

四物合剂干预顺铂作用卵巢颗粒细胞 E₂ 分泌水平的实验研究

武虹波 赵丕文 孙丽萍 蔡欣悦 赵笛 杨蕾 卢迪

【摘要】 **目的** 探讨四物合剂对顺铂损伤后颗粒细胞分泌 E₂ 水平的影响。**方法** 取 10 只 22~24 天 SD 雌性大鼠卵巢颗粒细胞培养,另取 48 只 22~24 天 SD 雌鼠随机分为生理对照组、模型组、阳性组、四物合剂大、中、小剂量组,每组 8 只,以生理盐水(生理对照组与模型组,0.5 mL/天),戊酸雌二醇片阳性组(0.4 mg/kg·d),四物合剂大剂量组(13.5 mL/kg·d)、中剂量组(6.75 mL/kg·d)、小剂量组(3.38 mL/kg·d)分别灌胃 3 天后取药理血清。颗粒细胞用含 20% 药理血清的细胞培养液分别培养 24 小时后检测指标。MTT 法观察药理血清对顺铂损伤后原代颗粒细胞增殖的影响;放射免疫法观测四物合剂药理血清对顺铂作用颗粒细胞 E₂ 分泌的干预效果;免疫组化法检测四物合剂药理血清对顺铂作用颗粒细胞 CYP19a1 基因表达和 Smad2/3 激活的干预效果。**结果** MTT 法检测结果表明:与模型组相比,阳性组、四物合剂各剂量组细胞吸光度均增强,四物合剂大剂量数值最高(P<0.01);放射法检测结果表明,四物合剂药理血清对 E₂ 的分泌有促进作用,且大剂量效果最明显(P<0.05);免疫组化法结果表明,四物合剂药理血清可以提高 CYP19a1 基因、Smad2/3 蛋白、Psmad2/3 蛋白的表达,其中大剂量作用明显(P<0.01)。**结论** 四物合剂药理血清对顺铂作用后的颗粒细胞 E₂ 的分泌水平有改善作用,但可能还不能起到完全修复的作用,还需进一步的实验观察。

【关键词】 卵巢颗粒细胞; 顺铂; 四物合剂; 雌二醇

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.04.014

Experimental study of *Siwu* mixture intervening the secretion level of E₂ in ovarian granulose cell induced by cisplatin chemotherapy WU Hongbo, ZHAO Piwen, SUN Liping, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: Zhao Piwen, E-mail: puzhao@263.net

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of *Siwu* mixture on secretion level of E₂ in ovarian granulose cell induced by cisplatin chemotherapy. **Methods** Ovarian granulosa cells from ten SD female rat of 22 to 24 days were taken to culture cells. 48 healthy SD female rats from 22 to 24 days were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, positive medicine group, and the high, medium and low dose of *Siwu* mixture group, 8 rats in each group. Rats were given corresponding drug by gavage for 3 days: Physiological saline (normal group and model group, 0.5 mL/d), Estradiol valerate tablets (positive medicine group, 0.4 mg/kg·d), *Siwu* mixture high group(13.5 mL/kg·d), *Siwu* mixture medium group(6.75 mL/kg·d), *Siwu* mixture low group(3.38 mL/kg·d). The ovarian granulosa cells were cultured by 20% pharmacological serum for 24 hours. MTT method was used to observe the effect of phar-

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673764);北京中医药大学自主选题项目(2015-JYBJSMS016)

作者单位: 100029 北京中医药大学生命科学院 [武虹波(硕士研究生)、蔡欣悦(硕士研究生)、赵笛(硕士研究生)、杨蕾(硕士研究生)、卢迪(硕士研究生)、赵丕文、孙丽萍]

作者简介: 武虹波(1989-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:妇科常用中药的作用机制。E-mail: wuhongbo0112@126.com

通信作者: 赵丕文(1967-),女,博士,教授,硕士生导师。研究方向:妇科常用中药的作用机制。E-mail: puzhao@263.net

macological serum on proliferation of primary granulosa cells after cisplatin injury. RIA was used to observe the intervention effect of pharmacological serum on E_2 secretion. Mmunohistochemistry was used to detect intervention effect of serum pharmacological on CYP19a1 gene expression and activation of Smad2/3.

