

# 当归补血汤含药血清对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响

赵粉琴, 徐世倩, 袁爱倩, 李娜娜

甘肃中医药大学中西医结合学院, 甘肃 兰州 730000

**[摘要]** 目的: 探讨当归补血汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞凋亡蛋白以及氧化损伤的影响。方法: 以不同剂量的当归补血汤含药血清作用于 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂 (Cisplatin, CDDP) 抑制的体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞, 用 MTS [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 法检测各组颗粒细胞 24 h、48 h、72 h 增殖情况, 及培养液中丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和胱天蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白表达情况。结果: CDDP 对大鼠卵巢颗粒细胞有明显抑制作用, 凋亡率可以达到 70.50%。当归补血汤含药血清对颗粒细胞增殖有促进作用, 2.5% 当归补血汤含药血清作用 48 h 组最为显著 ( $P < 0.01$ ); 同时 MDA 和 caspase-3 蛋白也逐渐降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与当归补血汤低、高剂量治疗组比较, 当归补血汤中剂量治疗组效果最明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论: 当归补血汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞增殖有促进作用, 可能机制是抑制细胞氧自由基的产生, 抑制 Caspase-3 蛋白表达, 促进细胞增殖。

**[关键词]** 当归补血汤含药血清; 大鼠卵巢颗粒细胞; 丙二醛 (MDA); 胱天蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0008-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.003

## Medicated Serum of Danggui Buxue Tang Has Effect on the Expression of Caspase-3 Protein of Ovarian Granulosa Cells in Rats with Cisplatin Injury

ZHAO Fenqin, XU Shiqian, YUAN Aiqian, LI Nana

**Abstract:** Objective: To discuss the effect of medicated serum of Danggui Buxue tang on apoptosis protein and oxidative damage of ovarian granulosa cells in rats with Cisplatin injury. **Methods:** Different dosage of medicated serum of Danggui Buxue tang was applied to ovarian granulosa cells in rats in vitro inhibited by 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cisplatin (CDDP). MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) method was used to detect the proliferation of granulosa cells in each group at the 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hour, Malondialdehyde (MDA) and the expression of Caspase-3 protein in culture medium. **Results:** CDDP had obvious inhibitory effect on ovarian granulosa cells in rats, and the apoptosis rate can reach 70.50%. Medicated serum of Danggui Buxue tang can promote the proliferation of granulosa cells, and the effect of 2.5% medicated serum of Danggui Buxue tang on the 48<sup>th</sup> hour group was the most obvious ( $P < 0.01$ ); MDA and Caspase-3 protein decreased gradually at the same time, the difference being significant ( $P < 0.01$ ). Compared with that in the Danggui Buxue tang groups of low-dose and high-dose, the curative effect in the Danggui Buxue tang group of middle-dose was the most obvious, the difference being significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Danggui Buxue tang can promote the proliferation of ovarian granulosa cells in rats with Cisplatin injury. Its mechanism probably is to inhibit the production of oxygen free radicals of cells and the expression of Caspase-3 protein, and promote the proliferation of cells.

**Keywords:** Medicated serum of Danggui Buxue tang; Ovarian granulosa cells in rats; Malondialdehyde (MDA); Caspase-3 protein

