

梓醇对顺铂诱导大鼠卵巢颗粒细胞损伤的保护作用

张汝仙, 王花敏, 程学敏, 赵莎, 张晶

邢台市妇幼保健院, 河北 邢台 054000

摘要: **目的** 探讨梓醇对顺铂诱导大鼠卵巢颗粒细胞损伤的保护作用及作用机制。**方法** 收集大鼠卵巢颗粒细胞, 经原代培养后设为对照组、模型组(顺铂 50 nmol/L)和梓醇 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组, 各组细胞按相应方式进行处理。采用 MTT 法测定细胞活力; 流式细胞术 Annexin V/PI 双染法考察细胞凋亡情况; 免疫组化法观察细胞增殖能力, WB 法定量细胞凋亡蛋白的分子水平。**结果** 顺铂可显著抑制卵巢颗粒细胞活力、增殖, 诱导细胞凋亡; 在给予梓醇进行干预后, 大鼠卵巢颗粒细胞活力增强、增殖上调, 细胞凋亡减弱; 经顺铂进行刺激损伤, 卵巢颗粒细胞中 caspase-3、caspase-9 的活化蛋白表达量显著上升, 而不同浓度的梓醇可显著下调细胞中 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 的蛋白表达量。**结论** 梓醇可以改善大鼠细胞活力、提高细胞增殖和抗凋亡能力, 对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞损伤产生明显的保护作用。

关键词: 梓醇; 顺铂; 卵巢颗粒细胞; 凋亡; 保护作用

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)07-1566-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.07.003

Protection of catalpolon on apoptosis of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin

ZHANG Ru-xian, WANG Hua-min, CHENG Xue-min, ZHAO Sha, ZHANG Jing

Xingtai Mother and Children Care Courtyard, Xingtai 054000, China

Abstract: Objective: To investigate protective effects of catalpolon on apoptosis of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin, and explore its mechanisms. **Methods** Rat ovarian granulosa cells were cultured and divided into control group, model group (cisplatin 50 nmol/L), and catalpol (50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$) groups. Then cells in each group were treated in the corresponding ways. Cell viability was determined by MTT method. Apoptosis was detected by double staining flow cytometry Annexin V/PI. Western blotting method was used to detect expressions of apoptosis related protein. **Results** Cisplatin could significantly decrease the viability of rat ovarian granulosa cells and induce apoptosis. After treated by catalpol, the activity of ovarian granulosa cells was increased, proliferation was up-regulated, and apoptosis was decreased. After treated by cisplatin, the expressions of the active form of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 protein were significantly increased. Catalpol could significantly decrease the expressions of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 in cells. **Conclusion** The addition of catalpol to rat ovarian granulosa cells can significantly change the anti-apoptotic and anti-oxidative ability, and play a protective role in the apoptosis induced by cisplatin. Catalpol can improve cell viability, enhance cell proliferation and anti apoptosis ability, and protect apoptosis of ovarian granulosa cells in rats induced by cisplatin.

Key words: catalpol; cisplatin; ovarian granulosa cells; apoptosis; protection

颗粒细胞作为卵巢中主要功能细胞, 在卵泡生长发育过程中发挥着关键的作用。研究表明, 卵巢颗粒细胞正常的增殖、分化在卵泡一系列正常生理功能形成、激素分泌等各个机能的发挥中起着决定作用^[1]。因此, 卵巢颗粒细胞的凋亡损伤可严重扰乱卵巢正常生理功能, 将进一步导致卵巢早衰这一

病变的发生、发展。当前而言, 临床常采用抗癌药物对患者进行化疗诊治, 但当其在应用过程中, 不可避免地对其他正常细胞产生毒性损伤作用。通过该毒性损伤即可破坏健康卵巢颗粒细胞的结构、功能, 诱导凋亡进程, 最终形成不可逆的卵巢早衰^[2]。顺铂作为目前临床常用的化疗药物, 已被证明在多