Results MTT assay results showed that absorbance of positive medicine group and *Siwu* mixture groups were higher than the normal group, and the *Siwu* mixture high dose group was the highest ($P < 0.01$), RIA method results showed that *Siwu* mixture had a auxo-action of E_2 , and high dose group was the most obvious ($P < 0.05$). Immunohistochemical method results showed that *Siwu* mixture could improve the expression of CYP19a1 gene and Smad2/3 and Psmad2/3 protein, the effect of high dose group was the most obvious ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.01$). **Conclusion** *Siwu* mixture has the effect of improvement on the secretion of E_2 . But it may not be able to play the role of completely repair, and need for further experimental observation.

【Key words】 Ovarian granulosa cell; Cisplatin; *Siwu* mixture; Estradiol

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指妇女 40 岁之前卵巢功能衰退、闭经, 伴有低雌激素和高促性腺激素状态的一组疾病^[1], 其病因复杂, 具体发病机理目前仍有待探究。近年来关于癌症化疗药物导致卵巢雌激素分泌水平的下降形成卵巢早衰的报道日益增多^[2]。顺铂 (cis-diamne dichloroplatinum, CDDP) 是一种用来治疗多种肿瘤的化疗药物, 有研究表明, 顺铂的使用对卵巢有直接的不良作用, 可诱导卵巢颗粒细胞的凋亡, 最终形成卵巢早衰^[3-4]。西医对该病多采取激素替代疗法, 但不良反应明显。本实验选用四物汤中成药即四物合剂来作为治疗药物。人类细胞色素蛋白 P450 (CYP19a1) 作为雌二醇 (estradiol, E_2) 合成关键酶, E_2 的合成与分泌又与 TGF- β -Smad 信号转导通路有关^[5], Smad2/3 蛋白作为该信号转导通路的关键信号传导分子, 故本研究拟通过使用四物合剂作用于顺铂建立起来的大鼠卵巢早衰模型, 通过检测对 CYP19a1 以及 Smad2/3 蛋白表达的影响, 探讨四物合剂对卵巢颗粒细胞 E_2 分泌水平的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性 22 ~ 24 天 SD 大鼠, 体质量 75 ~ 80 g, 清洁级, 检疫合格, 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司。许可证号: SCXK (京) 2011-0004。

1.2 药物、试剂与仪器

DMEM F-12 培养液 (批号: SH-30023, Hyclone 公司)、DAB 显色试剂 (批号: ZLI-9018, 中杉金桥), 免疫组化试剂盒 (批号: SP-9001, 中杉金桥), DMSO (批号: DB370, Amresco)。Smad2/3 (批号: sc-8332,

Santa), Psmad2/3 (批号: sc-11769, Santa), CYP19a1 (批号: sc-30086, Santa), 二抗: 山羊抗兔 IgG (批号: ZB2301)、山羊抗小鼠 IgG (批号: ZB2305) 由中杉金桥公司生产。

顺铂粉针剂 (CDDP, 济南齐鲁制药, 10 mg/支, 批号: H37021358), 注射时使用生理盐水将其配制浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释液; 四物合剂 (吉泰安药业有限公司, 100 mL/瓶); 补佳乐 (拜耳医药有限公司生产, 1 mg/片, 批号: B01007102)。

CO_2 培养箱 (SANYO, MCO-18AIC); 超净工作台 (北京亚泰隆实验技术中心, 022-2522); 低温离心机 (SIGMA, 3K15); 倒置显微镜 (NIKON, TS100); 多功能荧光酶标仪 (TECAN, SAFIRE2)。

