

实验研究

顺铂诱导颗粒细胞损伤及二仙汤含药血清
保护颗粒细胞的作用机制杨蕾¹ 饶晨晨² 孙丽萍² 王燕霞³ 赵丕文² 高文雅² 牛建昭² 陶仕英² 杨阳²

(1 北京中医药大学东方医院,北京,100078; 2 北京中医药大学,北京,100029; 3 北京中医药大学东直门医院,北京,100007)

摘要 目的:探讨顺铂对卵巢颗粒细胞的影响及二仙汤含药血清改善大鼠卵巢颗粒细胞损伤的作用机制。方法:选取大鼠原代卵巢颗粒细胞体外培养及顺铂处理的方法,将顺铂处理后卵巢颗粒细胞随机分为:cDDP组、cDDP+雌二醇组、cDDP+二仙汤组,另设正常组,加入相应药理血清连续培养48 h。采用Western Blotting法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞bcl-2、bax蛋白表达;RT-PCR法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞bcl-2、bax mRNA表达。结果:与正常对照组比较,cDDP组bax mRNA及蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与cDDP组比较,CDDP+雌二醇组及cDDP+二仙汤组Bax mRNA及蛋白表达均下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组比较,cDDP组bcl-2 mRNA水平及蛋白表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与cDDP组比较,CDDP+雌二醇组及cDDP+二仙汤组bcl-2 mRNA转录及蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:二仙汤能够抑制cDDP诱导的卵巢颗粒细胞损伤,其作用机制可能与调节bcl-2/bax平衡有关。

关键词 二仙汤;顺铂;含药血清;卵巢颗粒细胞;卵巢功能低下;不孕;B细胞淋巴瘤2蛋白家族

Cisplatin Induced Granulosa Cells Damage and the Mechanism of Erxian Decoction in Protection of Granulosa CellYang Lei¹, Rao Chenchen², Sun Liping³, Wang Yanxia⁴, Zhao Piwen³, Niu Jianzhao², Tao Shiyang², Yang Yang²

(1 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China)

Abstract Objective: To explore the effects of cisplatin on ovarian granulosa cells and the mechanism of Erxian decoction containing serum improving the damage of ovarian granulosa cells in rats. **Methods:** The cisplatin-treated cells by in vitro culture and cisplatin treatment of rat primary ovarian granulosa cells were randomly divided into a CDDP group, CDDP + estradiol group and CDDP + Erxian Decoction group. Normal serum group was added to the corresponding pharmacological serum for 48 h. The expression levels of Bcl-2 and Bax in ovarian granulosa cells of rats in each group were detected by Western Blotting method, and the expression levels of Bcl-2 and Bax in ovarian granulosa cells of rats in each group were detected by RT-PCR. **Results:** Compared with the normal control group, the expression level of Bax gene and protein in CDDP group was up-regulated, with significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with CDDP group, the expression of Bax gene and protein in CDDP + estradiol group and CDDP + Erxian Decoction group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the expression of Bcl-2 in CDDP group decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with CDDP group, the transcription level of bcl-2 gene in CDDP + estradiol group and CDDP + Erxian Decoction group increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Erxian Decoction can effectively inhibit the damage of ovarian granulosa cells induced by CDDP, and its mechanism may be related to the regulation of bcl-2/bax balance.

Key Words Erxian Decoction; Cisplatin; Serum containing Chinese medicine; Ovarian granulosa cells; Ovarian dysfunction; Infertility; B-cell lymphoma 2 protein family; Experimental study

中图分类号:R289.4 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.07.009

顺铂(Cis-dichlorodiamine Platinum, cDDP)作为一线化疗药物已被广泛应用于临床,cDDP的作用机制主要是通过诱导细胞凋亡程序,杀死肿瘤细胞;在

此过程中死亡受体通路以及多种蛋白质参与其中,其中包括JNK信号通路、p53和Bcl-2家族蛋白等^[1]。研究发现化疗药物在治疗疾病的过程中不仅

基金项目:国家自然科学基金项目(81273887);北京中医药大学科研发展基金项目(2017-zxfzj-005)

作者简介:杨蕾(1990.12—),女,博士研究生,研究方向:风湿免疫病、代谢病的中医临床及基础研究,E-mail:1171935855@qq.com

通信作者:陶仕英(1970.09—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治女性生殖系统疾病,E-mail:taoshying1970@163.com