收稿日期: 2018-06-05

作者简介: 张汝仙(1982—), 女, 河北邢台人, 主治医师, 硕士, 研究方向为生殖内分泌。E-mail: zhangruxian001@sina.com

种癌症治疗过程中均可表现出优良的抗肿瘤活性,但另有研究表明顺铂可对卵巢产生损伤作用^[3]。国内外研究揭示,顺铂可通过降低人源性卵巢颗粒细胞活力,活化凋亡相关蛋白,促进细胞凋亡,诱发卵巢早衰^[4-5]。目前西医激素疗法在该病治疗方面疗效短、易复发、不良反应明显^[6],而中医药主张“阴阳平衡”,效果好、毒副作用低、优势明显。因此,寻找更多对卵巢颗粒细胞凋亡具有保护作用的中药成分,在改善因顺铂抗癌治疗而产生的卵巢损伤过程中将发挥重大意义。

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根,甘、寒,归心、肝、肾经,具有清热养血、养阴生津等功效^[7]。地黄药用历史悠久、安全有效,始载于《神农本草经》,其代表性复方六味地黄丸常替代雌激素用于临床卵巢早衰患者的治疗。梓醇作为地黄中分离出的环烯醚萜苷类代表性化合物,具有良好的抗脑缺血损伤^[8-9]、抗老年痴呆^[10-11]、抗衰老^[12]、抗炎^[13-14]和抗肿瘤^[15-16]等药理活性,而地黄中代表性成分梓醇对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞损伤是否亦具有保护作用未见报道。因此,本实验拟通过检测细胞活力、细胞凋亡来考察梓醇对顺铂损伤后卵巢颗粒细胞的保护作用,为地黄的传统疗效补充实验数据,为梓醇在抗癌药物治疗过程中改善卵巢早衰提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

UV-3600Plus 分光光度计(岛津企业管理有限公司);垂直电泳系统(美国伯乐公司);细胞孵育箱箱(日本 Sanyo 公司);DW-86L30 超低温冰箱(杭州艾普仪器设备有限公司);流式细胞仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MS II Minishaker 涡旋振荡器(德国 IKA 公司);GS-15R 低温高速离心机(美国 Beckman 公司);AUY120 微量分析天平(日本岛津公司);HNY-200B 台式全温度恒温高速培养摇床(北京傲松欣实验室设备有限公司);MLS-3750MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅(日本 Sanyo 公司);Milli-RO Plus 超纯水仪器(美国 Millipore 公司)。

注射用顺铂(规格 10 mg/支),齐鲁制药有限公司;梓醇(批号 Z-005-140801,质量分数>98%),成都瑞芬思生物科技有限公司;胰蛋白酶(货号 1585686),美国 Gibico 公司;青霉素钠/硫酸链霉素(货号 13091),美国 Sciencell 公司;胎牛血清

(货号 A97E00G),美国 Gemini 公司;噻唑蓝(MTT,货号 M2128),美国 Sigma 公司;细胞浆蛋白抽提试剂盒(货号 KGP150),南京凯基生物科技发展有限公司;Western blotting 相关抗体,如 caspase-3(货号 9662)、cleaved-caspase-3(货号 9661)、caspase-9(货号 9502)、cleaved-caspase-9(货号 9505),美国 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体(批号 AF1186),上海碧云天生物技术有限公司;AnnexinV/PI 细胞凋亡试剂盒(货号 KGA108),南京凯基生物科技发展有限公司;Ham F12 培养基,北京清大天一生物技术有限公司;DMEM 培养基,美国 HyClone 公司;其他试剂(分析纯)购于北京试剂厂。

1.2 实验动物

健康雌性 Wistar 大鼠,SPF 级,体质量 180~200 g,25 只,12 周龄,购自北京市维通利华实验动物中心,实验动物许可证号 SCXK(京)2015-0001。适应性喂养 3 d,保持自由饮水、进食,24 h 昼夜循环。所有动物实验操作严格按照实验动物伦理要求和管理条例进行。