卵巢颗粒细胞是围绕卵泡外最多的、起营养作用的细胞群, 其生长及增殖与促进卵泡的生长、闭锁、排卵有关, 颗粒

细胞的凋亡是卵泡闭锁的主要机制, 也是引起女性内分泌功能失调的主要原因<sup>[1]</sup>。细胞在程序性凋亡的过程中胱天蛋白酶-3

**[收稿日期]** 2017-10-20

**[基金项目]** 甘肃省自然科学基金项目 (148RJZA072); 甘肃中医学院中青年基金项目 (2305016601)

**[作者简介]** 赵粉琴 (1970-), 女, 副教授, 研究方向: 妇科血瘀证及内分泌研究。

(Caspase-3)作为细胞凋亡的关键酶,能促进细胞凋亡。化疗是治疗恶性肿瘤的常用方法,化疗导致卵巢功能的主要损伤是卵泡数量下降,卵巢纤维化。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是体内脂质过氧化产生的终末产物,MDA的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的程度<sup>[2]</sup>。因此探讨顺铂(Cisplatin, CDDP)损伤后MDA和Caspase-3蛋白在颗粒细胞中的表达以及当归补血汤的干预作用,能为当归补血汤的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂及仪器** Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于贝博生物公司(产品号:BB-4101-100T,批号:BB150041),DMEM/F12 1:1 培养液购于上海连硕生物科技有限公司(批号SH30023.01),流式细胞仪检测仪(美国Coulter公司,Epics2XL型)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 当归补血汤含药血清制备** 当归补血汤方由黄芪60g,当归12g组成。以上中药加入20倍量的水煎煮2次,每次1.5h。过滤,蒸发浓缩为含生药量1g/mL水煎剂。选用8周龄SD大鼠10只[动物实验合格证:SYXK(甘)2015-0005],根据大鼠与人体表面积换算,给予当归补血汤高剂量(10g/kg,临床10倍用量)灌胃,每天早晚2次,连续灌胃5天。第5天末次灌胃1h后各组大鼠予以戊巴比妥钠30mg/kg麻醉,颈主动脉取血5mL,离心,无菌分离血清,经56℃,水浴30min灭活补体后,用0.22μm的微孔滤膜过滤除菌,-20℃保存备用。制备成当归补血汤含药血清:低剂量组(0.5%含药血清):0.05mL含药血清+9.95mL正常血清;中剂量组(2.5%含药血清):0.25mL含药血清+9.75mL正常血清;高剂量组(10.0%含药血清):1mL含药血清+9mL正常血清。

**1.2.2 大鼠卵巢颗粒细胞培养** 从甘肃中医药实验动物中心购买3~4周龄雌性SD大鼠[动物实验合格证:SYXK(甘)2015-0005]适应性喂养2天,皮下注射孕马血清促性腺激素40IU/只,48h后颈椎脱臼法处死,无菌条件下取出卵巢,用预冷的PBS液体清洗,去除卵巢周围的脂肪和包膜,用1mL空针针头刺破卵泡,剔除大块卵巢组织碎片后1500r/min离心8min,加入培养液清洗2次后,弃上清收集颗粒细胞,巴氏管轻轻吹打,200目不锈钢细胞筛过滤,在无血清DMEM/F12培养基,37℃,5%CO<sub>2</sub>温箱中培养。

**1.2.3 细胞分组** 把用CDDP处理48h卵巢颗粒细胞依据作用药物分为①空白组:单纯颗粒细胞和培养液;②模型组:顺铂+颗粒细胞组;③当归补血汤低剂量治疗组(低剂量组):0.5%含药血清;④当归补血汤中剂量治疗组(中剂量组):2.5%含药血清;⑤当归补血汤高剂量治疗组(高剂量组):10%含药血清。

**1.2.4 MTS监测大鼠颗粒细胞增殖率** 取生长旺盛的第4天细胞,用0.25%胰蛋白酶消化1000r/min离心8min后弃上清

收集细胞。显微镜下计数后,按 $2.5 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬液,按每孔100μL接种于96孔细胞培养板。DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清),37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中预培养24h后见有细胞贴壁,换液继续培养。按不同药物浓度处理细胞,每孔培养总体积100μL。继续培养24h、48h、72h后,37℃水浴10min,融化MTS试剂,在96孔板中,每孔加入20μL单溶液96孔细胞增殖检测试剂(CellTiter96® Aqueous one solution reagent),37℃、5%CO<sub>2</sub>环境培养1~4h,490nm读取吸光度值。

**1.2.5 流式细胞仪检测CDDP对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响** 取24h细胞贴壁生长的细胞,分别用不同浓度(0、2.5、5.0、10.0、12.5μg/mL)CDDP处理细胞,48h后将各组颗粒细胞用胰酶消化3min,吹打收集细胞于10mL离心管中,反复用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬洗涤,用预冷的70%乙醇固定过夜,加入Annexin V标记蛋白和相应的核酸染料,混合均匀,室温避光反应20~30min。再加入0.5mL的pH7.2的PBS,静置5min,离心10min,沉淀再用PBS洗涤2次后,并用1mL PBS悬浮起细胞,及时用流式细胞仪进行分析,采集细胞的DNA数据。

**1.2.6 MTS检测当归补血汤含药血清对CDDP损伤大鼠卵巢颗粒细胞的增殖作用** 颗粒细胞按 $2.5 \times 10^4$ 个/孔100μL接种至96孔板,每孔加入0.1mL DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养液(加10%小牛血清),在37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h细胞生长达80%融合。空白组仅加入等容量无血清培养基;模型组加入等容量5μg/mL CDDP和无血清培养基;当归补血汤低、中、高剂量组加入等容量5μg/mL CDDP及分别加入0.5%、2.5%、10.0%的含药血清。各组细胞继续培养24h、48h、72h后去除培养液,每孔加0.1mL系列稀释的待测样品标准品和MTS/PMS(吩嗪硫酸甲酯)混合液20μL,继续孵育4h显色。并在酶标仪上490nm波长处测光密度值(OD),以检测其细胞增殖情况。增殖抑制率 $= (1 - \text{实验组 OD} / \text{对照组 OD}) \times 100\%$ 。