1.3 原代大鼠卵巢颗粒细胞分离收集

取 22 ~ 24 天 SD 雌性大鼠, 腹腔注射孕马血清 (PMSG, 50 IU/只), 常规饲养 48 小时后, 10% 水合氯醛麻醉后处死, 无菌条件下取出双侧卵巢并用预冷的 Hank's 液清洗 3 次。将卵巢移入 3 mL DMEM/F-12 培养液 (含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素) 中, 用 1 mL 一次性注射器针头刺破卵泡, 释放颗粒细胞, 加入 0.25% 胰酶 1 mL, 用吸管反复吹打悬液数次, 使颗粒细胞团块分离, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10 分钟 (其间每隔 3 分钟振荡或吹打 1 次)。加入 5 mL DMEM/F-12 培养液 (含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素) 终止胰酶消化, 并静置 10 分钟, 取悬液加入离心管离心 (1000 rpm, 10 分钟), 弃上清, 加入 5 mL Hank's 液, 吹散细胞后再离心一次, 弃上清, 加入 1 mL DMEM/F-12 培养液 (含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素) 后吹打, 血球计数板计数, 调整细胞悬液浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

1.4 药理血清制备

将 48 只 22~24 天 SD 大鼠随机分六组, 每组 8 只, 分组及造模方法: (1) 生理对照组: 生理盐水灌胃每天 0.5 mL/次; (2) 模型组: 同生理对照组; (3) 阳性组: 每天 0.4 mg/kg; (3) 四物合剂大剂量组 (成人用药量 20 倍): 每天 13.5 mL/kg; (4) 四物合剂中剂量组 (成人用药量 10 倍): 每天 6.75 mL/kg; (5) 四物合剂低剂量组 (成人用药量 5 倍): 每天 3.38 mL/kg。各组连续灌胃 3 天, 最后 1 次灌胃 1 小时后心脏取血并分离血清, 在超净台过滤后分装, -20℃ 保存。

1.5 检测指标

1.5.1 MTT 法观察药理血清对 CDDP 损伤后原代颗粒细胞增殖的影响 细胞按 5×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔培养液总体积为 200 μ L。在盖上做好标记, 每两列为一组, 共六组, 分为生理对照组、模型组、阳性组、四物合剂大剂量组、四物合剂中剂量组、四物合剂小剂量组。培养 72 小时待细胞贴壁后, 除正常组外, 其余吸去孔内培养液, 加入等体积的 CDDP 稀释液 (浓度为 2.5 μ g/mL), 作用 12 小时后, 吸去所有孔内培养液, 加入各组对应血清 (药理血清浓度为 20%)。培养 24 小时后, 每孔加 MTT 溶液 20 μ L (5 mg/mL, 用 PBS 配制, pH=7.4), 37℃ 孵育 4 小时后, 终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加 150 μ L DMSO, 振荡 10 分钟, 使结晶物充分溶解。酶标仪波长 490 nm, 测吸光度值 (optical density, OD)。

1.5.2 放免法测定四物合剂药理血清对顺铂作用颗粒细胞 E_2 分泌水平的影响 细胞按 5×10^5 个/孔的密度接种于 48 孔板内, 每孔培养液总体积为 400 μ L。将 48 孔板分六组, 方法同上。培养 72 小时待细胞贴壁后, 除生理对照组外, 其余组吸去孔内培养液, 每孔加入等体积的 CDDP 稀释液, 作用 12 小时后, 吸去所有孔内培养液, 加入等量血清稀释液 (浓度为 20%) 以及 E_2 分泌诱导剂雄烯二酮 (0.5 μ mol/L) 和卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH, 14 IU/L)。药理血清培养 24 小时后, 取每孔上清液测定 E_2 水平。

1.5.3 免疫组化法观察四物合剂药理血清对顺铂作用颗粒细胞 CYP19a1 基因表达的影响以及对 Smad2/3 蛋白的激活效果 选取细胞密度约 5×10^5 个/孔的 48 孔板, 移去培养基, 用 PBS 清洗一遍;