1.3 卵巢颗粒细胞分离培养与分组给药

每日按实验操作规范对正常雌性大鼠进行阴道细胞涂片,筛选出处于动情前期的大鼠。脱颈椎处死大鼠后,将其迅速转移、浸泡至 75%酒精溶液中,消毒完毕后将大鼠从酒精中取出,并转移置入超净实验台中。解剖大鼠,将其卵巢切除、取出,用预先配制好的 Hanks 液对卵巢组织进行严格清理,将各脂肪组织、系膜组织从卵巢上面剔除,吸干表面水分。将卵巢转移至解剖显微镜视野下方,在微观条件下对卵巢中的卵泡进行分离操作,并对卵泡继续进行清洗。待多次清洗完毕,谨慎地将卵泡表面撕开,用新鲜 Hanks 液将卵泡内容物一并冲洗至其中,随后进行滤过,收集滤液,离心(800×g,3 次),弃去上清液,收集卵巢颗粒细胞。确保整个实验在无菌条件下进行。

预先配制好含 10% FBS、P/S 的 DMEM/F12 (1:1)培养基,对收集的颗粒细胞进行稀释,将卵巢颗粒细胞稀释成 5×10^5 /mL。取出无菌的细胞培养板,随后将稀释后的细胞接种于其中,在各个孔中植入细胞悬液 1 mL,最后将培养板置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞孵育箱中进行恒湿培养。取卵巢颗粒细胞设为对照组、模型组(顺铂 50 nmol/L)和梓醇 50、100、200 μmol/L 组,各组先给予对应浓度的梓

醇预处理, 1 h 后加入顺铂进行损伤刺激, 未加入梓醇或顺铂的细胞则平行给予等体积无血清培养基。

1.4 MTT 法检测卵巢颗粒细胞生存活力

用细胞培养基将卵巢颗粒细胞按比列稀释成相应浓度, 取出无菌的 96 孔板, 将 100 μL 细胞悬液植入板内各孔, 并置入孵育箱进行培养。24 h 后每孔更换成无血清培养基 90 μL , 加入 25、50、100 nmol/L 顺铂 10 μL 进行刺激, 每组 5 个复孔。待孵育完成从培养箱中取出 96 孔板, 按照 20 μL /孔的量在各组中滴加 MTT 溶液, 随后将 96 孔板放入培养箱中继续孵育 4 h, 最后将孔内 MTT 溶液更替为 150 μL DMSO, 待孔内物质完全溶解后迅速转移至酶标仪上, 进行吸光度值(A)检测, 波长设置为 570 nm。根据实验结果筛选最佳顺铂造模浓度。

方法同上, 24 h 后每孔换成无血清培养基 80 μL , 将预先稀释好的 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇 10 μL 分别加入每孔, 并进行孵育, 1 h 后加入最佳浓度的顺铂 10 μL 损伤刺激, 每组 5 个复孔。待孵育完成从培养箱中取出 96 孔板, 按照 20 μL /孔的量在各组中滴加 MTT 溶液, 随后将 96 孔板放入培养箱中继续孵育 4 h, 最后将孔内 MTT 溶液更替为 150 μL DMSO, 待孔内物质完全溶解后迅速转移至酶标仪上进行 A 值检测, 波长设置为 570 nm。计算各组细胞相对活力。

相对活力 = (各组平均 A 值 - 调零孔 A 值) / (模型组平均 A 值 - 调零孔 A 值)

1.5 细胞凋亡情况检测

按比列将卵巢颗粒细胞稀释至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 将细胞悬液 2 mL 分别滴加至无菌 6 孔细胞培养板, 并将培养板置入孵育箱内进行培养。24 h 后每孔更换成无血清培养基 1.6 mL, 将预先稀释好的 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇 200 μL 分别加入每孔, 并进行孵育, 1 h 加入 50 nmol/L 顺铂 200 μL 刺激。孵育结束后收集 6 孔板中的细胞, 在室温避光条件下使用 Annexin V-FITC 和 PI, 待避光孵育后, 1 h 内采用流式细胞仪在 488 nm 激发波长、530 nm 发射波长下检测。以右下象限及右上象限为凋亡细胞, 计算细胞凋亡率。

凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数

1.6 细胞增殖相关因子表达检测

按比例将卵巢颗粒细胞稀释至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 将细胞悬液 2 mL 分别滴加至含无菌盖玻片的 6 孔板中, 并将培养板置入孵育箱内进行培养 24 h。随后

每孔更换成无血清培养基 1.6 mL, 将预先稀释好的 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇 200 μL 分别加入每孔, 并进行孵育, 1 h 加入 50 nmol/L 顺铂 200 μL 刺激。孵育结束取出盖玻片, PBS 清洗后用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 0.3% Triton X-100 孵育 20 min; 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, 经漂洗后加入 1:1 000 稀释的抗体进行孵育 (4 $^\circ\text{C}$, 过夜)。次日清洗后经二抗孵育 1 h, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 min, 显色剂显色后观察、拍摄, 并采用 Image-Pro plus 6.0 进行阳性染色平均 A 值考察。

1.7 凋亡相关蛋白表达量测定

细胞培养及给药方式同上, 待孵育完成后从 6 孔板中获取细胞并抽提其中蛋白。经 BCA 法进行蛋白浓度测定, 随后在蛋白样品中加入 $5 \times$ 上样缓冲液进行稀释, 采用 95 $^\circ\text{C}$ 条件对样品煮沸 5 min, 根据蛋白浓度计算上样体积。将样品蛋白加入 SDS-PAGE 凝胶垂直电泳、恒压转膜。5% BSA 封闭 (1 h, 室温), 经漂洗后加入 1:1 000 稀释的抗体进行孵育 (4 $^\circ\text{C}$, 过夜)。次日洗膜后加入二抗, 置于摇床, 室温孵育 2 h, 完毕, ECL 发光液孵育 1 min 进行显色, 采用成像仪检测各条带灰度值。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 顺铂致卵巢颗粒细胞损伤模型的浓度筛选

与未加顺铂组比较, 加入 25、50、100 nmol/L 顺铂均可明显抑制卵巢颗粒细胞生存活力 ($P < 0.05$ 、 0.01)。其中以 50、100 nmol/L 顺铂抑制作用最强, 而该浓度间差异不大, 因此后续实验采用 50 nmol/L 顺铂对卵巢颗粒细胞进行损伤造模。见表 1。

表 1 不同浓度顺铂对卵巢颗粒细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Table 1 Effect of cisplatin at different concentrations on the activity of ovarian granule cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(nmol·L ⁻¹)	A 值
对照	—	0.86 ± 0.11
顺铂	25	0.65 ± 0.05 [#]
	50	0.48 ± 0.06 ^{##}
	100	20.24 ± 2.44 ^{###}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group

2.2 梓醇对顺铂损伤后卵巢颗粒细胞活力的影响

与对照组比较,模型组卵巢颗粒细胞活力被顺铂明显抑制 ($P < 0.01$),随着刺激时间延长其作用愈发强烈。对卵巢颗粒细胞采用不同浓度梓醇预处理 1 h 后,再加入 50 nmol/L 顺铂进行处理 23、47、71 h, MTT 法检测细胞活力,见表 2。结果表明,

各给药组中卵巢颗粒细胞活力均有所增强,与模型组比较差异明显 ($P < 0.05、0.01$)。不同浓度梓醇处理 24、48、72 h 后细胞活力分别得到相应提升,其中梓醇浓度以 200 $\mu\text{mol/L}$ 效果最佳,处理时间以 72 h 效果最强。提示梓醇对顺铂损伤后卵巢颗粒细胞活力改善作用具有明显的浓度梯度、时间相关性。