能够杀死部分肿瘤细胞,同时也会对正常组织细胞产生细胞毒作用^[2],而 cDDP 引起的女性生殖系统损害已成为医学界研究的热点之一^[3]。有报道指出,cDDP 能够引起女性卵巢储备功能下降(Diminished Ovarian Reserve,DOR),而 DOR 是形成卵巢早衰(Premature Ovarian Failure,POF)的一个重要诱因^[4]。李艳梅等^[5]发现,cDDP 会引起女性患者出现月经紊乱、闭经、甚至 POF。因此,在治疗肿瘤的同时保护卵巢功能、减少卵巢损伤尤为重要。二仙汤对围绝经期综合征的疗效为临床所公认,其治疗效果得到国内外中医界的认同^[6-12]。相关动物实验采用石蜡切片及 mallory 染色的方法,观察二仙汤对 cDDP 模型小鼠的保护机制,结果显示,二仙汤能够有效改善模型小鼠卵巢功能,抑制氧化应激^[7]。

本课题组前期研究发现二仙汤含药血清能够提高 cDDP 处理后颗粒细胞中 E₂、P 表达,能够降低卵巢颗粒细胞凋亡率,同时二仙汤含药血清能够上调卵巢颗粒细胞中 PI3k、p-Akt、Akt 的表达,通过调节 PI3k/Akt 信号通路途径,抑制卵巢颗粒细胞凋亡^[8]。本实验继续建立 cDDP 处理卵巢颗粒细胞模型,通过观察各组药物干预后 bcl-2/bax mRNA 基因和蛋白表达情况,进一步探究二仙汤含药血清保护卵巢颗粒细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 选取 SPF 级雌性 SD 大鼠(22~24 d)10 只,体质量(60±10)g,购自(北京)斯贝福实验动物科技有限公司,使用许可证:SCXK(京)2011~0004。自由饮水,12 h/d 光照,适应性喂养 1 周后,常规灌胃,制备药理血清。本实验获北京中医药大学东方医院动物实验伦理委员会批准(No. BUCM-20160105081995)。10% 水合氯醛麻醉处死后,立即置于 75% 乙醇中浸泡 3 min,于超净台下取双侧卵巢,用预冷的 Hank 液清洗 3 次,将双侧卵巢置于无血清培养基中,刺破卵巢收集颗粒细胞。

1.1.2 药物 二仙汤组方,淫羊藿 9 g、巴戟天 6 g、当归 10 g、黄柏 15 g、仙茅 12 g、知母 10 g。由北京中医药大学东直门医院提供,根据颗粒/饮片固有比计算,每只鼠用量:7.5 kg/d。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,国药准字 H37021358)、戊酸雌二醇片(拜耳医药有限公司,生产批号: B01007102)均购自北京中医药大学东直门医院,戊酸雌二醇片每只大鼠用量:0.009 mg/kg。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM/F12 培养基(美国 Hy-

clone 公司,生产批号:SH-30023);胎牛血清(美国 Hyclone 公司,生产批号:1300510);孕马血清促性腺激素(以色列 Prospec 公司,生产批号:hor-272);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:20160627)、RIPA 蛋白裂解液(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:20160307)、SDS-PAGE 分离胶缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:S1051)、浓缩胶缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,生产批号:S1052)蛋白相对分子质量 Marker(美国 Thermo 公司,生产批号:00332484);ECL 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司,生产批号:P1010);二抗 Anti-RabbitIgG/HRP(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:si30086)和 Anti-MouseIgG/HRP(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:si30086);RNA 提取试剂盒: Zymo Quick-RNATMMicroPrep (Catalog Nos. R1050&R1051);反转录试剂盒: M-MLV First Strand RT Kit(目录号:RT03);PCR 酶: qPCR Master Mix(Catalog: DBI-2043);bax、bcl-2 抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:SC1309,SC1662)。

CO₂ 培养箱(MCO-20AIC,日本);倒置显微镜(TS100,日本);低温离心机(3K15,美国);多功能荧光酶标仪(SAFIRE2,瑞士)。

表 1 引物设计及合成情况

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
bcl-2	上游引物 Atggcgcaagccgggagaac	100
	下游引物 Gacgtcctggcagcgtgttc	
bax	上游引物 Tgggtggatgggtcaggtcc	100
	下游引物 Gctcagcgtcctcccaagt	
GAPDH	上游引物 Cagtgcacgcctctctcat	96
	下游引物 Agggggccatccacgtcttc	

