levels in COV434 cells ($P<0.05$) and the early apoptosis of granulosa cells ($P<0.01$), while *RSP02* interference had the opposite result. Overexpression of *RSP02* significantly upregulated the mRNA and protein levels of superoxide dismutase (SOD) 1, SOD2, and catalase (CAT) ($P<0.05$), and significantly downregulated the levels of *Caspase 3* and *Caspase 8* ($P<0.05$). In contrast, *RSP02* interference significantly downregulated *SOD1* and *CAT* ($P<0.05$) and significantly upregulated *Caspase 3* and *Caspase 8* ($P<0.05$). We found protein interactions between *RSP02*, *SOD1*, *CAT*, and *Caspase 3*. **Conclusions** Interfering with *RSP02* promotes the accumulation of ROS within cells and downregulates the expression of *SOD1* and *CAT*, thereby enhancing oxidative stress. Additionally, interfering with *RSP02* upregulates the expression of *Caspase 3* and *Caspase 8*, promoting cell apoptosis. These findings suggest that *RSP02* plays a crucial role in ovarian granulosa cells.

【Keywords】 *RSP02*; ovarian granulosa cell; oxidative stress; apoptosis
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卵巢性索间质瘤是一种在卵巢肿瘤谱系中相对罕见的类型^[1],其发病率约占所有恶性卵巢肿瘤的8%。在卵巢性索间质瘤的多种病理类型中,颗粒细胞卵巢癌发病率高达恶性卵巢性索间质瘤的90%^[2]。尽管颗粒细胞卵巢癌在初始阶段通常展现出较为良好的预后,但当疾病进展至晚期或发生复发时,患者的生存率会显著下降^[3]。因此,需要对颗粒细胞卵巢癌进行深入研究,以期为该疾病的治疗策略优化提供更为坚实的科学依据。

研究发现,氧化应激(oxidative stress, OS)是卵巢癌发生的重要调节因素^[4]。OS指机体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)与抗氧化防御系统失衡而引起的一系列适应性的反应^[5]。氧化应激的增加诱导卵巢癌细胞中的DNA损伤,从而抑制肿瘤的发生^[6]。细胞凋亡是细胞皱缩,染色质浓缩,最后细胞分裂成“凋亡小体”的过程^[7]。OS会使多种细胞成分遭到破坏,也可以激活特定信号通路从而导致细胞凋亡^[8-9]。因此,探索用于调控卵巢颗粒肿瘤细胞内氧化应激水平的新型生物标志物将有助于颗粒细胞卵巢癌的有效治疗。

特异性顶部盘状底板反应蛋白2(roofplate-specific spondin 2, *RSP02*)是R-Spondin家族中的一员^[10],其氨基酸序列在脊椎动物中高度保守(40%~60%)^[11]。大量研究发现*RSP02*对脊椎动物胚胎发育至关重要^[12-13]。先前的机制研究证实了*RSP02*可以激活Wnt信号通路^[11,14]。过表达*RSP02*导致了乳腺癌患者的低生存率;敲除*RSP02*抑制乳腺癌细胞的Wnt信号传导和增殖^[15]。过表达*RSP02*促进人胃癌细胞的增殖、迁移和从上皮到间充质的转变^[16]。用重组*RSP02*体外处理卵巢培养物,可促进颗粒细胞增殖^[17-18]。*RSP02*突变杂合

子雌性小鼠表现年龄依赖性不育,伴有多囊卵巢发育^[12]。有报道显示,*RSP02*能够通过活化Nrf2信号途径,提高细胞的抗氧化能力,缓解氧化压力^[19]。综上所述,*RSP02*在癌细胞的发生和发展中扮演着重要的角色,并且在调控氧化应激中也发挥着重要的作用^[12,17-21]。然而,*RSP02*如何调控卵巢颗粒肿瘤细胞的氧化应激及其凋亡的作用机制尚不清晰。因此,在本研究中,以人卵巢颗粒肿瘤细胞为研究对象,使用实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)等分子生物学技术阐述*RSP02*在颗粒细胞中调控氧化应激和凋亡的作用,以期开发治疗颗粒细胞卵巢癌提供潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞

本研究采用人卵巢颗粒肿瘤细胞系COV434细胞取自广东省农业动物基因组与分子育种重点实验室的细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

过表达质粒购自广东东泽生物科技有限公司;小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)购自广州锐博生物技术有限公司;高糖杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM, AH30380357)购自美国Cytiva;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, 45070321FBS)购自德国Serana;Opti-MEM(2508952)购自美国Gibco;胰蛋白酶(2537170)购自美国Gibco;青霉素-链霉素(2441868)购自美国Thermo Fisher Scientific;Lipofectamine 3000 Transfection Reagent(LIPO3000,

L3000015) 购自美国 Invitrogen; 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS, BL302A) 购自北京雷根生物技术有限公司; RNAfast200 (220011) 总 RNA 极速提取试剂盒购自上海飞捷生物有限公司; PrimeScript RT Master Mix (1618) 购自日本 TaKaRa; Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (H2302190) 购自中国上海翊圣生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂 (BL612A) 购自中国兰杰柯科技有限公司; RIPA 裂解液 (BB-32011) 购自上海贝博生物科技公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BL521A) 购自中国兰杰柯科技有限公司; FuturePAGE™ 蛋白预制胶 (ET15420Gel) 购自常州伯仪生物科技股份有限公司; 5× 蛋白上样缓冲液 (DB289) 购自广州米恩生物技术有限公司; 预染蛋白 Marker (DB182-10) 购自广州米恩生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD; 活性氧检测试剂盒 (S0033S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; EZ-Buffers H 10×TBST Buffer (C520009-0005) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 脱脂奶粉 (1172GR500) 购自德国 Biofrox; BeyoECL Moon (极超敏 ECL 化学发光试剂盒, P0018FM) 购自上海碧云天生物技术有限公司; rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit (BK0004-01) 购自南京艾思易生物技术有限公司; RSPO2 antibody (20231116Q) 购于中国 FineTest; SOD1 Polyclonal antibody (00119045) 购于中国 Proteintech Group; SOD2/MnSOD Antibody (8k8471) 购于中国 Affinity Biosciences; Catalase Polyclonal antibody (00104291) 购于中国 Proteintech Group; Caspase 8 Antibody (58e0803) 购于中国 Affinity Biosciences; Caspase 3 Antibody (76i4559) 购于中国 Affinity Biosciences; GAPDH Antibody (YN5585) 购于美国 Immunoway; Anti-Alpha-tubulin Antibody (ER130905) 购于中国 Huabio; 山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (ab205718, GR3411617-12) 购于英国 Abcam; 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) (ab205719, GR3405228-11) 购于英国 Abcam。