表 2 梓醇对顺铂处理的卵巢颗粒细胞相对活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of catalpol on relative activity of ovarian granule cells damaged by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	相对活力/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	193.02 ± 26.65	243.81 ± 23.98	260.69 ± 26.0
模型	—	100.00 ± 18.16 ^{##}	100.00 ± 14.55 ^{##}	100.00 ± 16.78 ^{##}
梓醇	50	95.79 ± 8.40	130.43 ± 9.09 [*]	154.97 ± 23.11 [*]
	100	149.33 ± 19.19 [*]	128.04 ± 15.83 [*]	190.83 ± 32.50 [*]
	200	176.42 ± 12.10 ^{**}	194.73 ± 18.32 ^{**}	210.5 ± 30.27 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.3 梓醇对顺铂损伤后大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组卵巢颗粒细胞凋亡情况严峻 ($P < 0.01$),加入 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇进行干预后,细胞凋亡情况得到改善。在梓醇干预处理 24 h 后,梓醇各浓度组中细胞凋亡率与模型组比较差异明显 ($P < 0.05、0.01$),其中梓醇浓度以 200 $\mu\text{mol/L}$ 效果最佳。结果表明梓醇可明显改善顺铂诱导卵巢颗粒细胞凋亡,且呈浓度相关性。见表 3、图 1。

表 3 梓醇对卵巢颗粒细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of catalpol on the apoptosis of ovarian granule cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	—	13.86 ± 1.49
模型	—	53.48 ± 4.69 ^{##}
梓醇	50	47.34 ± 3.62
	100	34.55 ± 4.51 [*]
	200	20.24 ± 2.44 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

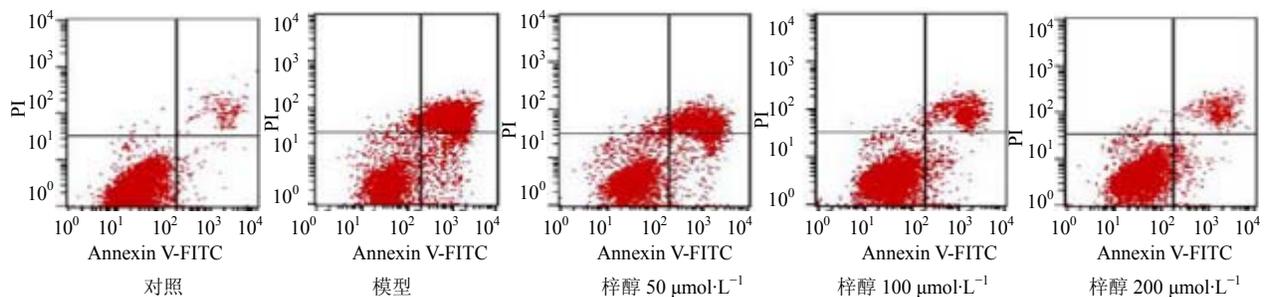


图 1 梓醇对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞凋亡情况的影响

Fig. 1 Effect of catalpol on the apoptosis of ovarian granule cells induced by cisplatin

2.4 梓醇对顺铂损伤后卵巢颗粒细胞 Ki67 表达的影响

与对照组比较,模型中细胞 Ki67 表达显著减

少 ($P < 0.01$),加入不同浓度梓醇进行干预后, Ki67 表达减少增加。在梓醇干预处理 24 h 后,与模型组比较, 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 梓醇均可明显促进 Ki67

表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中梓醇浓度以 $200 \mu\text{mol/L}$ 效果最佳。结果表明梓醇可明显改善顺铂对卵巢颗粒

粒细胞的增殖抑制作用, 且呈浓度相关性。见图 2、表 4。

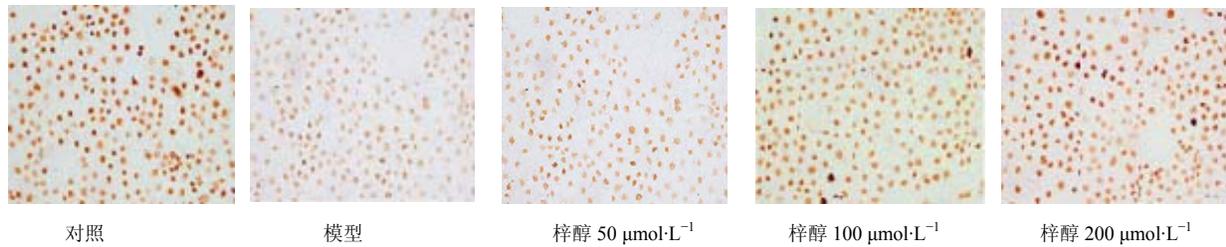


图 2 梓醇对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞 Ki67 表达的影响

Fig. 2 Effect of catalpol on the Ki67 expression of ovarian granule cells induced by cisplatin

