doi:10.11659/jjssx.12E023006

·基础研究·

外源性黄体生成素对玻璃化冻存颗粒细胞的影响及机制研究

陈 杰[1,2],高 尚[1],张少杰[1,3],杨 喜[1],李 琨[1,3],史 君[4],王 星[1,3] (1.内蒙古医科大学基础医学院人体解剖学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110;2.内蒙古医科大学干细胞研究中心,内蒙古 呼和浩特 010110;3.内蒙古医科大学基础医学院数字医学中心,内蒙古 呼和浩特 010110;4.内蒙古医科大学基础医学院生理学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110)

[摘 要] **目的** 观察外源性黄体生成素(LH)对玻璃化冻存颗粒细胞的影响及其作用机制。**方法** 取4周龄青春期前小鼠颗粒细胞,分为新鲜组(不进行玻璃化冻存)、玻璃化冻存组(按玻璃化冻存程序处理)和LH组(在玻璃化冻存组的基础上添加0.3 IU/mL LH干预)。进行颗粒细胞计数,采用Realtime PCR及Western blot检测各组Foxl2、PI3K、AKT及mTOR mRNA和蛋白的表达变化。**结果** 与玻璃化冻存组相比,LH组颗粒细胞总数显著增加($P<0.05$),Foxl2、PI3K、AKT、mTOR mRNA及蛋白的表达显著升高($P<0.05$)。**结论** 外源性LH干预有利于冻存颗粒细胞的存活,其机制可能与激活PI3K/AKT/mTOR通路有关。

[关键词] 颗粒细胞;玻璃化冻存;黄体生成素;Foxl2;PI3K/AKT/mTOR通路
[中图分类号] R711.75 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-12-02

Effect of exogenous luteinizing hormone on vitrification granulosa cells and its mechanism

CHEN Jie[1,2], GAO Shang[1], ZHANG Shao-jie[1,3], YANG Xi[1], LI Kun[1,3], SHI Jun[4], WANG Xing[1,3] (1. Department of Anatomy of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China; 2. Stem Cell Research Center, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China; 3. Digital Medicine Center of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China; 4. Department of Physiology of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of exogenous luteinizing hormone (LH) on vitrification granulosa cells and its mechanisms. **Methods** The granulosa cells of 4-week-old preadolescent mice were selected and divided into the fresh group (without vitrification procedure), the vitrification group (treated according to vitrification procedure) and the LH group (treated with 0.3 IU/L of LH intervention on the basis of the vitrification group). Granulocyte count was performed, and Realtime PCR and Western blot were used to detect the expression changes of Foxl2, PI3K, AKT and mTOR mRNAs and proteins in each group. **Results** Compared with the vitrification group, the total number of granulosa cells in the LH group was significantly increased ($P<0.05$), and the expression of Foxl2, PI3K, AKT and mTOR mRNAs and proteins were elevated ($P<0.05$). **Conclusion** The intevention of exogenous LH is beneficial for the survival of vitrification granulosa cells, and the mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT/mTOR pathway.

Keywords: granulosa cells; vitrification; luteinizing hormone; Foxl2; PI3K/AKT/mTOR pathway

对于没有合格卵子冻存的未成年或青年女性癌症患者,在接受抗癌治疗前冻存卵巢组织,待放化疗结束后将冻存卵巢组织回植,是保持生育力的唯一选择[1]。卵巢在体外冷冻和储存过程中会受到缺血、缺氧、冰晶形成等损伤,导致卵泡丢失、坏死、闭锁等。颗粒细胞和卵母细胞在发育过程中功能协调统一,相互补充[2-3]。促进颗粒细胞的存活是保证冻存卵泡生长的前提。因此,本研究期望通过提高颗粒细胞的冷冻效率,以提高卵泡存活率。既往研究显示,在卵巢发育过程中,黄体生成素(luteinizing hormone,LH)能促进卵泡生长发育[4]。同时,颗粒细胞凋亡是促进小鼠卵巢卵泡闭锁的重要原因之一[5-6],LH可通过抑制颗粒细胞凋亡间接抑制卵泡闭锁,还可促进颗粒细胞表达更多LH受体[7],增加卵泡对LH的敏感性。玻璃化冻存的优点是保护窦前卵泡,这与LH主要作用于窦前卵泡的报道一致[8]。Foxl2在胎儿和新生儿卵巢颗粒细胞中稳定表达。作为颗粒细胞的独特标记物,Foxl2上调可有效保证颗粒细胞的旁分泌信号,维持滤泡膜的稳定性,促进卵泡发育[9]。PI3K/AKT/mTOR通路[10-12]与生殖内分泌密切相关,该通路的上调可有效促进颗

