

哈蟆油通过激活 PI3K/Akt/NF- κ B 途径保护氧化应激损伤的大鼠卵巢颗粒细胞

零小妹^{1,2}, 张绪慧³, 杨晶晶^{1,2}, 吴新荣¹, 梁磊^{1*}

¹广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010;

²广东药科大学中药学院, 广州 510006; ³广东省第二人民医院肿瘤二科, 广州 510317

摘要: 本文探讨哈蟆油含药血清对 H₂O₂ 致大鼠卵巢颗粒细胞氧化应激损伤的保护作用与分子机制。将大鼠原代卵巢颗粒细胞分为 6 组: 正常对照组、H₂O₂ 模型组、阳性药对照组、哈蟆油含药血清低、中、高剂量组。CCK-8 法检测哈蟆油含药血清对 H₂O₂ 致颗粒细胞氧化应激损伤细胞活力的影响; 实时荧光 RT-PCR 法检测 PI3K、AKT3 mRNA 的表达水平; Western blot 检测 p-Akt (Ser473)、NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达。结果发现与正常对照组相比, H₂O₂ 刺激后细胞活性明显下降, 哈蟆油含药血清能够提高颗粒细胞存活率。机制研究发现, 哈蟆油含药血清通过恢复 H₂O₂ 诱导细胞增殖相关 PI3K、AKT3 mRNA 水平, 上调 p-Akt (Ser473)、IKK β 、NF- κ B (p65) 蛋白的表达, 下调 I κ B α 蛋白的表达。以上结果表明, 哈蟆油对 H₂O₂ 诱导卵巢颗粒细胞氧化应激损伤具有保护作用, 其作用机制可能与调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路密切相关。这可能是其抗氧化的作用机制之一。

关键词: 哈蟆油; 大鼠卵巢颗粒细胞; 氧化应激; H₂O₂

中图分类号: R931.74

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.007

Protective Effect of Oviductus Ranae on Oxidative Stress-induced Injury in Rat Ovarian Granulosa Cells by Activation of PI3K/Akt/NF- κ B Signal Transduction Pathway

LING Xiao-mei^{1,2}, ZHANG Xu-hui³, YANG Jing-jing^{1,2}, WU Xin-rong¹, LIANG Lei^{1*}

¹Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command,

Guangzhou 510010, China; ²School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong

Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; ³Department of 2nd Oncology, Guangdong

No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the function and mechanism of Oviductus Ranae (OR) on protecting rat ovarian granulosa cells from H₂O₂-induced oxidative damage. Granulosa cells were divided into six groups: control, model, positive control, as well as low, middle and high doses of OR-containing serum group. The granulosa cells were exposed to H₂O₂ for 2 h, and then treated with the OR-containing serum for 48 h. After that, the viability of granulosa cells was detected by CCK-8 assay. mRNA expressions of PI3K and AKT3 were assayed by real-time qPCR. The related proteins, such as NF- κ B (p65), I κ B α , IKK β , and p-Akt (Ser473), were detected by Western blotting. The results showed that the viability of granulosa cells was significantly decreased after stimulating H₂O₂. OR-containing serum can significantly increase the viability of granulosa cells. Furthermore, OR-containing serum can rescue the descending expression of PI3K and AKT3 mRNA induced by H₂O₂, and up-regulate the protein levels of p-Akt (Ser473), IKK β and NF- κ B (p65), and down-regulate the expression of I κ B α . These results indicated that OR protected granulosa cells from oxidative stress-induced injury by regulating the PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway, which may be one of the antioxidant mechanism of OR.