表 4 梓醇对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞 Ki67 表达的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of catalpol on the Ki67 expression of ovarian granule cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Ki67 (与对照组倍数比)
对照	—	1.00 ± 0.10
模型	—	$0.38 \pm 0.06^{##}$
梓醇	50	$0.59 \pm 0.09^*$
	100	$0.73 \pm 0.12^*$
	200	$0.81 \pm 0.12^{**}$

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

2.5 梓醇抑制顺铂损伤后卵巢颗粒细胞中 caspase-3 与 caspase-9 蛋白活化的影响

与对照组比较, 模型组中 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达量显著增加。随后加入不同浓度梓醇进行干预处理后, 各组卵巢颗粒细胞中 cleaved caspase-3 表达量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中以 $200 \mu\text{mol/L}$ 梓醇抑制作用最强; 与模型组比较, 加入不同浓度梓醇进行干预处理后, 各组卵巢颗粒细胞中 cleaved caspase-9 表达量明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中以 100 、 $200 \mu\text{mol/L}$ 梓醇抑制作用最强。表明梓醇可有效抑制凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 的活化, 抑制顺铂诱导的凋亡进程, 从而保护卵巢颗粒细胞。见图 3、表 5。

3 讨论

正常人体生殖功能的形成过程中离不开卵泡和颗粒细胞, 并且卵巢颗粒细胞所分泌的雌激素对卵细胞的生存具有关键意义, 同时该细胞还可释放出调节卵巢功能的介质, 如抑制素、卵母细胞成熟抑

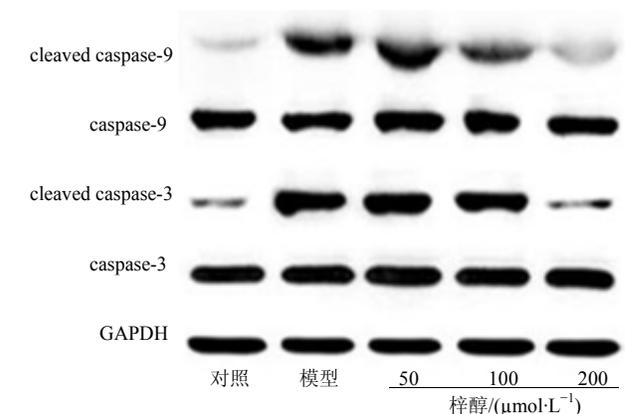


图 3 梓醇对顺铂诱导卵巢颗粒细胞中凋亡蛋白活化的作用
 Fig. 3 Effect of catalpol on the apoptin-excitatinin ovarian granule cells induced by cisplatin

表 5 梓醇对顺铂诱导卵巢颗粒细胞中凋亡蛋白活化的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of catalpol on the apoptin-excitatinin ovarian granule cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	c-caspase9/caspase9	c-caspase3/caspase3
对照	—	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.10
模型	—	$3.20 \pm 0.38^{##}$	$2.55 \pm 0.25^{##}$
梓醇	50	$2.44 \pm 0.26^*$	$2.04 \pm 0.09^*$
	100	$1.58 \pm 0.25^{**}$	$1.90 \pm 0.09^*$
	200	$1.40 \pm 0.16^*$	$1.24 \pm 0.08^{**}$

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

制因子等。随着各种因素的推动, 卵巢功能损伤逐步加剧, 继而促使其中颗粒细胞损伤、凋亡增加, 并伴随促性腺激素释放增加, 雌激素合成能力不足, 表现出潮热多汗、面部潮红等围绝经期综合症的症