4% 的多聚甲醛室温固定 20 分钟; PBS 室温漂洗三次, 3 分钟/每次; 含 0.5% Triton-X-100 室温通透处理 20 分钟; PBS 室温漂洗三次; 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 分钟; PBS 室温漂洗三次; 滴加试剂 A (封闭用正常山羊血清工作液) 室温孵育 15 分钟, 倾去, 勿洗; 各蛋白抗体作为一抗, 室温孵育 2~3 小时; PBS 室温漂洗三次; 滴加试剂 B (生物素二抗工作液), 室温或 37℃ 孵育 10~15 分钟; PBS 室温漂洗三次; 滴加试剂 C (辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液), 37℃ 孵育 30 分钟, PBS 冲洗 3 次; DAB 显色剂显色, 室温孵育 10~15 分钟, 自来水洗两次; 于倒置显微镜下观察拍照并使用 Image pro plus 进行图像分析, 测定积分光密度值 (immunity group image gradation analysis integral light density, IOD)。

1.6 统计学处理

数据采用 SAS 9.1 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计时对各组数据先进行方差齐性检验, 如方差齐, 则进行单因素方差分析; 如果方差不齐, 则使用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 计数法及放免法观察药理血清对 CDDP 作用颗粒细胞吸光度、 E_2 分泌水平的影响

MTT 法结果显示: 与生理对照组相比, 模型组吸光度值降低明显 ($P < 0.01$), 证明造模成功; 与模型组相比, 阳性组、四物合剂各剂量组细胞吸光度均增强, 效果尤以四物合剂大剂量组明显 ($P < 0.01$)。

放免法结果显示: 模型组细胞在顺铂作用下 E_2 分泌水平较生理对照组明显降低 ($P < 0.05$), 在阳性药与四物合剂各剂量组的作用下, E_2 分泌水平均较模型组有所增加, 除阳性组效果较为明显之外 ($P < 0.01$), 四物合剂大剂量组也具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

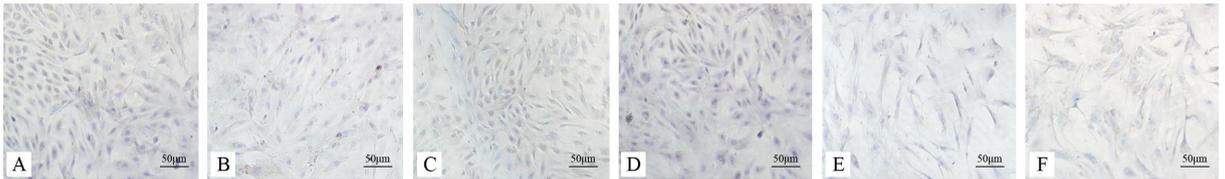
2.2 免疫组化法检测四物合剂药理血清对顺铂作用颗粒细胞 CYP19a1 基因表达和 Smad2/3 蛋白激活的干预

顺铂作用后, 颗粒细胞中 CYP19a1 蛋白表达减少 ($P < 0.01$), 在阳性药及四物合剂各剂量组作用后, 表达量有所提升, 其中四物合剂组中以大剂量组染色较深, 蛋白表达量增加较显著 ($P < 0.01$), 分

表 2 各组大鼠卵巢颗粒细胞 CYP19a1、Smad2/3、Psmad2/3 表达的 IOD 值($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

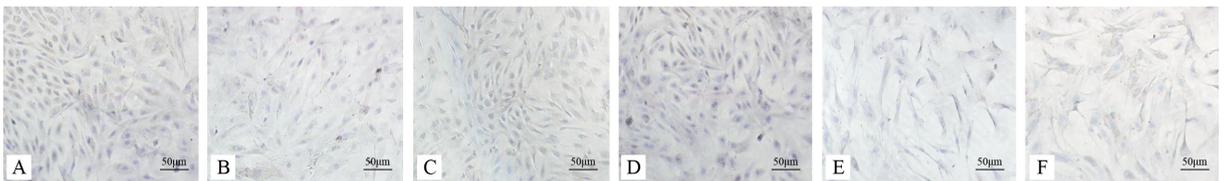
组别	CYP19a1	Smad2/3	Psmad2/3
生理对照组	16635.10±2542.92	13037.77±3454.17	18959.62±2497.60
模型组	3919.98±1730.89 ^a	5459.21±1671.97 ^a	11620.43±2261.55 ^a
阳性组	13642.64±2755.47 ^c	14096.54±2889.41 ^c	16066.49±1069.02 ^c
四物合剂大剂量组	13889.61±1729.30 ^c	10764.44±3144.08 ^c	15551.13±3284.25 ^c
四物合剂中剂量组	9818.28±2139.09 ^c	7409.34±2194.39 ^b	14017.57±2027.27 ^b
四物合剂小剂量组	5767.02±1810.94 ^b	4887.52±1306.71	11839.34±1131.19