Key words: Oviductus Ranae; ovarian granulosa cells; oxidative stress; H₂O₂

收稿日期: 2016-11-21 接受日期: 2017-02-20

基金项目: 广州市珠江科技新星项目 (2013J2200030); 广州市科技计划 (201509010012)

* 通信作者 Tel: 86-20-36652218; E-mail: libraliang78@126.com

围绝经期间, 女性的卵巢功能衰退, 导致卵泡闭锁加剧, 卵泡数量急剧减少, 雌激素分泌减少, 卵巢渐趋停止排卵^[1]。研究表明许多环境和饮食等相

关因素可通过氧化应激相关的机制促进卵巢功能衰退^[2]。氧化应激在围绝经期病理生理中起着重要的作用^[3]。相关研究发现^[4],氧化应激损伤可通过下调抗氧化基因的表达,引发卵巢脂质过氧化、DNA的氧化损伤,导致卵巢功能衰退和卵母细胞质量下降。因此,研究有效的抗衰老、抗氧化药物对预防性的治疗围绝经期综合征至关重要。

传统中药哈蟆油(Oviductus Ranae, OR)具有抗氧化、清除自由基、抗衰老等多种生物活性作用^[5],临床上常用于治疗围绝经期综合征。前期研究表明^[6,7],哈蟆油可促进原代培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖,能明显升高更年期模型大鼠血清E₂水平、卵巢和子宫指数,降低卵巢子宫中MDA含量,提高其SOD活力,改善卵巢和子宫的病理改变,增强卵巢和子宫的抗氧化作用,延缓卵巢和子宫衰老的发生。但哈蟆油是否能有效抑制氧化应激所致的颗粒细胞损伤,尚未见报道。本研究通过建立体外大鼠卵巢颗粒细胞氧化应激模型,探讨哈蟆油含药血清对颗粒细胞氧化应激损伤的保护作用与机制,为有效防治围绝经期疾病提供有益的实验数据。

1 材料与仪器

1.1 药物和试剂

哈蟆油样品(批号:150701)产地为吉林长白山,购于广东大翔药业有限公司。血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotropin, 1000 IU/支,杭州动物药品厂);戊酸雌二醇(Estradiol Valerate, EV, 拜耳医药保健有限公司广州分公司,国药准字J20130009,批号:188A2);胎牛血清、DMEM/F12培养基、0.25%胰蛋白酶和青-链霉素购自美国Gibco公司;过氧化氢(H₂O₂, 货号:C10049419, 麦克林公司,中国上海);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所);引物设计(捷瑞公司);cDNA逆转录试剂盒(货号:RR047A)、SYBRGreen Taq qPCR Mastermix(货号:RR820A)购自中国上海TAKARA公司;Trizol(美国Invitrogen公司);细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司;超敏ECL化学发光试剂盒(Millipore公司,美国);一抗稀释液(碧云天生物技术有限公司);NF- κ B p65 Rabbit mAb(货号:8242)、I κ B α Rabbit mAb(货号:4812)、Phospho-Akt(Ser473) Rabbit mAb(货号:4060)、IKK β Rabbit mAb(货号:2370)、 β -actin Rabbit mAb(货号:4970)

和HRP-标记羊抗兔(货号:7074)均购于美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 仪器

3111型CO₂培养箱、Multiskan Go全波长酶标仪、FRESCO 17型低温高速离心机和Nanodrop 2000分光光度计均为美国Thermo Fisher Scientific;常温低速离心机,日本Kubota Corporation;MiniChem III化学发光成像仪,北京赛智创业科技有限公司;Rotor-Gene Q 2plex HRM实时定量PCR仪, QIAGEN公司。

1.3 实验动物

SPF级SD雌性大鼠,体重200~220 g;23~27日龄SPF级SD雌性未成年大鼠,体重40~50 g;均由广东省医学实验动物中心提供,实验动物中心使用许可证号:SCXK(粤2013-0002)。