状^[17]。然而随着肿瘤的发病率与日俱增,因化疗而诱发的卵巢功能衰退现象亦愈发明显,因化疗诱发的细胞凋亡在卵巢早衰发生、发展过程中起到关键作用。众所周知,细胞凋亡是指细胞在基因调控下,按照一定程序进行细胞死亡的正常生理现象。细胞凋亡在保持正常生理机能方面具有极为重要的意义,可维持着正常新陈代谢功能,而细胞凋亡程度异常将可能对机体产生一定程度的危害作用。大量研究发现,卵巢颗粒细胞凋亡易导致卵泡闭锁,继而加剧卵巢早衰^[17],因此,本实验拟围绕抗凋亡机制,探讨梓醇改善顺铂诱导卵巢颗粒细胞损伤,缓解卵巢早衰的作用。

梓醇为地黄中环烯醚萜苷类化合物,是地黄的质量控制指标,具有广泛药理活性^[7]。梓醇可通过调控 NF- κ B 通路、Ach 通路以及介导 PI3K/AKT、BDNF/TrkB、JAK2/STAT3、TGF- β /Smad 等信号传导^[18],在神经系统性疾病、心血管疾病、肿瘤疾病、糖尿病等疾病中均表现出良好的药理学活性^[19],因此实验拟对梓醇的药理学活性进一步挖掘。本实验研究发现,顺铂可刺激损伤卵巢颗粒细胞,抑制细胞活力,其中以 50 nmol 顺铂的诱导作用最优,因此采用该浓度进行损伤造模。然而在各类研究梓醇抗凋亡的体外实验中^[20-21],常采用梓醇给药浓度为 25、50、100、200、500 μ mol/L,因此本实验拟给予 50、100、200 nmol/L 梓醇进行干预,考察梓醇对顺铂致卵巢颗粒细胞损伤的保护作用。实验结果发现,不同浓度梓醇可逆转顺铂对卵巢颗粒细胞的毒性作用,浓度相关性地提升卵巢颗粒细胞的相对活力,缓解顺铂致卵巢颗粒细胞凋亡。Ki67 作为能识别存在于增殖细胞核基质内与细胞增殖相关的核蛋白,在细胞活动期表达(G1、S、G2 和 M 期)表达,是细胞中重要的增殖标志物^[22]。本实验中,顺铂抑制细胞中 Ki67 表达,而不同浓度梓醇可上调 Ki67 的表达。由此表明,梓醇在顺铂诱导的卵巢颗粒细胞毒性损伤中具有促进细胞增殖、提升其生存活力,有效抑制细胞凋亡等功能,继而发挥细胞保护作用,因此在改善顺铂引发卵巢早衰方面具有关键意义。

研究表明,在细胞凋亡反应进程存在多种参与因子,而半胱天冬酶(caspase)家族蛋白被证明主要参与哺乳动物细胞凋亡,因此该类蛋白被认为是诱发凋亡的关键效应物^[23]。目前已知的 caspase 蛋白约有 10 多种,在细胞凋亡中 caspase-9 受各类因

子激活,而 caspase-3 是凋亡级联反应下游的关键酶,受 caspase-9 调控激活并最终执行凋亡程序^[24]。通过免疫印迹法发现,顺铂刺激卵巢颗粒细胞后可明显增加 caspase-3 活性形式(cleaved caspase-3)的表达水平,同时亦可上调 caspase-9 活性形式(cleaved caspase-9)的表达量。而加入梓醇干预后,卵巢颗粒细胞中 caspase-3 和 caspase-9 的活化水平均得到明显的下调。由此表明,顺铂可通过介导 caspase-9、caspase-3 活化,继而促进卵巢颗粒细胞凋亡;而梓醇可通过抑制卵巢颗粒细胞内 caspase-3、caspase-9 的活性,从而发挥其抗凋亡能力,对顺铂诱导大鼠卵巢颗粒细胞凋亡损伤产生明显的保护作用。

综上所述,梓醇可有效抑制顺铂致颗粒细胞中凋亡蛋白分子的活化,缓解细胞凋亡,提升细胞活力、促进细胞增殖,从而对卵巢颗粒细胞起到有效的保护作用,降低临床采用顺铂治疗肿瘤过程中导致的卵巢早衰风险。