注:与生理对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。



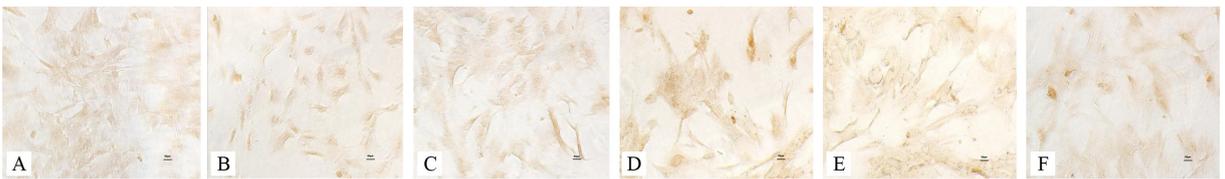
注: A. 生理对照组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 四物合剂大剂量组; E. 四物合剂中剂量组; F. 四物合剂小剂量组

图 1 各组大鼠卵巢颗粒细胞 Cyp19a1 基因的表达(DAB 染色法×400)



注: A. 生理对照组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 四物合剂大剂量组; E. 四物合剂中剂量组; F. 四物合剂小剂量组

图 2 各组大鼠卵巢颗粒细胞 Smad2/3 蛋白的表达(DAB 染色法×400)



注: A. 生理对照组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 四物合剂大剂量组; E. 四物合剂中剂量组; F. 四物合剂小剂量组

图 3 各组大鼠卵巢颗粒细胞 Psmad2/3 蛋白的表达(DAB 染色法×400)

表 1 各组大鼠卵巢颗粒细胞吸光度值及 E₂ 分泌水平($\bar{x}\pm s$)

组别	吸光度/A($n_1=10$)	E ₂ (pg/mL, $n_2=6$)
生理对照组	0.47±0.10	20.22±3.67
模型组	0.24±0.05 ^a	15.43±2.84 ^a
阳性组	0.36±0.05 ^c	54.96±6.56 ^c
四物合剂大剂量组	0.44±0.11 ^c	20.48±3.35 ^b
四物合剂中剂量组	0.31±0.09 ^b	19.04±5.28
四物合剂小剂量组	0.24±0.06	16.34±3.59

注:与生理对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

析 IOD 值后得出四物合剂各剂量组相比模型组均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$),大剂量组效果最为显著,中剂量次之。结果见表 2。

Smad2/3 蛋白主要表达于细胞质中,磷酸化的 Smad2/3 蛋白即 Psmad2/3 蛋白主要表达于细胞核中。如图 1~3 所示,顺铂作用后的颗粒细胞,Smad2/3 蛋白及 Psmad2/3 蛋白表达量均下降($P<0.01$),阳性药以及四物合剂作用后各组蛋白表达量均较模型组增加,四物合剂组中以大剂量效果较为显著($P<0.01$)。

3 讨论

四物合剂来源于补血调经的经典名方“四物汤”,是由熟地黄、当归、白芍、川芎四味药在传统方剂的基础上,结合现代技术而制成的口服液。四物

汤出自唐人集著的《仙授理伤续断秘方》，在宋代的《太平惠民和剂局方》中被列入治疗“妇科诸疾”^[6]，历来都是医家治疗妇科疾病的经典要方。本研究旨在探讨四物合剂对顺铂损伤后的卵巢颗粒细胞分泌 E₂ 水平的影响，明确四物合剂对卵巢早衰的治疗效果，从而为四物合剂在临床上对卵巢早衰的治疗提供实验依据。

研究表明，顺铂可引起卵巢抗氧化及氧化损伤指标的异常，从而导致卵巢功能衰退^[7]，故本实验采用顺铂作用于正常卵巢颗粒细胞造模。MTT 计数法和放免法检测结果表明，顺铂造模后的大鼠卵巢颗粒细胞增殖能力减弱，且 E₂ 分泌水平降低，但在四物合剂的作用下，细胞增殖能力以及 E₂ 分泌水平均有所改善，且在本研究中，四物合剂各组中以大剂量效果较为显著。