2 实验方法

2.1 大鼠含药血清的制备

将哈蟆油药材经粉碎后,用植物油研磨溶解哈蟆油和戊酸雌二醇片成混悬液备用。按照体重将大鼠随机分为5组(8只/组):正常对照组、哈蟆油低剂量组(0.90 g/kg)、哈蟆油中剂量组(2.70 g/kg)、哈蟆油高剂量组(8.10 g/kg)及戊酸雌二醇组(0.54 mg/kg),给大鼠灌胃,连续给药7 d,正常对照组给予等量植物油。最后一次给药后间隔1.5 h,10%水合氯醛麻醉,经腹主动脉采血后,静置1 h,3500 rpm,离心15 min,分离血清并用无菌滤膜过滤除菌,在56℃水浴中灭活30 min,室温冷却后,于-80℃冰箱保存备用。

2.2 原代大鼠卵巢颗粒细胞的分离和培养

将未成年雌性SD乳鼠,经腹腔注射血清促性腺激素60 IU,48 h后脱颈处死,快速浸入酒精中消毒3 min,超净台下迅速剖取卵巢并去除卵巢周围组织(脂肪、及表面包膜),PBS清洗后置于预冷的DMEM/F12培养基中。通过机械分离结合胰蛋白酶法,先用注射器针头刺破卵泡,让颗粒细胞释放于培养基中,收集颗粒细胞悬液,在结合胰蛋白酶消化剩余组织块30 min,终止消化后经无菌细胞筛过滤,再次收集颗粒细胞悬液。合并两次收集的颗粒细胞悬液,1000 rpm离心5 min,收集细胞。加入DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素)重悬颗粒细胞,接种于培养瓶中,置于CO₂恒温培养箱中培养。

2.3 CCK-8 法检测颗粒细胞活性

颗粒细胞进入对数生长期后,接种于 96 孔板内,接种密度 8 000 个/孔。将细胞分组为:正常对照组、 H_2O_2 (150 μ M) 模型组、哈蟆油低、中、高剂量含药血清组及戊酸雌二醇(阳性对照)含药血清组。细胞进入对数期后,除对照组之外,其余各组加入 150 μ M H_2O_2 培养液,继续孵育 2 h 后,各组分别相应加入 20% 浓度体积分数的含药血清处理 48 h(对照组及模型组加入正常大鼠血清)。观察哈蟆油对颗粒细胞暴露于 H_2O_2 的保护作用。细胞存活率 = 药物处理组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。

2.4 RT-PCR 法检测 PI3K、AKT3 mRNA 表达水平

细胞分组参照“2.3”。预培养 24 h 后,各组分别相应加入 20% 浓度体积分数的含药血清处理 48 h 后,150 μ M H_2O_2 培养液(对照组除外)作用 2 h,收集颗粒细胞,用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)抽提 RNA 后,紫外分光光度计测总 RNA A260、A260/A280 吸光度值及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及纯度。按照反转录试剂盒操作说明书逆转录合成 cDNA,在 PCR 仪中,依次按以下条件进行反转录合成:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 15 min。将得到的 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C,以备进行 PCR 扩增反应。

采用 RT-PCR 法检测 PI3K、AKT3 mRNA,引物设计采用软件 Oligo7.0,根据引物设计的一般原则筛选上、下游引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列如下:PI3K Forward 5'-GCGTCAAGAT-CAGCTTATCCTT-3', PI3K Reverse 5'-TTTGTACTCG TGGCTAACACC-3'; AKT3 Forward 5'-ATCATGAGC GATGTTACCA-3', AKT3 Reverse 5'-TGAGGTTTCTC TTTATAGCCTA-3'; GAPDH Forward 5'-GACTCAT-GACCACAGTCCATGC-3', GAPDH Reverse 5'-AGAG-GCAGGGATGATGTTCTG-3'。采用两步法 PCR 扩增标准程序:按以下的反应条件设定反应程序。反应条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s;PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 s,然后 65 $^{\circ}$ C 31 s,共 40 次循环。双标曲法相对定量 PCR 产物,用 QIAGEN 公司的 Rotor-Gene Q Software 软件进行结果分析。各目的基因表达的相对定量值用于统计学分析。