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制备 将卵巢颗粒细胞以 5×10⁵ 接种于 96 孔板中,待细胞生长至底壁的 75%~80% 时,将细胞分为 4 组:正常组,cDDP 组,cDDP+雌二醇组,cDDP+二仙汤组。除正常组外,其余各组每孔加 200 μL(终浓度为 2.5 μg/mL)cDDP 进行处理,37℃,5% CO₂ 细胞培养箱,培养 12 h。

参照文献^[21]血清制备方法,将 SD 大鼠随机分为:正常组、雌二醇组、二仙汤组,每组灌胃 3 d,于第 4 天 7 点末次灌胃 1 h 后,采用心脏取血方式,全血静置 2 h,离心提取血清,滤膜无菌过滤,-20℃保存。

1.2.2 给药方法 cDDP 诱导 12 h 后,各组进行给药干预,正常组及 cDDP 组弃培养基,每孔均加入正

常血清 200 μL ; cDDP + 雌二醇组及 cDDP + 二仙汤组弃培养基, 依次加入各组治疗雌二醇、二仙汤含药血清 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。

1.2.3 检测指标与方法 蛋白印迹法 (Western Blotting) 检测各组颗粒细胞中 bax、bcl-2 蛋白表达: 分别提取各组卵巢颗粒细胞, 加入蛋白裂解液, 提取总蛋白。经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜), 一抗、二抗孵育后, 使用发光底物进行显影, 对 bax、bcl-2 蛋白进行目的条带定性和定量分析, 处理图像, 分析目标条带。

RT-PCR 检测各组卵巢颗粒细胞中 bax、bcl-2 mRNA 表达: 提取各组大鼠卵巢颗粒细胞, 加入 Trizol 裂解后提取总 RNA, 加 dNTP、MMLV 和 Oligo (dT) 15 等进行逆转录合成 cDNA 第一链, 加入 PCR 引物扩增目的基因, 经琼脂糖凝胶电泳, 对 bax、bcl-2 的目的条带进行分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 各组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时, 则采用 Tamhane's T2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢颗粒细胞 bcl-2、bax 蛋白表达比较 与正常组比较, cDDP 处理后各组 bcl-2 表达明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 cDDP 组比较, cDDP + 雌二醇组 bcl-2 蛋白表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组比较, cDDP 处理后各组 bax 蛋白表达均上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 cDDP 组比较, cDDP + 雌二醇组、cDDP + 二仙汤组 bax 蛋白表达减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 1、2。

表 2 各组大鼠卵巢颗粒细胞中 bcl-2/bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	bcl-2	bax
正常组 ($n=6$)	2.22 $\pm$ 0.30	0.62 $\pm$ 0.02
cDDP 组 ($n=6$)	0.60 $\pm$ 0.20 *	1.55 $\pm$ 0.14 *
cDDP + 雌二醇组 ($n=6$)	1.57 $\pm$ 0.63 * Δ	0.77 $\pm$ 0.20 * Δ
cDDP + 二仙汤组 ($n=6$)	1.48 $\pm$ 0.69 * Δ	0.99 $\pm$ 0.45 * Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 cDDP 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠卵巢颗粒细胞 bcl-2、bax mRNA 表达的比较 与正常组比较, cDDP 干预后各组 bcl-2 mRNA 表达下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 cDDP 组比较, cDDP + 雌二醇组、cDDP + 二仙汤

组 bcl-2 mRNA 表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常组比较, cDDP 干预后, 各组 bax mRNA 表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 cDDP 组比较, cDDP + 雌二醇组、cDDP + 二仙汤组 bax mRNA 表达均下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。



图 1 各组颗粒细胞 bcl-2 蛋白表达情况

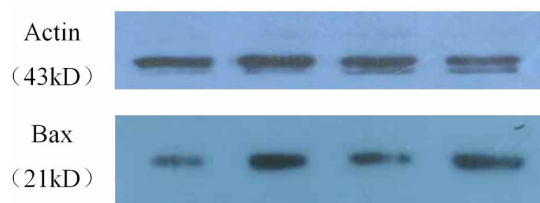


图 2 各组颗粒细胞 bax 蛋白表达情况

表 3 各组大鼠卵巢细胞中 bcl-2、bax 基因表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	bcl-2	bax
正常组 ($n=6$)	1.955 $\pm$ 0.357	0.19 $\pm$ 0.047
cDDP 组 ($n=6$)	1.034 $\pm$ 0.043 *	0.505 $\pm$ 0.092 *
cDDP + 雌二醇组 ($n=6$)	1.766 $\pm$ 0.358 * Δ	0.348 $\pm$ 0.083 * Δ
cDDP + 二仙汤组 ($n=6$)	1.570 $\pm$ 0.567 * Δ	0.379 $\pm$ 0.028 * Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 cDDP 组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