恒温 CO₂ 细胞培养箱 (300082969) 购自美国 Thermo Fisher Scientific; 荧光定量 PCR 仪 (788BR06043) 购自美国 Bio-Rad; 台式高速室温离心机 (D-37520) 购自美国 Thermo Fisher Scientific; Eppendorf AG 22331 购自德国 Eppendorf; 多功能酶标仪购自美国 Promega; Nano Drop 2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific; 空气浴培养摇床购自德国

BMH; eBlot L1 快速湿转仪购自美国 GenScript; 定轨摇床和垂直混合仪购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能科技有限公司; 倒置显微镜购自德国 Leica; 倒置荧光显微镜购自日本 Nikon。

1.3 实验方法

1.3.1 COV434 细胞的培养

COV434 细胞用含 10% 的 FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基在培养瓶中于 37 ℃ 和 5% CO₂ 细胞培养箱中静置培养。每隔 2~3 d 传代, 待细胞处于对数生长期, 汇合度达到 70% 左右时用于铺板进行后续试验。

1.3.2 RSPO2 过表达质粒的构建和小干扰 RNA 的合成及转染

从 GenBank 中检索人 RSPO2 CDS 序列 (登录号: NM_178565.5), 以 pcDNA3.1 作为骨架载体构建过表达质粒。并根据 CDS 序列设计 3 条 siRNA, 序列编号及靶序列如表 1 所示。同时合成秀丽隐杆线虫的 siRNA 为通用阴性对照 (negative control, NC), 该序列与其他物种序列无同源性, 其名称为 siRNA-NC。参考 LIPO3000 试剂盒说明书, 待细胞汇合度达到 80% 左右时, 对试验组进行过表达质粒和小干扰 RNA 的转染处理, 同时对对照组进行空载和 siRNA-NC 转染。

1.3.3 活性氧检测荧光实验

采用 DCFH-DA 探针活性氧检测试剂盒检测细胞内 ROS 水平。将 COV434 细胞接种于 96 孔板, 贴壁 24 h 后转染空载、过表达质粒、siRNA-NC 和 siRNA。处理 24 h 后用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μL 的 10 μmol/L DCFH-DA 探针稀释液, 37 ℃ 避光孵育 20~30 min, 用无血清培养基清洗细胞 3 次, 在多功能酶标仪中使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 实时检测刺激后各组的吸光度 (optical density, OD), 并使用倒置荧光显微镜采集细胞图像。

表 1 RSPO2 基因 CDS 区 siRNA 序列

序列编号	靶序列 (5'-3')
Sequence number	Target sequence (5'-3')
小干扰 RNA#1 siRNA#1	GTTGCTCATTGGAGCGAAT
小干扰 RNA#2 siRNA#2	GTAGCCGATGTCAACAGAA
小干扰 RNA#3 siRNA#3	GAACACGGCAAATTGTAA

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡

使用 Annexin V-FITC/PI 染色法,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。将细胞接种于 6 孔板,静置贴壁 24 h 后,转染空载、过表达质粒、siRNA-NC 和 siRNA。处理 24 h 后,用不含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的胰蛋白酶在 37 ℃ 下消化 5 min 后转移至 15 mL 离心管中,24 ℃ 下 2000 r/min 离心 5 min 收集细胞弃上清。用预冷的 PBS 重悬洗涤细胞 2 次,离心弃上清加入 DMEM 高糖培养基重悬,后取 5~10 万重悬细胞,2000 r/min 离心 5 min,弃上清加入 500 μL 1 ×

Annexin V buffer 重悬细胞。后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啉染色液混匀,24 ℃ 避光孵育 15 min。随即用流式细胞仪测定早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞的百分比。

1.3.5 RNA 提取及反转录

将细胞接种于 6 孔板,静置贴壁 24 h 后,转染空载、过表达质粒、siRNA-NC 和 siRNA,处理 24 h。后参照 RNAfast200 总 RNA 极速提取试剂盒说明书提取总 RNA。使用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度和完整性。后将合格的 RNA 进行 cDNA 反转录,5 × PrimeScript RT Master Mix 2 μL ,总 RNA ≤

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物大小/bp PCR product length
<i>SOD1</i>	F: CTCACTCTCAGGAGACCATTGC R: CCACAAGCCAAACGACTTCCAG	129
<i>SOD2</i>	F: CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC R: AACCTGAGCCTTGACACCAAC	137
<i>CAT</i>	F: GTGCGGAGATTCAACACTGCCA R: CGGCAATGTCTCACACAGACG	109
<i>AHR</i>	F: GTCGTCTAAGGTGTCTGCTGGA R: CGCAAACAAAGCAACTGAGGTG	136
<i>FOXO3</i>	F: TCTACGAGTGGATGGTGCGTTG R: CTCTTGCCAGTTCCTCATTCTG	262
<i>CYP1A1</i>	F: GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC R: ATGAGGCTCCAGGAGATAGCAG	138
<i>CYP1B1</i>	F: TCATCCTGGAGACCTTCCGACA R: GCCACTGGTTTACGAAGACACAG	126
<i>CYP2E2</i>	F: GAGCACCATCAATCTCTGGACC R: CACGGTGATACCGTCCATTGTG	120
<i>RSP02</i>	F: CAACCGATGGAGACGCAGTAAAG R: TCCATACTGGCGCATCCCTTCT	148
<i>Caspase 3</i>	F: GGAAGCGAATCAATGGA CTCTGG R: GCATCGACATCTGTACCAGACC	146
<i>Caspase 7</i>	F: CGGAACAGACAAAGATGCCGAG R: AGGCGGCATTTGTATGGTCTC	143
<i>Caspase 8</i>	F: AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA R: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC	142
<i>Caspase 9</i>	F: GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT R: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT	129
<i>P53</i>	F: CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG R: TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	128
<i>CREB1</i>	F: CACAGACCACTGATGGACAGCA R: AGGACGCCATAACAAC TCCAGG	138
<i>PLCγ1</i>	F: TCTTCGTCTTCTCCATCAGCA R: CTCCAGGGCAATCTTCTTCC	176
<i>Bcl-2</i>	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	127
<i>BAX</i>	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGCAATCATC	103
<i>GAPDH</i>	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	131