[基金项目] 国家自然科学基金(81860382;81860383);内蒙古自然科学基金(2020MS03061;2020MS08109;2019MS08017;2019MS08139;2022SHZR0151);内蒙古自治区科技发展计划项目(2019GG158);内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202201217);内蒙古自治区高等学校青年科技英才项目(NJYT22009);内蒙古医科大学科研重点项目(YKD2021ZD011)

[通信作者] 王 星,E-mail:wangxing197911@163.com;史 君,E-mail:13948616829@163.com

粒细胞增殖分化,抑制颗粒细胞凋亡,是颗粒细胞协调卵泡发育、促进冷冻卵巢功能血管重建的关键靶点[13]。因此,本研究旨在探讨LH对冻存颗粒细胞的保护作用,为未成年或青年女性癌症患者保存生育能力提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

60只4周龄C57BL/6 J雌性小鼠购自内蒙古医科大学实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(蒙)2020-0006]。动物饲养在动物中心,于无菌、温度(24±2)℃的环境中饲养,定期照明。小鼠可自由获得食物和水。本研究经内蒙古医科大学医学伦理委员会批准(批准号:YKD202404020)。

1.2 分组

小鼠饲养1周后,经CO_2窒息法实施安乐死,背部消毒,切开肋脊角迅速取出卵巢,随机分为3组,每组40只卵巢。新鲜组:新鲜卵巢组织取材后不进行玻璃化冻存,直接取原代颗粒细胞;玻璃化冻存组:取卵巢组织后按玻璃化冻存程序处理再取原代颗粒细胞,无LH干预;LH组:取卵巢组织后按玻璃化冻存程序处理,再取原代颗粒细胞,全程添加0.3 IU/mL LH干预。各组经胶原酶、胰酶两步法消化卵巢组织,获得原代颗粒细胞,过夜培养,然后分别进行:①颗粒细胞计数;②提取总RNA进行Realtime PCR;③提取总蛋白完成Western blot检测。

1.3 玻璃化冻存步骤

小鼠卵巢置于卵巢组织培养液DMEM+F12(含12%人血清白蛋白)在37 ℃ CO_2培养箱中培养60 min,预平衡8 min,玻璃化液平衡3.5 min后置于液氮冷冻过夜;解冻时,将冻存的卵巢组织依次浸入浓度梯度递减的解冻液中37 ℃洗脱玻璃化液,在37 ℃ CO_2培养箱中培养120 min,完成冻存解冻程序。

1.4 颗粒细胞体外培养

各组卵巢按分组要求处理后,将卵巢组织快速切割分离,用口吸管获取卵丘-卵母细胞复合体,打入培养液滴,再用1 mL注射器针头划破卵泡膜释放颗粒细胞,将颗粒细胞转入6孔板过夜培养。

1.5 颗粒细胞计数

清理细胞计数板和盖玻片,去除纤维、指纹或水印。用0.25% Trypsin消化颗粒细胞,适时终止。轻轻打散细胞悬浮液,使细胞尽量分散为单个细胞,吸取10 μL细胞悬液至计数板上样口,待细胞浸入计数池,填满整个网格,静置后开始计数。细胞总数=每毫升细胞个数×样品总体积×稀释倍数。