E₂ 作为女性体内最为重要的性激素之一，具有促进卵泡生长，改善卵巢功能的作用。E₂ 的合成原料为胆固醇，在类固醇激素快速合成调节蛋白作用下转运至线粒体，经一系列酶催化转化为 E₂，此过程中 CYP19a1 是 E₂ 生成的限速酶^[8]。实验结果表明，顺铂作用下，影响颗粒细胞分泌 E₂ 能力的 CYP19a1 的表达水平下降，但在四物合剂药理血清的干预下，CYP19a1 的表达水平上升，尤以大剂量组效果最为明显，说明四物合剂可通过影响 CYP19a1 基因的表达而提高颗粒细胞 E₂ 的分泌水平。

Smads 家族是一个在脊椎动物、昆虫和线虫体内发现的转录因子家族，迄今为止在哺乳动物体内已发现 8 个成员：Smad1 ~ 8^[9]。Smad 蛋白将细胞表面转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β) 信号传递到细胞核中调控相关基因的表达^[10]。Smad2 和 Smad3 是 TGF-β 受体的直接底物，在 TGF-β 刺激下，Smad2 和 Smad3 蛋白被磷酸化，与 Smad4 形成复合物，然后穿入细胞核调控靶基因的转录^[11]。故 Smad 蛋白在 E₂ 的合成过程起到了至关重要的作用。本实验结果表明，在顺铂作用下，Smad2/3 的胞核分布均减少，但在四物合剂药理血清干预后，Smad2/3 蛋白的核质分布均增多，且大剂量效果最为明显，表明四物合剂对颗粒细胞分泌

E₂ 有改善作用，且该作用经过了 TGF-β 和 Smad2/3 信号系统的转导。

综上所述，对于化疗药物顺铂所致的大鼠卵巢早衰，四物合剂确有疗效，可以提升颗粒细胞 E₂ 的分泌水平，从而改善由卵巢早衰引起的低雌激素症状。但研究也表明，四物合剂的使用也有剂量上的要求，大、中剂量表现出一定的治疗作用，而且治疗作用随着剂量降低依次减弱。此外，四物合剂对 E₂ 分泌的调节作用有可能是通过 TGF-β 和 Smad2/3 信号转导通路实现的，但其具体的分子作用靶点还有待进一步的考察。

参 考 文 献

- [1] Kalantaridou SN, Davis SR, Nelson LM. Premature ovarian failure [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998, 27(27):989-1006.
- [2] Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(4):391.
- [3] 曲秀芬, 王兵兵, 张蕾, 等. 卵巢早衰的现代医学研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(7):1005-1007.
- [4] 柳友清, 邢辉, 韩晓兵, 等. 顺铂诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡及其作用机制的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(1):1-4.
- [5] Inoue K, Nakamura K, Abe K, et al. Effect of transforming growth factor beta on the expression of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells [J]. Biol Reprod, 2002, 67(2):610-615.
- [6] 焦秀珍, 孙静. 四物汤的典故考略及其验案举隅 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(5):379.
- [7] 艾浩, 牛建昭, 薛晓鸥, 等. 化疗损伤性卵巢功能早衰小鼠动物模型的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(1):35.
- [8] Thompson, EA, Siiteri, PK. The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization [J]. J Biol Chem, 1974, 249(17):5373-5378.
- [9] Derebeckaholysz N, Lehmann TP, Holysz M, et al. SMAD3 inhibits SF-1-dependent activation of the CYP17 promoter in H295R cells. [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 307(1):65-71.
- [10] 苏宁, 李予, 王文军, 等. 骨形态发生蛋白-4 对人始基卵泡的作用 [J]. 中山大学学报, 2008, 29(6):676-679.
- [11] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus [J]. Cell, 2003, 113(6):685-700.

(收稿日期: 2016-10-10)

(本文编辑: 韩虹娟)