500 ng,用 RNase Free H₂O 补齐至 10 μL。

1.3.6 qPCR

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)中查阅人相关基因的 mRNA 序列,其中包括目的基因 *RSPO2*,细胞氧化应激、凋亡相关蛋白基因以及内参基因 *GAPDH*。应用 Primer 5.0 软件设计荧光定量引物,序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其具体引物序列见表 2。以 cDNA 为模板,配制 20 μL 反应体系:SYBR(Synergy Brands)10 μL,上、下游引物各 0.6 μL,cDNA(反转录后稀释 5 倍)1 μL,ddH₂O 7.8 μL。反应程序为:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,循环 40 次。用 *GAPDH* 作为内参基因进行校正。结果采用相对模板量算法($\Delta\Delta C_t$ 法)处理,基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.3.7 Western blot

将细胞接种于 6 孔板,静置贴壁 24 h 后,转染空载、过表达质粒、siRNA-NC 和 siRNA,处理 24 h 后,弃掉六孔板中的培养基,用 PBS 清洗 2 次,弃上清。每孔加入含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 100 μL,4 ℃定轨摇床孵育 15 min,反复吹打孔内细胞使其充分裂解,12 000 r/min,4 ℃离心 10 min,收集上清液。使用蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白浓度,通过加入 5×蛋白上样缓冲液(含 DTT)和双蒸水,将浓度定量为 1000 ng/μL,99 ℃变性 10 min,-20 ℃保存备用。

取 12 μL 蛋白样品点样至 10% 的 FuturePAGE™ 蛋白预制胶中,电泳 130 V 50 min。经电泳分离后,使用 eBlot L1 快速湿转仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。用新配置的 5%脱脂奶粉于常温下,低转速封闭 2 h。1×TBST 洗膜 3 次,每次 5~10 min。将膜置于装有一抗稀释液的 15 mL 离心管中,放置在垂直混合仪上 4 ℃孵育 12~16 h。后用 1×TBST 洗 3 次,每次 5~10 min。将 PVDF 膜放入二抗稀释液中,室温摇床孵育 1.5~2 h,后用 1×TBST 洗 3 次,每次 5~10 min。向 PVDF 膜均匀滴加 ECL 显影液,使用全自动化学发光图像分析系统进行上机显影。

1.3.8 Co-IP 实验

采用 rProtein A/G Magnetic IP/Co-IP 试剂盒进行免疫共沉淀实验,按照试剂盒说明书的步骤,抽取正常贴壁生长细胞总蛋白,并使用抗原吸附的磁珠-抗体-抗原复合物富集互作蛋白,待磁珠磁性

分离后,收集上清液于 1.5 mL 离心管,99 ℃水浴 10 min,后进行 Western blot 实验。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件对实验数据进行统计分析,3 个及以上生物学独立样本数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,独立样本 *t* 检验用于比较两样本的均数, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达或干扰 *RSPO2* 效率确定

如图 1 所示,分别转染 0.2 ng/μL、0.4 ng/μL、1 ng/μL 的空载和过表达质粒至 COV434 细胞中,qPCR 结果表明,与过表达-阴性对照组(OE-NC)相比,过表达-*RSPO2* 组(OE-*RSPO2*)的 *RSPO2* mRNA 表达量均极显著升高($P<0.01$),故后续试验选用 0.2 ng/μL 进行转染(图 1A)。Western blot 检测细胞内 *RSPO2* 蛋白表达量的变化,结果显示,与 OE-NC 组相比,OE-*RSPO2* 组蛋白表达水平显著上升($P<0.05$)(图 1B)。

对 COV434 细胞分别转染 50 nmol 和 100 nmol 的 siRNA-NC 和 3 条 siRNA,qPCR 结果表明,与小干扰 RNA-阴性对照组(siRNA-NC)相比,转染 50 nmol 小干扰 RNA#1(siRNA#1)下调 *RSPO2* 表达量为 71%,干扰效果较好,达到了极显著水平($P<0.01$),其他处理组未表现出显著差异,故选用 50 nmol siRNA#1 进行后续试验(图 1C)。Western blot 检测发现相对于 siRNA-NC 组,小干扰 RNA-*RSPO2* 组(siRNA-*RSPO2*)的 *RSPO2* 蛋白表达水平显著下降($P<0.05$)(图 1D)。

2.2 *RSPO2* 抑制 COV434 细胞内活性氧积累

活性氧检测荧光法实验结果显示,在过表达试验中,相对于 OE-NC 组,OE-*RSPO2* 组的细胞荧光强度降低,细胞内活性氧水平极显著降低($P<0.01$)(图 2A、2B);在干扰试验中,相对于 siRNA-NC 组,siRNA-*RSPO2* 组的细胞荧光强度升高,细胞内活性氧水平极显著升高($P<0.01$)。以上结果表明,过表达 *RSPO2* 抑制活性氧的积累,干扰 *RSPO2* 促进了活性氧的积累(图 2C、2D)。