1.6 Realtime PCR

Trizol法提取各组颗粒细胞总RNA,用分光光度计测定RNA纯度和浓度。反转录合成cDNA第1链,采用定量聚合酶链反应检测。引物由上海生物科技有限公司合成(表1)。以小鼠GAPDH为内参基因,与目的基因平行扩增。取1 μL cDNA,加入TB Green premix Ex Taq Ⅱ 5 μL、上游引物0.5 μL(10 mol/L)、下游引物0.5 μL(10 mol/L),加ddH_2O至10 μL。充分混匀后按下列反应条件进行PCR反应:95 ℃ 5 s;60 ℃ 30 s;72 ℃ 30 s,共40个循环。溶解曲线显示为单一峰表示PCR反应特异性好,所有实验重复3次,取平均值。

表1 Realtime PCR的引物序列

目的基因	引物序列
Foxl2	正向引物:5′-ACAACACCGGAGAAACCAGAC-3′ 反向引物:5′-CGTAGAACGGGAACTTGGCTA-3′
PI3K	正向引物:5′-ACACCACGGTTTGGACTATGG-3′ 反向引物:5′-GGCTACAGTAGTGGGCTTGG-3′
AKT	正向引物:5′-ATGAACGACGTAGCCATTGTG-3′ 反向引物:5′-TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT-3′
mTOR	正向引物:5′-ACCGGCACACATTTGAAGAAG-3′ 反向引物:5′-CTCGTTGAGGATCAGCAAGG-3′
GAPDH	正向引物:5′-GGCATTGTGGAAGGGCTC-3′ 反向引物:5′-GACCTTGCCCACAGCCTT-3′

1.7 Western blot

提取各组颗粒细胞总蛋白,检测蛋白含量,并根据浓度计算各组的上样量。蛋白变性后经12% SDS-PAGE分离,与下列一抗在4 ℃下孵育过夜:兔抗Foxl2多克隆抗体(稀释浓度为1∶1 000,英国Abcam)、PI3K(稀释浓度为1∶200,武汉三鹰)、AKT(稀释浓度为1∶5 000,武汉三鹰)、mTOR(稀释浓度为1∶5 000,武汉三鹰)。使用超敏ECL化学发光试剂盒(武汉三鹰)进行检测。以GAPDH为内参,用Image J软件分析结果。

1.8 统计学分析

各组实验均重复3次。采用SPSS 21.0软件进行*Fisher*最小显著性差异检验,并进行方差齐性检验,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,2组间比较采用*SNK*法。以α=0.05为检验水准,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LH干预后冻存小鼠颗粒细胞的镜下观察

原代颗粒细胞培养结果显示,与玻璃化冻存组相

比,LH组颗粒细胞贴壁生长好,形态好。颗粒细胞计数结果显示,LH组、新鲜组、玻璃化冻存组贴壁细胞数依次减少(P<0.05);玻璃化冻存组死亡颗粒细胞数显著多于新鲜组和LH组(P<0.05),LH组、新鲜组、玻璃化冻存组颗粒细胞总数依次减少(P<0.05),见表2、图1。

2.2 LH干预后颗粒细胞特异因子Foxl2的表达

Realtime PCR结果显示,3组间比较,LH组Foxl2 mRNA相对表达量最高(P<0.05),玻璃化冻存组最低(P<0.05)。Western blot结果显示,LH组、新鲜组、玻璃化冻存组Foxl2蛋白表达量依次降低(P<0.05),见图2。

表2 各组颗粒细胞计数($\bar{x}\pm s$)

组别	贴壁颗粒细胞	死亡颗粒细胞	颗粒细胞总数
新鲜组	25.09±0.13	15.01±0.31	40.10±1.03
玻璃化冻存组	12.34±0.51*#	22.13±0.75*#	34.47±0.52*#
LH组	34.65±1.02*	10.37±0.05	45.02±0.25*
P	<0.001	<0.001	0.007