**1.2.7 细胞液中雌二醇(Estradiol-2, E<sub>2</sub>)和MDA水平测定** 收集培养48h后的细胞上清液,用化学发光法测定各组细胞上清液中的雌激素水平。按照试剂盒说明书操作测定MDA含量。

**1.2.8 Western blot检测Caspase-3蛋白表达水平** 待各组细胞生长至融合度为90%时取出,细胞刮至瓶底一角,收集至预冷的EP管中,PBS清洗细胞3次,4℃,离心1000r/min,10min,弃上清,加入蛋白抑制剂的RIPA裂解液200μL,并反复吹打10次左右,冰上静置30min,再次离心12000r/min、4℃,取上清至EP管中(即所需蛋白提取液);蛋白变性后,每孔上样量20μL,电泳,转膜3h,分别加入Caspase-3蛋白一抗37℃水浴孵育1h后,4℃过夜,第2天加入二抗37℃水浴孵育1h,然后暗室中加入ECL发光液,X光胶片曝

光 30 min, 扫描图像并且分析结果, 比较目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 条带的光密度值。

1.2.9 统计学方法 用 SPSS16.0 统计学软件进行分析, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 两样本比较采用配对资料  $t$  检验。

2 结果

2.1 卵巢颗粒细胞阳性率检测结果 见图 1。大鼠卵巢颗粒细胞计数台盼蓝染色, 卵巢颗粒细胞阳性率达到 85%, 符合实验要求。

2.2 各组大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率结果比较 见图 2、表 1。与 0.0  $\mu\text{g/mL}$  CDDP 组比较, 不同浓度 CDDP(2.5、5.0、10.0、12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 对卵巢颗粒细胞生长都有抑制作用, 浓度越

高抑制作用越明显, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

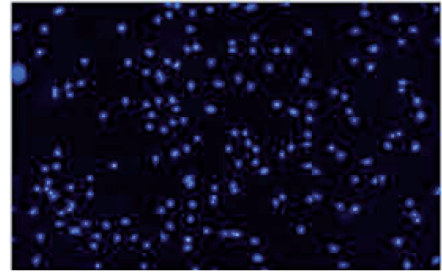


图 1 大鼠卵巢颗粒细胞台盼蓝染色结果( $\times 400$ )

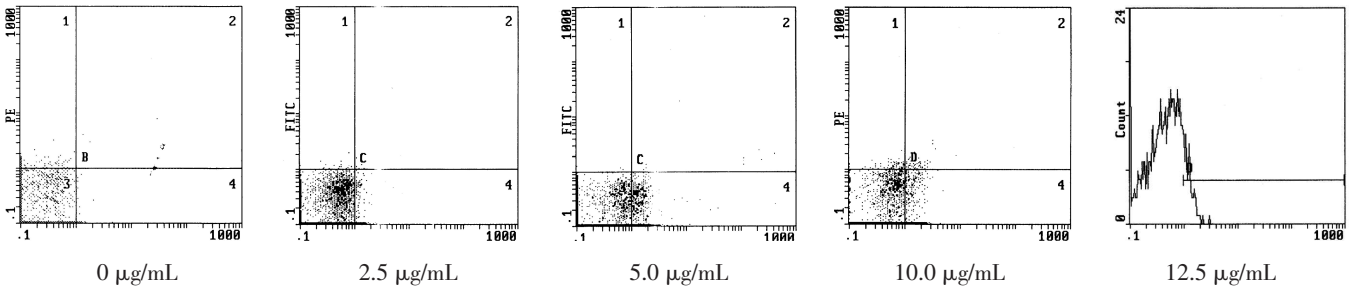


图 2 流式细胞仪监测大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率

表 1 不同浓度 CDDP 对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率的影响  $(\bar{x} \pm s)$  %

组别	凋亡率
0 $\mu\text{g/mL}$ CDDP 组	5.925 $\pm$ 0.030 0
2.5 $\mu\text{g/mL}$ CDDP 组	42.850 $\pm$ 0.041 0 <sup>①</sup>
5.0 $\mu\text{g/mL}$ CDDP 组	70.500 $\pm$ 0.017 3 <sup>①</sup>
10.0 $\mu\text{g/mL}$ CDDP 组	80.250 $\pm$ 0.045 0 <sup>①</sup>
12.5 $\mu\text{g/mL}$ CDDP 组	92.230 $\pm$ 0.051 4 <sup>①</sup>