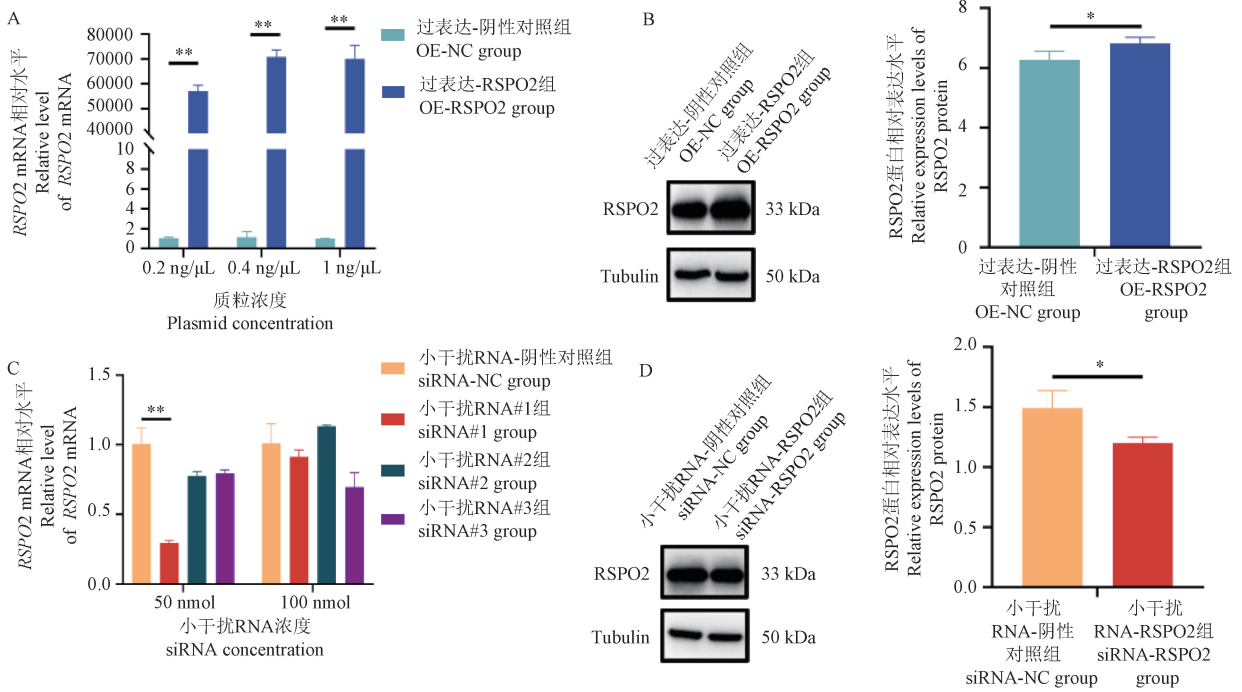
2.3 *RSPO2* 抑制 COV434 细胞早期凋亡

流式细胞仪检测细胞的凋亡,结果显示,OE-*RSPO2* 组细胞早期凋亡率极显著低于 OE-NC 组细胞($P<0.01$),而晚期凋亡率无显著差异(图 3A、3B)。siRNA-*RSPO2* 组早期凋亡率极显著高于

siRNA-NC 组 ($P<0.01$), 晚期凋亡率无显著差异(图 3C、3D)。以上结果表明, 过表达 *RSPO2* 抑制 COV434 细胞的早期凋亡, 干扰 *RSPO2* 诱导 COV434 细胞发生早期凋亡。

2.4 过表达或干扰 *RSPO2* 对 COV434 细胞氧化应激相关基因表达的影响

如图 4 所示, 利用 qPCR 和 Western blot 检测 COV434 细胞氧化应激相关基因在 mRNA 和蛋白水

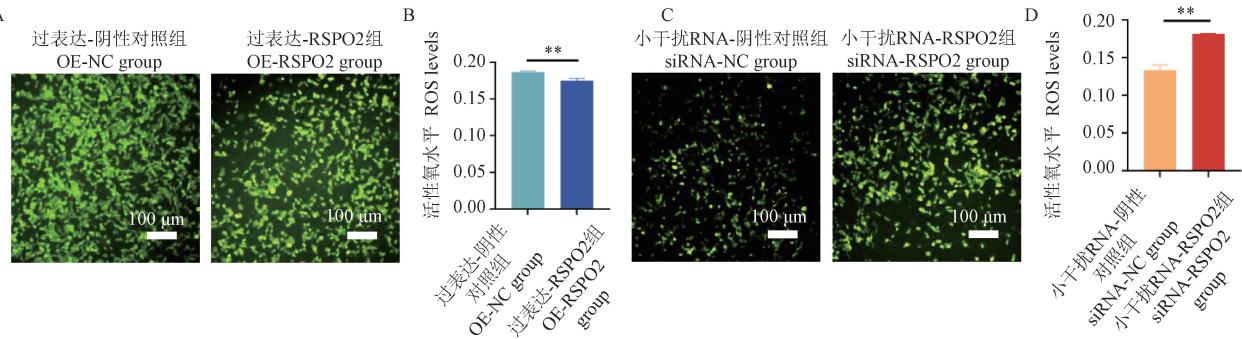


注:A;*RSPO2* mRNA 水平过表达效率;B;*RSPO2* 蛋白水平过表达效率;C;*RSPO2* mRNA 水平干扰效率;D;*RSPO2* 蛋白水平干扰效率。与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 过表达或干扰 *RSPO2* 效率检测

Note. A, Overexpression efficiency at *RSPO2* mRNA level. B, Overexpression efficiency at *RSPO2* protein level. C, Interference efficiency at *RSPO2* mRNA level. D, Interference efficiency at *RSPO2* protein level. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Determination of over-expression or interference with *RSPO2* efficiency

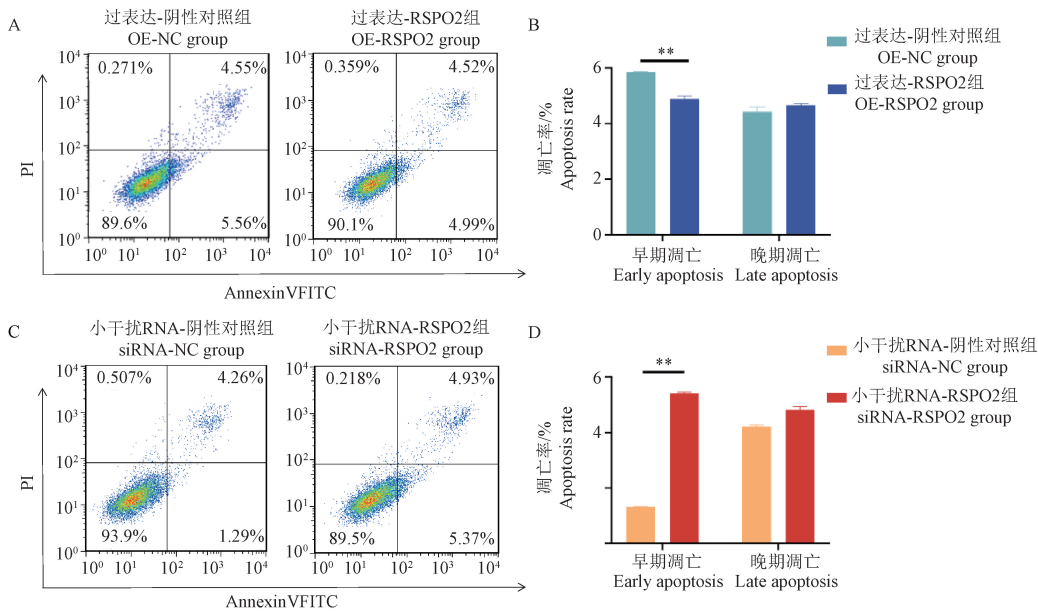


注:A;转染空载和过表达质粒后 COV434 细胞内 ROS 含量;B;过表达 *RSPO2* 细胞内 ROS 水平;C;转染 siRNA-NC 和 siRNA-RSPO2 后 COV434 细胞内 ROS 含量;D;干扰 *RSPO2* 细胞内 ROS 水平。与阴性对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 *RSPO2* 对 COV434 细胞内活性氧含量的影响