*:与新鲜组比较,P<0.05;#:与LH组比较,P<0.05

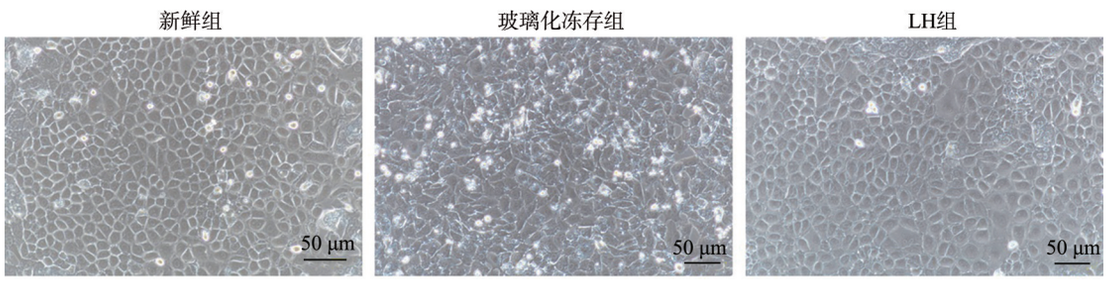
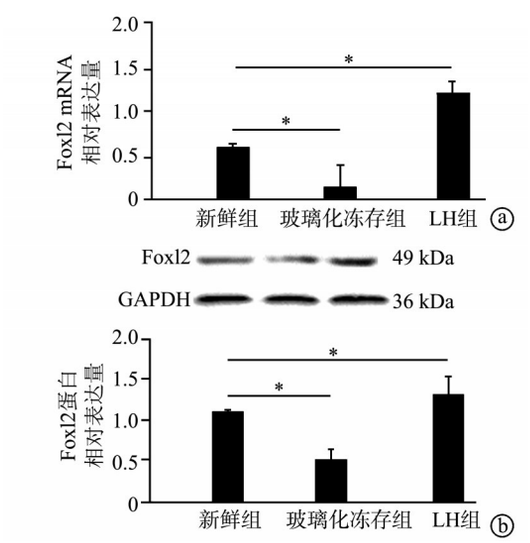


图1 各组原代颗粒细胞培养结果



a:Foxl2 mRNA;b:Foxl2蛋白 *:P<0.05

图2 LH干预后Foxl2 mRNA及蛋白表达

2.3 LH干预后PI3K/AKT/mTOR通路mRNA和蛋白的表达

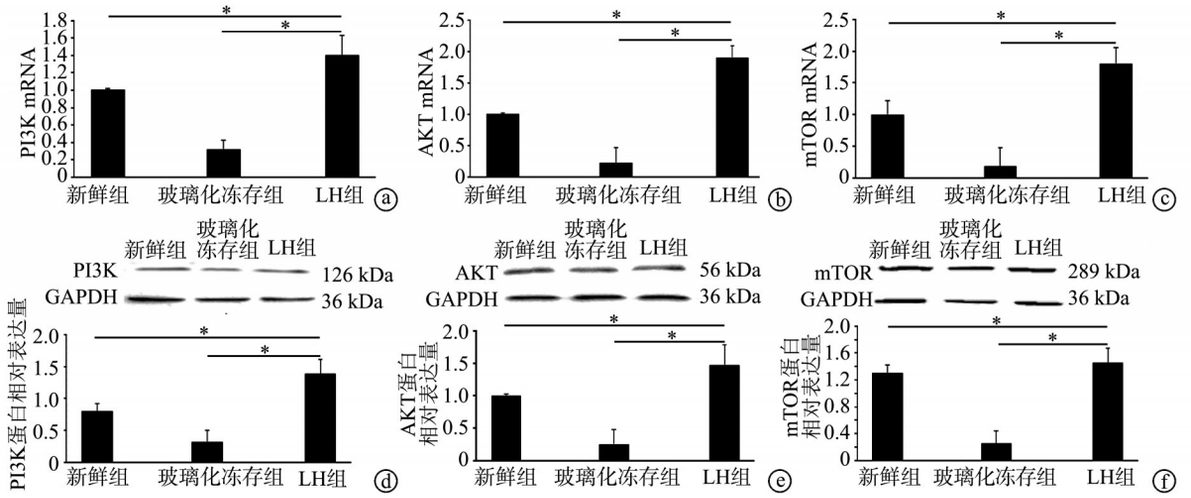
LH组的PI3K、AKT、mTOR mRNA和蛋白表达量显著高于新鲜组和玻璃化冻存组(P<0.05),见图3。