2.5 Western-blot 检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达

将颗粒细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 60

mm 细胞培养皿中,按分组参照“2.3”,加入各种实验因素作用一定的时间。处理后用预冷 PBS 清洗 3 次,加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,充分裂解 30 min,取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶及 5% 浓缩胶,采用半干转膜法将电泳分离蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 4 h,加入相应抗体 NF- κ B p65 (1:1000),I κ B α (1:1000),p-Akt (Ser473) (1:1000),IKK β (1:1000), β -actin (1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜后加入二抗 IgG-HRP,室温摇床 2 h,ECL 发光,显影,用 Image-J 图像分析软件测定蛋白条带对应灰度值,计算各个样本条带的灰度值与 β -actin 条带的灰度值的比值,统计学分析结果。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析法(One-way ANOVA);若方差齐则采用 LSD 检验;若方差不齐,用 Dunnett's T2 法进行统计分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 哈蟆油含药血清对 H_2O_2 作用颗粒细胞活力的影响

如表 1 所示,暴露于 H_2O_2 后经不同浓度哈蟆油含药血清处理 48 h,其对颗粒细胞活力有明显作用。与正常对照组相比, H_2O_2 刺激后细胞活性明显下降。与 H_2O_2 模型组相比,哈蟆油中剂量含药血清组细胞活力明显提高($P < 0.01$),戊酸雌二醇作为阳性药对照,其对颗粒细胞活力也有一定的促进作用($P < 0.05$)。表明哈蟆油含药血清对 H_2O_2 诱导的颗粒细胞氧化应激损伤具有保护作用。

3.2 哈蟆油含药血清对 H_2O_2 诱导 PI3K、AKT3 mRNA 水平的影响

为了检测颗粒细胞中 PI3K、AKT3 mRNA 的表达水平,我们采用实时荧光定量 PCR 的方法,选用 GAPDH 进行校正。如表 2 所示,与正常对照组相比, H_2O_2 模型组 PI3K、AKT3 mRNA 水平显著下降,与 H_2O_2 模型组比较,哈蟆油和戊酸雌二醇含药血清组颗粒细胞中 PI3K mRNA 水平显著升高;哈蟆油高剂量含药血清组 AKT3 mRNA 水平较 H_2O_2 模型组显著上升($P < 0.05$),而戊酸雌二醇含药血清组 AKT3 mRNA 水平较 H_2O_2 模型组无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 哈蟆油含药血清对 H_2O_2 作用颗粒细胞活力的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of the OR-containing serum on H_2O_2 -induced cell viability of granulosa cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	48h Viability (%)
正常对照组 Control group	100.00 ± 0.01 *
H_2O_2 模型组 H_2O_2 model group	90.31 ± 0.04 [#]
戊酸雌二醇含药血清组 EV-containing serum	104.30 ± 0.04 **
OR 低剂量含药血清组 Low dose of OR-containing serum group	101.42 ± 0.06 *
OR 中剂量含药血清组 Middle dose of OR-containing serum group	106.33 ± 0.09 **
OR 高剂量含药血清组 High dose of OR-containing serum group	88.64 ± 0.01

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

表 2 哈蟆油含药血清对 H_2O_2 诱导 PI3K、AKT3 mRNA 水平的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of OR-containing serum on H_2O_2 -induced the mRNA expression of PI3K and AKT3 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	PI3K/GAPDH	AKT3/GAPDH
正常对照组 Control group	1.00 ± 0.07 **	1.00 ± 0.05 **
H_2O_2 模型组 H_2O_2 model group	0.34 ± 0.03 ^{##}	0.49 ± 0.05 ^{##}
戊酸雌二醇含药血清组 EV-containing serum	0.47 ± 0.01 **	0.47 ± 0.04
OR 低剂量含药血清组 Low dose of OR-containing serum group	0.44 ± 0.04 *	0.46 ± 0.03
OR 中剂量含药血清组 Middle dose of OR-containing serum group	0.53 ± 0.02 **	0.54 ± 0.06
OR 高剂量含药血清组 High dose of OR-containing serum group	0.79 ± 0.03 **	1.07 ± 0.08 **