Note. A, Intracellular ROS content in the COV434 cells after transfection with empty and overexpression plasmids. B, Overexpression of *RSPO2* led to increased intracellular ROS levels. C, Intracellular ROS content in the COV434 cells after transfection with siRNA-NC and siRNA-RSPO2. D, Interference of *RSPO2* led to decreased intracellular ROS levels. Compared with NC group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of *RSPO2* on the content of reactive oxygen species in the COV434 cells

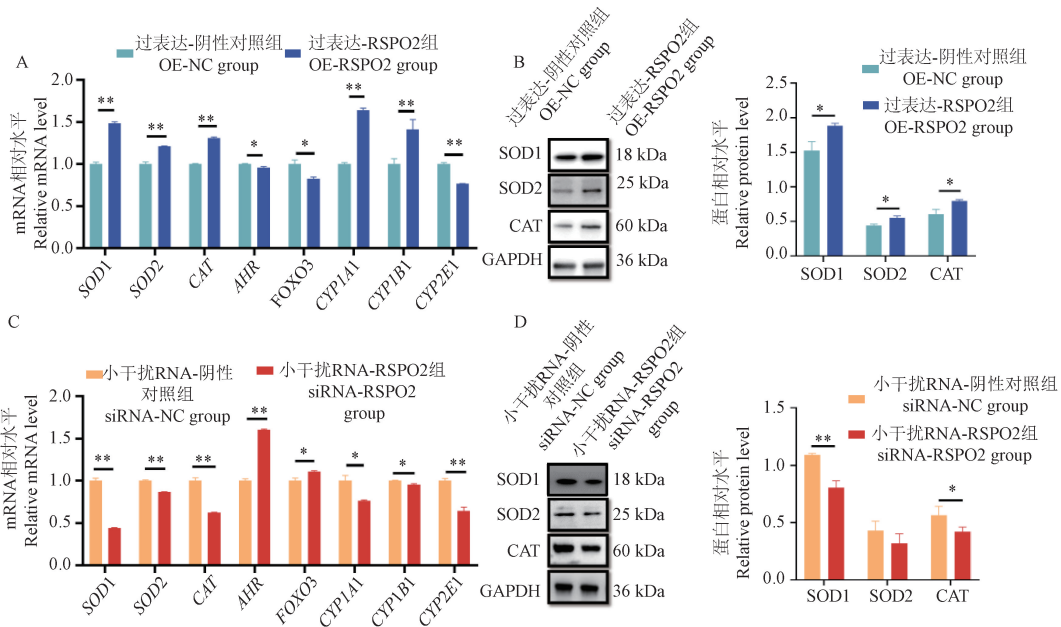


注:A;OE-NC 和 OE-RSPO2 组流式细胞凋亡检测图;B:过表达 *RSPO2* 细胞早期和晚期凋亡比例;C: siRNA-NC 和 siRNA-RSPO2 组流式细胞凋亡检测图;D:干扰 *RSPO2* 细胞早期和晚期凋亡比例。与阴性对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 *RSPO2* 对 COV434 细胞凋亡水平的影响

Note. A, Flow apoptosis assay plot of OE-NC and OE-RSPO2 groups. B, Proportion of early and late apoptosis in the overexpressing *RSPO2* cells. C, Flow apoptosis assay plot of siRNA-NC and siRNA-RSPO2 groups. D, Proportion of early and late apoptosis in the interference *RSPO2* cells. Compared with NC group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effect of *RSPO2* on the levels of apoptosis in the COV434 cells



注:A;OE-NC 组和 OE-RSPO2 组氧化应激相关基因 mRNA 相对表达水平;B:OE-NC 组和 OE-RSPO2 组氧化应激相关蛋白表达水平;C: siRNA-NC 组和 siRNA-RSPO2 组氧化应激相关基因 mRNA 相对表达水平;D: siRNA-NC 和 siRNA-RSPO2 组氧化应激相关蛋白表达水平。与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 COV434 细胞氧化应激相关基因表达水平

Note. A, Relative mRNA expression levels of oxidative stress-related genes in OE-NC and OE-RSPO2 groups. B, Expression levels of oxidative stress-related proteins in OE-NC and OE-RSPO2 groups. C, Relative mRNA expression levels of oxidative stress-related genes in siRNA-NC and siRNA-RSPO2 groups. D, Expression levels of oxidative stress-related proteins in siRNA-NC and siRNA-RSPO2 groups. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Expression levels of oxidative stress-related genes in the COV434 cells

平的表达量变化。结果显示,过表达 *RSPO2* 后可导致细胞内的氧化还原酶相关基因,如 *SOD1*、*SOD2* 和 *CAT* 的 mRNA 表达水平极显著高于对照组 ($P<0.01$),蛋白表达水平显著高于对照组 ($P<0.05$)。干扰 *RSPO2* 对以上基因 mRNA 表达水平的影响均与过表达结果相反,干扰 *RSPO2* 可显著抑制 *SOD1* 和 *CAT* 的蛋白表达水平 ($P<0.05$),但对 *SOD2* 的蛋白表达水平影响不显著(图 4C、4D)。结果表明, *RSPO2* 能调控氧化应激相关基因的表达。