与 0.00  $\mu\text{g/mL}$  CDDP 组比较, ① $P < 0.01$

2.3 各组卵巢颗粒细胞增殖率结果比较 见表 2。与空白组比较, 模型组大鼠卵巢颗粒细胞增殖率明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 表明 CDDP 对大鼠卵巢颗粒细胞有明显的抑制作用。与模型组比较, 当归补血汤低、中剂量治疗组大鼠卵巢颗粒细胞增殖率明显升高, 以中剂量组的改善作用最明显, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 2 各组卵巢颗粒细胞增殖率结果比较  $(\bar{x} \pm s)$  %

组别	24 h	48 h	72 h
空白组	0.162 $\pm$ 0.009 5	0.238 $\pm$ 0.008 7	0.186 $\pm$ 0.017 1
模型组	0.105 $\pm$ 0.013 0 <sup>①</sup>	0.111 $\pm$ 0.017 9 <sup>①</sup>	0.105 $\pm$ 0.012 9 <sup>①</sup>
低剂量组	0.134 $\pm$ 0.010 3 <sup>②</sup>	0.157 $\pm$ 0.013 2 <sup>②</sup>	0.135 $\pm$ 0.009 7 <sup>②</sup>
中剂量组	0.136 $\pm$ 0.011 1 <sup>②④</sup>	0.197 $\pm$ 0.011 5 <sup>②③④</sup>	0.168 $\pm$ 0.015 3 <sup>②③④</sup>
高剂量组	0.095 $\pm$ 0.012 9 <sup>③</sup>	0.111 $\pm$ 0.014 9 <sup>③</sup>	0.084 $\pm$ 0.010 8 <sup>②③</sup>

与空白组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.01$ ; 与低剂量组比较, ③ $P < 0.01$ ; 与高剂量组比较, ④ $P < 0.01$

2.4 各组卵巢颗粒细胞培养液中  $E_2$  和 MDA 水平比较 见表 3。与空白组比较, 模型组卵巢颗粒细胞培养液中  $E_2$  水平明显下降, MDA 明显上升, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 当归补血汤高、中、低剂量治疗组颗粒细胞培养液中  $E_2$  水平明显上升, MDA 明显下降, 以中剂量组的改善作用最明显, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 3 各组卵巢颗粒细胞培养液中  $E_2$  和 MDA 水平比较  $(\bar{x} \pm s)$

组别	$E_2$ (pg/L)	MDA(mmol/L)
空白组	9.65 $\pm$ 0.528	1.370 $\pm$ 0.069
模型组	4.24 $\pm$ 1.213 <sup>①</sup>	2.670 $\pm$ 0.088 <sup>①</sup>
低剂量组	6.08 $\pm$ 1.223 <sup>②</sup>	2.402 $\pm$ 0.300 <sup>②</sup>
中剂量组	7.44 $\pm$ 1.037 <sup>②③④</sup>	1.980 $\pm$ 0.112 <sup>②③④</sup>
高剂量组	5.74 $\pm$ 0.510 <sup>②③</sup>	2.300 $\pm$ 0.215 <sup>②③</sup>

与空白组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.01$ ; 与低剂量组比较, ③ $P < 0.01$ ; 与高剂量组比较, ④ $P < 0.01$

2.5 各组颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达相对灰度值比较 见表 4、图 3。与空白组比较, 模型组颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达水平明显上升, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 中剂量组卵巢颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

3 讨论

细胞凋亡是由多个信号通路调控的一个程序性细胞死亡过程, Caspases 激活的线粒体途径是调节机制比较明确的细胞凋

表4 各组颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达相对灰度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase-3 蛋白
空白组	0.017 2 ± 0.008
模型组	0.841 0 ± 0.010 <sup>①</sup>
低剂量组	0.717 3 ± 0.006
中剂量组	0.553 0 ± 0.006 <sup>②③④</sup>
高剂量组	0.787 0 ± 0.009 <sup>③</sup>

与空白组比较, ① $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.01$ ;  
与低剂量组比较, ③ $P < 0.01$ ; 与高剂量组比较, ④ $P < 0.01$