DOR 是指女性卵巢产生卵母细胞数量和质量的能力下降, 并可引起女性体内性激素的异常、生育能力障碍, 临床表现为月经稀少, 绝经, 不孕等^[9]。导致 DOR 最常见医源性因素即是化疗药物损伤。化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时, 存在着严重的细胞毒性作用, 严重影响女性患者的身心健康。随着癌症、血液病及自身免疫性疾病发病率上升, 化疗药物的使用率随之上升, 因此保护卵巢功能成为医学界关注的热点问题之一。

cDDP 作为一线化疗药物, 可诱导卵母细胞和颗粒细胞发生凋亡, 刺激原始静止卵泡过度活化, 增加卵泡对药物的敏感性, 导致颗粒细胞凋亡^[10]。cDDP 动物模型能够增加颗粒细胞凋亡, 加速卵泡募集, 使卵泡闭锁增多^[11]。本课题组前期实验研究已明确 cDDP 能够建立大鼠卵巢颗粒细胞损伤的细胞模型, 而二仙汤中药血清可以增加大鼠卵巢颗粒细胞中 E_2 、P 的表达, 延缓颗粒细胞损伤^[8]。那么, 二仙汤通过激活或抑制哪条信号途径而发挥上调模型细胞

中 E₂、P 的作用呢? 我们继续探究, 建立 cDDP 诱导原代卵巢颗粒细胞损伤模型, 通过基因及蛋白角度, 观察颗粒细胞中 PI3K、AKT 的表达情况, 结果显示二仙汤改善损伤性卵巢颗粒细胞的作用机制, 可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关^[9]。目前 bcl-2、bax 基因是最受关注的细胞凋亡调控基因, bcl-2 能抑制细胞凋亡, 延长细胞生存周期, 而 bax 则促进细胞凋亡, 二者相互拮抗, 共同影响着细胞凋亡的发生^[12]。因此本实验通过 cDDP 处理大鼠原代卵巢颗粒细胞, 运用分子生物学手段, 探究二仙汤是否通过调控 PI3K/AKT 信号通路下游靶蛋白 bax/bcl-2 对 cDDP 大鼠卵巢颗粒细胞发挥保护作用。

本实验 cDDP 能够诱导大鼠卵巢颗粒细胞促进凋亡基因 bax 表达, 降低凋亡抑制基因 bcl-2 表达, 与张春燕和何援利^[13]的研究结果一致。研究表明, 卵泡的生长发育及闭锁主要的作用靶点可能位于卵泡表面, 依赖体内内分泌系统及卵泡的三维结构特性, 通过调控颗粒细胞或卵母细胞生长增殖, 而影响卵泡的作用^[14]。在细胞凋亡发生过程中, PI3K/Akt 信号途径发挥着重要的生物学作用, 活化的 PI3K/Akt 信号途径, 通过调节下游多个靶分子, 参与细胞的凋亡^[15]。AKT 被磷酸化后可诱导 bax/bcl-2、Caspase3/8/9 和 FOX 家族磷酸化, 影响细胞凋亡^[16]; 这与课题组近期工作发现相一致(论文待发表)。本实验通过蛋白和基因水平均发现二仙汤能够下调 cDDP 诱导的大鼠卵巢颗粒细胞中 bax 蛋白表达, 上调 bcl-2 表达。bax/bcl-2 之间的动态平衡是细胞代谢关键环节。研究表明, bcl-2 可以通过影响氧自由基、P53、活化 Raf 基因等途径抑制细胞凋亡, 而 bax 在接受死亡信号后, 进入线粒体膜, 促使大量细胞色素 C 进入细胞质, 激活 caspase, 诱导细胞凋亡。bax/bcl-2 之间的动态平衡使细胞保持正常的代谢状态, 一旦这种增殖和凋亡的平衡被打破, 细胞代谢将出现紊乱, 引起疾病的发生^[17-18]。同时, bcl-2 能够减少线粒体膜的通透性, 抑制 bax 的促凋亡的生物学作用^[19-20]。