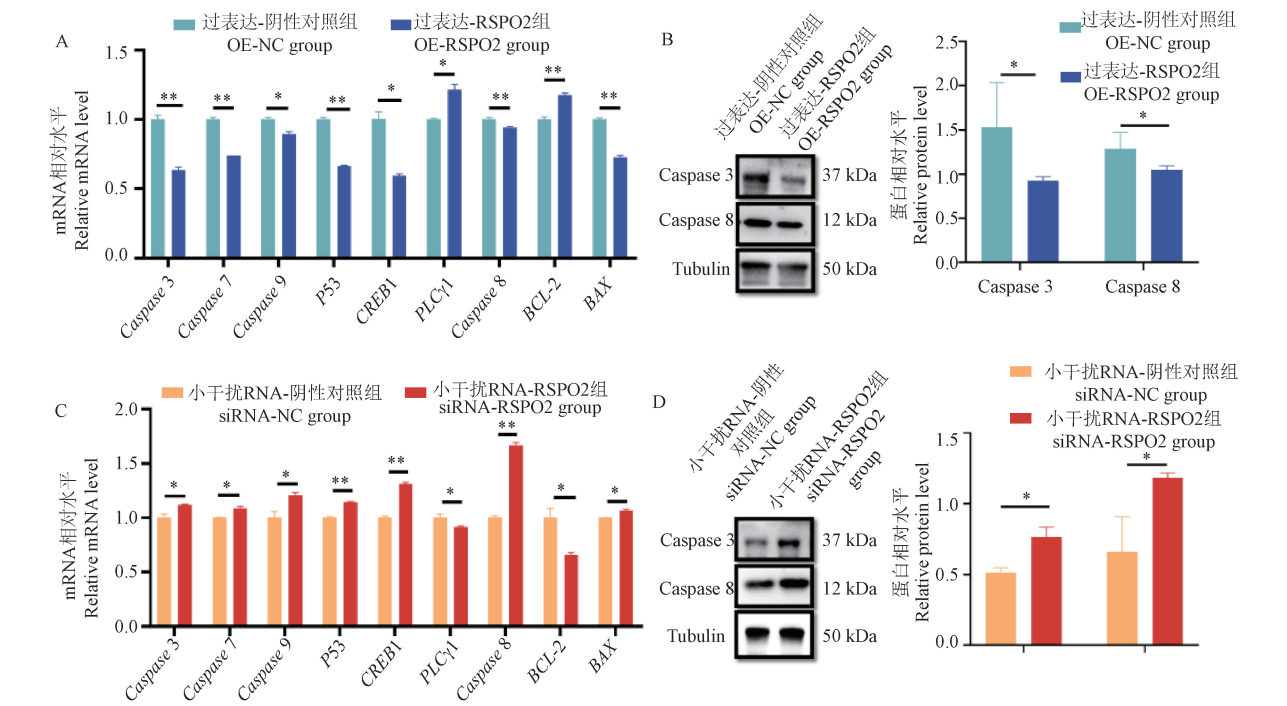
2.5 过表达或干扰 *RSPO2* 对 COV434 细胞凋亡相关基因表达的影响

检测 COV434 细胞凋亡相关基因的表达水平。结果显示,过表达 *RSPO2* 极显著下调促凋亡基因 *Caspase 3*、*Caspase 7*、*Caspase 8*、*P53*、*BAX* 的 mRNA 表达 ($P<0.01$),显著下调促凋亡基因 *Caspase 9*、*CREB1* 的 mRNA 表达 ($P<0.05$),显著或极显著上调抑凋亡基因 *PLCγ1*、*BCL-2* 的 mRNA 表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图 5A);Western blot 检测发现过

表达 *RSPO2* 可显著抑制 *Caspase 3*、*Caspase 8* 蛋白的表达 ($P<0.05$)(图 5B)。进一步检测干扰 *RSPO2* 后细胞凋亡相关基因表达情况,结果发现,与 siRNA-NC 组相比,siRNA-*RSPO2* 组 *P53*、*CREB1* 和 *Caspase 8* 表达量极显著上调 ($P<0.01$),*Caspase 3*、*Caspase 7*、*Caspase 9* 表达量显著上调 ($P<0.05$),抑制凋亡基因 *PLCγ1*、*BCL-2* 的表达量显著下调 ($P<0.05$)(图 5C);*Caspase 3*、*Caspase 8* 蛋白表达量显著上调 ($P<0.05$)(图 5D),结果表明, *RSPO2* 可以调控凋亡相关通路基因的表达。

2.6 *RSPO2* 与 *SOD1*、*CAT*、*Caspase 3* 蛋白互作

Co-IP 检测细胞内 *RSPO2* 与氧化应激及凋亡相关蛋白互作情况。所有蛋白在细胞内均正常表达(图 6),*RSPO2* 免疫沉淀产物中检测到 *SOD1*、*CAT*、*Caspase 3* 蛋白,未检测到 *SOD2* 和 *Caspase 8*。反向验证发现 *SOD1*、*CAT*、*Caspase 3* 免疫沉淀产物中检测到 *RSPO2* 蛋白,而 IgG 免疫沉淀产物中不能检测到 *RSPO2*、*SOD1*、*SOD2*、*CAT*、*Caspase 3* 和 *Caspase 8*。

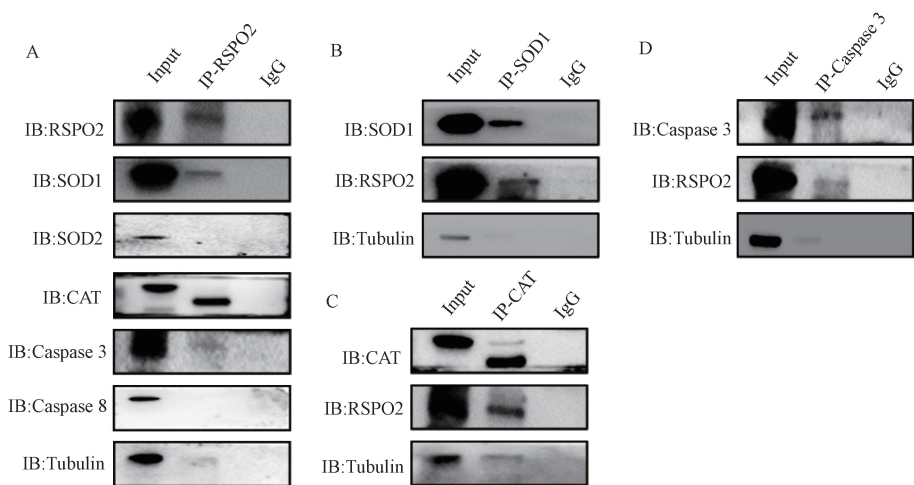


注:A:OE-NC 和 OE-RSPO2 组凋亡相关基因 mRNA 相对表达水平;B:OE-NC 和 OE-RSPO2 组凋亡相关蛋白表达水平;C:siRNA-NC 和 siRNA-*RSPO2* 组凋亡相关基因 mRNA 相对表达水平;D:siRNA-NC 和 siRNA-*RSPO2* 组凋亡相关蛋白表达水平。与阴性对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 COV434 细胞凋亡相关基因表达水平

Note. A, Relative expression levels of mRNA of apoptosis-related genes in OE-NC and OE-RSPO2 groups. B, Expression levels of apoptosis-related proteins in OE-NC and OE-RSPO2 groups. C, Relative mRNA expression levels of apoptosis-related genes in siRNA-NC and siRNA-RSPO2 groups. D, Expression levels of apoptosis-related proteins in siRNA-NC and siRNA-RSPO2 groups. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression levels of apoptosis-related genes in the COV434 cells



注:A:细胞内与 RSP02 结合的蛋白;B:SOD1 与 RSP02 的结合情况;C:CAT 与 RSP02 的结合情况;D:Caspase 3 与 RSP02 的结合情况。

图 6 RSP02 与氧化应激及凋亡相关蛋白互作

Note. A, Intracellular proteins that bind to RSP02. B, Binding of SOD1 to RSP02. C, Binding of CAT to RSP02. D, Binding of Caspase 3 to RSP02.