图3 各组颗粒细胞 Caspase-3 蛋白表达结果

亡过程。Caspases 家族承担着重要的凋亡调控作用, 其中 Caspases-3 是最重要的凋亡执行者。Bcl-2 是通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断上游 Caspase 蛋白酶的激活, 来抑制细胞凋亡的<sup>[3]</sup>。一旦 Caspase-3 被激活, 将使细胞内的蛋白质降解, 使细胞不可逆地走向死亡。有文献报道, 颗粒细胞是卵泡外层最丰富的细胞, 提供卵母细胞发育所需要的营养及平衡细胞微环境, 促进卵母细胞的发育及成熟, 颗粒细胞开始程序性死亡是卵泡闭锁的标志<sup>[4]</sup>。当归补血汤是李东恒所创由黄芪、当归以 5:1 配伍而成, 是补气生血代表方, 实验研究表明其主要有效成分当归多糖和阿魏酸对血细胞生成过程的直接影响最为显著<sup>[5]</sup>。

本实验使用含药血清观察当归补血汤对大鼠卵巢离体颗粒细胞增殖的影响, MTS 法检测结果表明当归补血汤可促进 CDDP 损伤大鼠离体卵巢颗粒细胞增殖, 其促细胞增殖呈时间浓度相关性。尤其在 48 h 增殖最显著, 而且与浓度有关, 当浓度为 2.5% 的含药血清时细胞增殖作用最显著, 但是当浓度大于 10% 或小于 2.5% 时, 细胞的增殖能力没有进一步增加。以往报道当归补血汤可以促进离体大鼠颗粒细胞增殖作用, 但其具体机制不明。衰老的自由基学说为目前国际学术界所公认, 有研究证明, 衰老小鼠卵巢 MDA 含量明显升高<sup>[6]</sup>; 氧自由基的变化可促使活性氧对蛋白、膜脂和 DNA 的损伤, 在不同程度上引起卵巢功能的减退<sup>[7]</sup>。细胞凋亡是由基因控制的细胞主动性死亡过程, 氧化应激过程中产生过多的氧自由基可诱导细胞发生凋亡<sup>[8]</sup>。

本实验研究表明 CDDP 损伤大鼠颗粒细胞明显促进 MDA

和 Caspase 蛋白的表达, 而且在颗粒细胞增殖被抑制明显阶段, 这 2 种蛋白呈现高表达。CDDP 抑制大鼠卵巢颗粒细胞中 MDA 呈明显升高趋势, 过氧化效应可直接导致 MDA 增加, 从而使细胞外基质呈强表达, 由此推测, 氧化损伤作用增强是导致颗粒细胞凋亡的主要原因之一。推测当归补血汤可能通过抑制 CDDP 损伤大鼠卵泡颗粒细胞 MDA 合成, 避免氧化应激损伤, 减少颗粒细胞凋亡, 来促进卵母细胞生长和成熟。

本研究表明, 当归补血汤可能是通过当归和黄芪抑制凋亡分子途径的激活, 有效地调节氧化应激所致的凋亡事件, 从而停止活性氧(Reactive oxygen species, ROS)自由基的活性, 减少线粒体膜电位的损失, 抑制 MDA 减少氧化应激损伤, 降低氧化应激的发生, 降低 Caspase-3 蛋白酶表达, 减少颗粒细胞凋亡, 其具体作用机制, 以及时间量效关系有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Choi JY, Jo MW, Lee EY, et al. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells[J]. Fertility and Sterility, 2010, 93(8): 2532-2537.
- [2] 郝翠芳, 王明正. 卵巢恶性肿瘤患者超氧化物歧化酶和脂质过氧化物的测定[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(4): 235-236.
- [3] 刘丹, 王高频, 常清华, 等. 原花青素对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因蛋白表达的影响[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(7): 696-699.
- [4] Ito M, Muraki M, Takahashi Y, et al. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility[J]. Fertility and Sterility, 2008, 90(4): 1026-1035.
- [5] 宁炼, 陈长勋, 金若敏, 等. 当归补血汤促进造血功能的成分及其作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 50-53.
- [6] 敖恩宝力格, 包秋华, 王金妞, 等. 蒙药高尤-9 对衰老大鼠卵巢抗氧化活性及端粒酶活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(20): 3997-3999.
- [7] 吴维光, 曹秀琴, 史海霞. 邻苯二甲酸二乙基己酯对体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞氧化应激的影响[J]. 中国生育健康杂志, 2013, 24(1): 40-42.
- [8] 李育, 王明艳, 马红, 等. 卵巢颗粒细胞凋亡的调控机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(4): 160-161.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)