3 讨论

玻璃化冻存可以在高浓度冷冻保护剂的作用下实现卵巢组织的快速冷冻,在一定程度上减少细胞凋亡和冰晶形成等因素导致的卵泡丢失。然而,解冻后失去的卵泡数量高达60%[14-15],因此,提高冷冻效率和卵泡存活率仍然是一个巨大的挑战。由于颗粒细胞的冻存效果直接影响卵泡的存活,为此我们完成卵巢组织冻存后提取的颗粒细胞进行实验。有研究显示,外源性LH通过抑制颗粒细胞凋亡对冻存后卵泡形态和数量的保护最为有效[16]。作为一种保护剂,LH可以最大限度地减少颗粒细胞经玻璃化冻存后的凋亡细胞数量;研究显示,体外LH干预在抗癌治疗后可使卵巢卵泡数量显著增加[17]。

Foxl2在卵巢颗粒细胞中特异性表达,与卵泡发育和颗粒细胞增殖密切相关[18]。Foxl2是最早发现的维持卵巢功能的常染色体基因之一,在维持卵巢颗粒细胞功能,促进卵巢发育方面发挥重要作用[19]。本研究结果显示,LH组Foxl2蛋白表达显著升高,原因是本研究选择青春期前小鼠,虽然在青春期前阶段,LH与其受体敏感性低,结合效率差,但此时性腺处于相对静止状态,没有激素分泌,几乎无内源性激素干扰,使得外源性LH充分发挥作用,完成了对冻存损伤的抵抗。Foxl2作为出生前后颗粒细胞长期稳定表达的特异性蛋白,具有促血管生成作用,可改善血液灌注和代谢[20]。同时,Foxl2的高表达抑制了卵泡腔内caspase-3的过度激活[21],通过阻止凋亡程序的启动[22-23],增强卵巢膜细胞和颗粒细胞增殖[24-26],促进卵泡的生长发育,发挥对冻存卵泡的保护作用。

据报道,PI3K/AKT/mTOR通路在颗粒细胞能量代谢中发挥积极作用,同时有效促进颗粒细胞增殖,抑制细胞凋亡的发生[27]。本研究中,外源性LH干预能更有效激活PI3K/AKT/mTOR通路,正向强化其作用,有利于体外冻存颗粒细胞的存活。同时,与玻璃化冻存组相比,LH组可通过PI3K/AKT/mTOR通路对细胞死



a~c:Realtime PCR 结果;d~f:Western blot 结果 *:$P<0.05$

图3 各组PI3K、AKT、mTOR mRNA和蛋白表达

亡发挥有效的抵抗作用,证实了PI3K/AKT/mTOR通路作为与细胞增殖和凋亡相关的经典通路,在体外冻存颗粒细胞的保存中发挥着关键作用[28]。

综上所述,LH对玻璃化冻存颗粒细胞具有较好的保护作用,LH与其受体结合启动了促增殖、抗凋亡程序,在血管重建、物质交换等方面发挥了多重协同作用,表现为LH组各项指标均优于新鲜组。外源性LH可促进Foxl2的表达,发挥对冻存颗粒细胞的保护作用,是基于PI3K/AKT/mTOR通路实现的。虽然LH在整个玻璃化冻存过程中对颗粒细胞的保护作用显著,但LH对不同来源颗粒细胞的保护作用需要进一步探索,以优化玻璃化冻存的激素干预模式,提高冻存效率,为需要进行卵巢组织冻存的患者带来新的希望。

[参考文献]

[1] Cariati F, Carbone L, Iorio GG, et al. Cryopreservation of ovarian tissue: the biggest challenge of oncofertility [J]. Minerva Obstet Gynecol, 2023, 75(4): 371-378. doi: 10.23736/S2724-606X.22.05066-7.