Figure 6 RSP02 interacts with oxidative stress and apoptosis-related proteins

3 讨论

颗粒细胞卵巢癌是最常见的性索间质瘤, 占有卵巢恶性肿瘤的 2% ~ 5%^[22]。在当前临床实践中, 手术干预是治疗颗粒细胞卵巢癌的核心手段^[23]。然而, 鉴于疾病复杂性, 探索并开发新型治疗策略显得尤为重要。基因调控在癌症发生中起着至关重要的作用, 其可能为颗粒细胞卵巢癌的治疗提供更加精准和有效的策略。

大量研究发现, *RSP02* 促进了鼻咽癌^[24]、肝癌^[25]、肺癌^[26]、胃癌^[27]等多种恶性肿瘤的发生和发展。*RSP02* 通过与特异性受体整合素 b3 和 LGR4 结合, 增强 FAK 和 Src 的自磷酸化, 从而促进卵巢癌细胞生长和转移^[28]。*RSP02* 蛋白对氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞凋亡起保护作用^[29]。在本研究中过表达 *RSP02* 抑制卵巢颗粒细胞的早期凋亡, 干扰 *RSP02* 促进颗粒细胞的早期凋亡, 这一表型结果与前人研究一致^[21]。此外, *RSP02* 降低巨噬细胞的内质网应激和 ROS 的产生^[29]。在本研究中, 过表达 *RSP02* 可抑制颗粒细胞内活性氧的水平, 干扰 *RSP02* 可促进活性氧的积累。推测 *RSP02* 在颗粒细胞氧化应激和凋亡的生物学进程中发挥着重要的作用。

氧化应激参与多种癌症的发生和发展^[30]。细胞内 ROS 水平的失衡会引发氧化损伤, 并通过各种机制导致癌细胞死亡。研究发现, 卵巢癌与氧化应激之间存在着复杂的关系^[31-33]。有研究显示, 生物

体中主要存在两种抗氧化系统, 即氧化还原酶系统和非酶系统。非酶系统可以直接淬灭细胞内的 ROS, 而酶系统由特定的氧化还原酶组成。细胞可以通过超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等来清除胞内的氧化物质, 具备调节氧化应激反应的能力^[34]。过氧化物酶 SOD 在清除过氧化物过程中发挥重要的作用^[35]。过氧化氢酶 CAT 是参与去除 ROS 的最重要的抗氧化酶之一^[36]。为阐明 *RSP02* 调控氧化应激的具体机制, 检测了通路标志基因的表达量及蛋白互作情况。发现干扰 *RSP02* 可以下调 *SOD1*、*SOD2* 和 *CAT* mRNA 和蛋白的表达, *RSP02* 可以与 *SOD1* 和 *CAT* 结合, 表明 *RSP02* 密切参与卵巢颗粒肿瘤细胞的氧化应激, 干扰 *RSP02* 会降低抗氧化酶的生成从而导致活性氧的积累进而促进卵巢颗粒肿瘤细胞的氧化损伤。

以往的研究发现氧化应激会诱发细胞凋亡^[37-38]。ROS 的积累会影响 *P53* 的稳定表达。*P53* 通过抑制抗凋亡基因 *BCL-2* 诱导 *BAX* 调控细胞凋亡^[39]。本研究发现 *RSP02* 可以下调 *P53* 和 *BAX* mRNA 的表达, 上调 *BCL-2*, 这一结果与前人研究一致^[21]。*Caspase 8* 是外源性凋亡信号的启动子, 处于活化状态的 *Caspase 8* 可以直接切割和激活下游的 *Caspase 7* 和 *Caspase 3* 从而启动细胞凋亡^[40]。*Caspase 3* 是细胞凋亡通路下游最重要的凋亡蛋白, 其表达量直接反映细胞凋亡程度。本研究发现干扰 *RSP02* 可以上调 *Caspase 3*、*Caspase 8* mRNA 和蛋白的表达并能与 *Caspase 3* 蛋白互作, 推测干扰

RSPO2 可以活化 Caspase 途径从而促进细胞凋亡。

综上所述,干扰 *RSPO2* 后可以下调氧化还原酶相关基因的表达促进细胞内活性氧的积累,上调促凋亡相关基因的表达促进细胞凋亡,并且发现 *RSPO2* 与 SOD1、CAT、Caspase 3 蛋白互作,推测 *RSPO2* 通过调控氧化还原酶的表达和 Caspase 途径进而调控颗粒细胞氧化应激及凋亡。这些研究结果提示 *RSPO2* 可能成为靶向治疗的有效分子,为颗粒细胞卵巢癌的治疗提供新思路。

参考文献:

[1] AL HARBI R, MCNEISH I A, EL-BAHRAWY M. Ovarian sex cord-stromal tumors: an update on clinical features, molecular changes, and management [J]. Int J Gynecol Cancer, 2021, 31 (2): 161-168.

[2] FULLER P J, LEUNG D, CHU S. Genetics and genomics of ovarian sex cord-stromal tumors [J]. Clin Genet, 2017, 91(2): 285-291.

[3] BIRGERSSON M, INDUKURI R, ANTONSON P, et al. ERβ in granulosa cell tumors and its clinical potential [J]. Endocrinology, 2023, 164(6): bqad063.

[4] JIAO R, LIU Y, GAO H, et al. The anti-oxidant and antitumor properties of plant polysaccharides [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(3): 463-488.

[5] GUO Y, LIU Y, ZHAO S, et al. Oxidative stress-induced FABP5 S-glutathionylation protects against acute lung injury by suppressing inflammation in macrophages [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 7094.

[6] HOU D, LIU Z, XU X, et al. Increased oxidative stress mediates the antitumor effect of PARP inhibition in ovarian cancer [J]. Redox Biol, 2018, 17: 99-111.

[7] VERMES I, HAANEN C, REUTELINGSPERGER C. Flow cytometry of apoptotic cell death [J]. J Immunol Methods, 2000, 243(1/2): 167-190.

[8] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 5080843.

[9] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247.

[10] KAMATA T, KATSUBE K, MICHIKAWA M, et al. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1676(1): 51-62.

[11] KAZANSKAYA O, GLINKA A, DEL BARCO BARRANTES I, et al. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis [J]. Dev Cell, 2004, 7(4): 525-534.