综上所述, 二仙汤能够通过调控 PI3K/Akt 信号通路, 调控下游靶蛋白 bax/bcl-2 的平衡, 改善 CDDP 诱导的大鼠卵巢颗粒细胞损伤, 纠正颗粒细胞微环境, 为临床治疗卵巢储备功能低下等疾病提供理论依据。

参考文献

- [1] 梁元晶, 曾婷婷, 路欣. 化疗药物对大鼠卵巢储备功能的影响[J]. 中国医学创新, 2019, 16(7): 27-30.
- [2] 王莉, 王红英, 黄群, 等. siRNA LSINCT5 联合顺铂对卵巢癌 SK-OV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 现代妇产科进展, 2016, 25(5): 349-353.
- [3] Voorhuis M, Onland-Moret NC, Janse F, et al. The significance of fragile X mental retardation gene 1 CGG repeat sizes in the normal and intermediate range in women with primary ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2014, 29(7): 1585-1593.
- [4] 罗娇, 张小雨, 王钰莹, 等. 不同剂量顺铂诱导小鼠卵巢功能早衰程度的差异[J]. 遵义医学院学报, 2013, 36(1): 1-4.
- [5] 李艳梅, 卜彦青, 侯文静, 等. 十七椎与多穴对痛经患者即时止痛作用的观察: 随机对照研究[J]. 中国针灸, 2011, 31(3): 199-202.
- [6] 康建颖, 陆月红. 二仙汤治疗围绝经期综合症患者的临床疗效及对性激素的影响[J]. 健康研究, 2017, 37(3): 321-323.
- [7] 艾浩, 张海英, 张玉立, 等. 二仙汤对顺铂损伤后小鼠卵巢功能调节作用研究[J]. 天津中医药, 2013, 30(5): 298-300.
- [8] 杨蕾, 王继峰, 牛建昭, 等. 二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 865-869.
- [9] 蔡欣悦. SF-1 介导四物合剂药理血清干预顺铂损伤后大鼠卵巢颗粒细胞 Cyp19a1 活性及表达的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [10] 赵笛, 赵丕文, 武虹波, 等. 二仙汤对顺铂所致大鼠卵巢早衰模型中卵巢颗粒细胞增殖及周期的影响[J]. 环球中医药, 2017, 10(2): 131-136.
- [11] Liu X, Zhao JX, Wang Y, et al. Effects of shikonin on the proliferation and activation of T lymphocytes[J]. World J Tradit Chin Med, 2018, 4(3): 121-126.
- [12] 王艳, 赵上, 苏衍萍, 等. 亚硒酸钠通过线粒体途径诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制[J]. 解剖学报, 2016, 47(3): 353-358.
- [13] 张春燕, 何援利. 顺铂对人卵巢黄素化颗粒细胞的毒性及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 796-799.
- [14] 杨玥, 房丽红, 王雪峰. Foxo3a 基因调控大鼠卵巢颗粒细胞体外发育及预防顺铂对卵巢的毒性作用[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(6): 796-801 + 813.
- [15] 周斌, 孙博, 吕会娟, 等. siRNA 降低 MACC1 基因表达对子宫内膜癌细胞增殖凋亡及 PI3K/AKT 信号通路的影响研究[J]. 癌症进展, 2018, 16(12): 1494-1497.
- [16] 叶敏, 刘志强, 王李俊, 等. 猪苓酮 A 通过调节 Bcl-2/Bax 信号通路诱导雌激素受体阴性的乳腺癌细胞凋亡研究[J]. 中草药, 2018, 49(22): 5334-5338.
- [17] 续云洁. Bcl-2 抑制剂 ABT737 通过调节糖代谢增加卵巢癌顺铂耐药细胞凋亡敏感性机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [18] 贡洁, 胡晓佳, 段海婧, 等. 白藜芦醇通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡机制研究[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(4): 13-16.
- [19] 赵笛, 赵丕文. 基于 FOXO3a 转录因子探讨二仙汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [20] 李杨, 谢莉, 刘建, 等. 二仙汤对过氧化氢诱导的人卵巢颗粒细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(3): 317-322.