参考文献

- [1] Jin H, Won M, Shin E, *et al.* EGR2 is a gonadotropin-induced survival factor that controls the expression of IER3 in ovarian granulosa cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 877-882.
- [2] Dzafic E, Stimpfel M, Virant-Klun I. Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(10): 1255-1261.
- [3] 艾浩,牛建昭,薛晓鸥,等.顺铂致小鼠卵巢功能早衰肝肾阴虚证机制研究[J].*北京中医药大学学报*, 2006, 29(6): 401-403.
- [4] Sanchez A M, Giorgione V, Viganò P, *et al.* Treatment with anticancer agents induces dysregulation of specific Wnt signaling pathways in human ovarian luteinized granulosa cells *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 136(1): 183-192.
- [5] Sun L, Li D, Song K, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2552.
- [6] 石彩歌.中西医结合治疗卵巢早衰的临床观察[J].*中医临床研究*, 2011, 03(15): 34-35.
- [7] 中国药典[S].一部.2010: 115-116.
- [8] Li D Q, Duan Y L, Bao Y M, *et al.* Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils [J]. *Neurosci Res*, 2004, 50(2): 169-177.

- [9] Li D Q, Bao Y M, Zhao J J, *et al.* Neuroprotective properties of catalpol in transient global cerebral ischemia in gerbils: dose-response, therapeutic time-window and long-term efficacy [J]. *Brain Res*, 2004, 1029(2): 179-185.
- [10] 石桂芳, 王贺双, 毛玉荣, 等. 梓醇对鱼藤酮所致小鼠脑线粒体损伤的保护作用 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(29): 5661-5664.
- [11] Wang Z, Liu Q, Zhang R. Catalpol ameliorates beta amyloid-induced degeneration of cholinergic neurons by elevating brain-derived neurotrophic factors [J]. *Neuroscience*, 2009, 163(4): 1363-1372.
- [12] Zhang X, Jin C, Li Y, *et al.* Catalpol improves cholinergic function and reduces inflammatory cytokines in the senescent mice induced by *D*-galactose [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58(7): 50-55.
- [13] Choi H J, Jang H J, Chung T W, *et al.* Catalpol suppresses advanced glycation end-products-induced inflammatory responses through inhibition of reactive oxygen species in human monocytic THP-1 cells [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86(1): 19-28.
- [14] Bi J, Jiang B, Zorn A, *et al.* Catalpol inhibits LPS plus IFN- γ -induced inflammatory response in astrocytes primary cultures [J]. *Toxicol in Vitro*, 2013, 27(2): 543-550.
- [15] Pungitore C R, León L G, García C, *et al.* Novel antiproliferative analogs of the Taq DNA polymerase inhibitor catalpol [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(5): 1332-1335.
- [16] Gao N, Tian J X, Shang Y H, *et al.* Catalpol suppresses proliferation and facilitates apoptosis of OVCAR-3 ovarian cancer cells through upregulating microRNA-200 and downregulating MMP-2 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 19394-19405.
- [17] 马丽灵, 阮祥燕. 卵巢早衰病因及治疗研究进展 [J]. 医学综述, 2008, 14(23): 3557-3560.
- [18] 王静欢, 邹利, 万东, 等. 梓醇多效性相关信号通路研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(9): 1189-1194.
- [19] 董 熠, 陈长勋. 梓醇药理作用的研究进展 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 1047-1051.
- [20] 刘艳茹. 梓醇预处理对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [21] 刘晨阳, 白 宽, 于顾然. 梓醇对纤维状 A β 1-42 诱导的 bEnd.3 细胞凋亡及过度自噬的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 108-113.
- [22] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [23] Meral O, Ozgur E, Kismali G, *et al.* GSM-like radiofrequency exposure induces apoptosis via caspase-dependent pathway in infant rabbits [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2016, 117(11): 672-676.
- [24] 金 娟, 马林沁, 邹国良, 等. 参芪益心方对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(2): 151-155.