[12] YOON J K, LEE J S. Cellular signaling and biological functions of R-spondins [J]. Cell Signal, 2012, 24(2): 369-377.

[13] BELL S M, SCHREINER C M, WERT S E, et al. R-spondin 2

is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis [J]. Development, 2008, 135(6): 1049-1058.

[14] COUSSY F, LALLEMAND F, VACHER S, et al. Clinical value of R-spondins in triple-negative and metaplastic breast cancers [J]. Br J Cancer, 2017, 116(12): 1595-1603.

[15] CONBOY C B, VÉLEZ-REYES G L, RATHE S K, et al. R-spondins 2 and 3 are overexpressed in a subset of human colon and breast cancers [J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(1): 70-79.

[16] ILMER M, BOILES A R, REGEL I, et al. RSPO2 enhances canonical Wnt signaling to confer stemness-associated traits to susceptible pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 2015, 75 (9): 1883-1896.

[17] CHENG Y, KAWAMURA K, TAKAE S, et al. Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development [J]. FASEB J, 2013, 27(6): 2175-2184.

[18] LI L, JI S Y, YANG J L, et al. Wnt/β-catenin signaling regulates follicular development by modulating the expression of Foxo3a signaling components [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(2): 915-925.

[19] ZHANG D D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. Drug Metab Rev, 2006, 38(4): 769-789.

[20] DE CIAN M C, GREGOIRE E P, LE ROLLE M, et al. R-spondin2 signaling is required for oocyte-driven intercellular communication and follicular growth [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(10): 2856-2871.

[21] ZHOU X, HE Y, LI N, et al. DNA methylation mediated RSPO2 to promote follicular development in mammals [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 653.

[22] KILINC Y B, SARI L, TOPRAK H, et al. Ovarian granulosa cell tumor: a clinicoradiologic series with literature review [J]. Curr Med Imaging, 2021, 17(6): 790-797.

[23] LI J, CHU R, CHEN Z, et al. Progress in the management of ovarian granulosa cell tumor: a review [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2021, 100(10): 1771-1778.

[24] WANG Z, WANG Y, MA X, et al. RSPO2 silence inhibits tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma by ZNRF3/Hedgehog-Gli1 signal pathway [J]. Life Sci, 2021, 282: 119817.

[25] BI Y, ZHANG L, SONG Y, et al. RSPO2-LGR4 exacerbates hepatocellular carcinoma progression *via* activation of Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Gastroenterol Hepatol, 2024, 47 (4): 352-365.

[26] XU Q, XU Z. MiR-196b-5p promotes proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells *via* targeting RSPO2 [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 13393-13402.

[27] ZHANG H, HAN X, WEI B, et al. RSPO2 enhances cell invasion and migration *via* the WNT/β-catenin pathway in human gastric cancer [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 5813 -5824.

[28] PAN R, YU Y, ZHU H, et al. RSPO2 promotes progression of ovarian cancer through dual receptor-mediated FAK/Src signaling activation [J]. iScience, 2022, 25(10): 105184.

[29] YAN H, WANG S, LI Z, et al. RSPO2 suppresses CD36-

mediated apoptosis in oxidized low density lipoprotein-induced macrophages [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 2945–2952.

[30] KLAUNIG J E, KAMENDULIS L M. The role of oxidative stress in carcinogenesis [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 239–267.

[31] CESARATTO L, GRISARD E, COAN M, et al. *BNC2* is a putative tumor suppressor gene in high-grade serous ovarian carcinoma and impacts cell survival after oxidative stress [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2526.

[32] PEI H, YANG Y, CUI L, et al. Bisdemethoxycurcumin inhibits ovarian cancer *via* reducing oxidative stress mediated MMPs expressions [J]. Sci Rep, 2016, 6: 28773.

[33] WANG Q, XUE L, ZHANG X, et al. Autophagy protects ovarian cancer-associated fibroblasts against oxidative stress [J]. Cell Cycle, 2016, 15(10): 1376–1385.

[34] GAO J, ZHAO Y, LI T, et al. The role of PKM2 in the regulation of mitochondrial function: focus on mitochondrial metabolism, oxidative stress, dynamic, and apoptosis. PKM2 in mitochondrial function [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7702681.

[35] FORMAN H J, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease; promise and limitations of antioxidant therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(9): 689–709.

[36] HECK D E, SHAKARJIAN M, KIM H D, et al. Mechanisms of oxidant generation by catalase [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1203: 120–125.

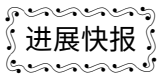
[37] YANG Y, CHEUNG H H, ZHANG C, et al. Melatonin as potential targets for delaying ovarian aging [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(1): 16–28.

[38] SHEN X, YANG L, YAN S, et al. The effect of FFAR1 on pioglitazone-mediated attenuation of palmitic acid-induced oxidative stress and apoptosis in β TC6 cells [J]. Metabolism, 2014, 63(3): 335–351.

[39] XU R, HUANG Y, LU C, et al. Ticlopidine induces cardiotoxicity in zebrafish embryos through AHR-mediated oxidative stress signaling pathway [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 230: 113138.

[40] MUÑOZ-PINEDO C, LÓPEZ-RIVAS A. A role for caspase-8 and TRAIL-R2/DR5 in ER-stress-induced apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 226.

[收稿日期]2024–07–24



ANCA 相关性血管炎实验动物模型研究进展

抗中性粒细胞胞浆抗体(antineutrophil cytoplasmic autoantibody, ANCA)相关性血管炎是一种可累及机体各个系统的自身免疫性疾病,严重时可导致多器官功能障碍,进而威胁患者生命。目前针对 ANCA 相关性血管炎的治疗手段较为局限,深入理解 ANCA 相关性血管炎的发病机制对于寻找新型治疗靶点开发新型治疗手段是很有必要的,而 ANCA 相关性血管炎动物模型在帮助阐述 ANCA 相关性血管炎的发病机制中发挥着至关重要的作用。本文针对 ANCA 相关性血管炎相关动物模型研究进展进行文献综述,主要以 MPO-ANCA 相关性血管炎动物模型、PR3-ANCA 相关性血管炎动物模型及其他 ANCA 相关性血管炎动物模型 3 个分类进行分析总结,提出相应具有代表性的动物模型,并分析各自的优缺点,讨论了 ANCA 相关性血管炎动物模型的一些最新进展,并为寻找 ANCA 相关性血管炎的潜在治疗策略提供新见解。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 452–463. <https://doi.org/10.1002/ame2.12345>)。