[2] 张旭红,陈 杰. 小鼠卵巢体外培养过程中FSH干预对VEGF及其受体表达的影响[J]. 局解手术学杂志, 2020, 29(12): 950-953. doi: 10.11659/jjssx.04E020086.

[3] Fabová Z, Loncová B, Sirotkin AV. MicroRNA miR-125b can suppress ovarian granulosa cell functions: interrelationships with FSH[J]. Cell Biochem Funct, 2023, 41(2): 177-188. doi: 10.1002/cbf.3771.

[4] Qi Y, Xue HL, Zheng YJ, et al. The photoperiod regulates granulosa cell apoptosis through the FSH-Nodal/ALK7 signaling pathway in phodopus sungorus[J]. Animals (Basel), 2022, 12(24): 3570. doi: 10.3390/ani12243570.

[5] He Z, Yuan B. Diagnostic value of combined detection of pelvic ultrasound and serum LH, FSH, and E2 levels in children with idiopathic central precocious puberty [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 7928344. doi: 10.1155/2022/7928344.

[6] 王仕斌,王雪婷,薛蓉亮. 右美托咪啶对人宫颈癌细胞Hela生长和转移能力的影响[J]. 局解手术学杂志, 2018, 27(12): 854-858. doi: 10.11659/jjssx.03E018127.

[7] Tang Y, Lin Z, Liu L, et al. Attenuated AKT signaling by miR-146a-5p interferes with chicken granulosa cell proliferation, lipid deposition and progesterone biosynthesis [J]. Theriogenology, 2024, 214: 370-385. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.11.007.

[8] Martínez-Peña AA, Petrik JJ, Hardy DB, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol increases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion through a cyclooxygenase-dependent mechanism in rat granulosa cells [J]. Reprod Toxicol, 2022, 111: 59-67. doi: 10.1016/j.reprotox.2022.05.004.

[9] Irusta G, Abramovich D, Parborell F, et al. Direct survival role of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 25(1/2): 93-100. doi: 10.1016/j.mce.2010.04.018.

[10] Di Nisio V, Rossi G, Iorio R, et al. VEGFR2 expression is differently modulated by parity and nulliparity in mouse ovary[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6319414. doi: 10.1155/2018/6319414.

[11] Liu C, Peng J, Matzuk MM, et al. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6934. doi: 10.1038/ncomms7934.

[12] Bird AD, Frost ER, Bagheri-Fam S, et al. Somatic FGFR2 is required for germ cell maintenance in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2023, 164(5): bqad031. doi: 10.1210/endocr/bqad031.

[13] Diaz AA, Kubo H, Handa N, et al. A systematic review of ovarian tissue transplantation outcomes by ovarian tissue processing size for cryopreservation [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 918899. doi: 10.3389/fendo.2022.918899.

[14] Del Castillo LM, Buigues A, Rossi V, et al. The cyto-protective effects of LH on ovarian reserve and female fertility during exposure to gonadotoxic alkylating agents in an adult mouse model [J]. Hum Reprod, 2021, 36(9): 2514-2528. doi: 10.1093/humrep/deab165.

[15] De Bortoli MA, Garraza MH, Aguado LI. Epinephrine intracerebroventricular stimulation modifies the LH effect on ovarian progesterone and androstenedione release[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000, 74(1/2): 19-24. doi: 10.1016/s0960-0760(00)00084-4.