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

3.3 哈蟆油含药血清对 H_2O_2 诱导的 IKK β 、NF- κ B (p65)、I κ B α 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达水平的影响

为了进一步探讨哈蟆油含药血清是否通过抑制 H_2O_2 诱导的颗粒细胞 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的激活,从而对颗粒细胞起到保护作用。经 Western blot 检测发现,与对照组比较, H_2O_2 模型组 IKK β 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较,哈蟆油含药血清组的 IKK β 、NF- κ B (p65)、p-Akt (Ser473) 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$),而哈蟆油含药血清组 I κ B α 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$),戊酸雌二醇含药血清组 I κ B α 蛋白表达水平与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 3 和图 1。

4 讨论与结论

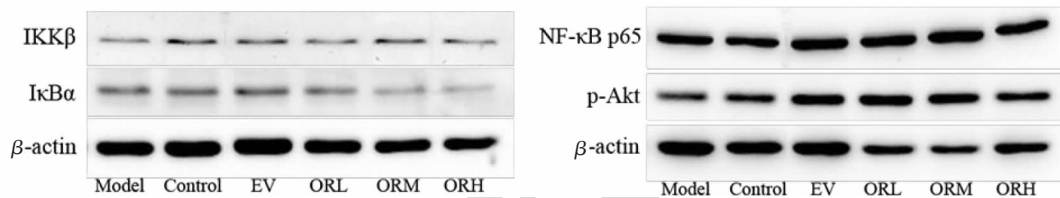
妇女进入围绝经期,颗粒细胞凋亡是诱导卵泡闭锁的重要因素^[8]。卵巢颗粒细胞的凋亡在卵泡的发育、排卵、黄化及闭锁中扮演着重要的作用。颗粒细胞的凋亡可被细胞外到内的各种刺激物触发。相关研究发现^[9],多种因素可调控颗粒细胞的凋亡,其中氧化应激是造成颗粒细胞凋亡的重要原因。已有研究表明^[10]氧化应激参与卵泡的闭锁,氧化应激可触发颗粒细胞凋亡,并且随着年龄的增加,氧化应激可造成女性生殖系统的破坏。因此,减少颗粒细胞氧化应激的产生,缓解氧化应激对颗粒细胞的

表3 哈蟆油含药血清对 H₂O₂ 诱导的 IKK β 、NF- κ B (p65)、I κ B α 和 p-Akt 蛋白表达水平的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of the OR-containing serum on H₂O₂-induced the protein expression of IKK β , NF- κ B (p65), I κ B α and p-Akt (Ser473) in granulosa cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	IKK β / β -actin	I κ B α / β -actin	NF- κ B (p65)/ β -actin	p-Akt (Ser473)/ β -actin
正常对照组 Control group	0.64 \pm 0.05 * *	0.53 \pm 0.02	0.95 \pm 0.09	0.62 \pm 0.04
H ₂ O ₂ 模型组 H ₂ O ₂ model group	0.40 \pm 0.04 ^{##}	0.54 \pm 0.06	0.82 \pm 0.07	0.50 \pm 0.08
戊酸雌二醇含药血清组 EV-containing serum	0.55 \pm 0.05 *	0.46 \pm 0.02	0.94 \pm 0.06	0.73 \pm 0.03 *
OR 低剂量含药血清组 Low dose of OR-containing serum group	0.58 \pm 0.08 * *	0.46 \pm 0.07	1.28 \pm 0.16 * *	1.03 \pm 0.15 * *
OR 中剂量含药血清组 Middle dose of OR-containing serum group	0.97 \pm 0.10 * *	0.41 \pm 0.08 *	1.77 \pm 0.13 * *	1.12 \pm 0.08 * *
OR 高剂量含药血清组 High dose of OR-containing serum group	0.71 \pm 0.08 * *	0.36 \pm 0.02 * *	1.07 \pm 0.06 *	1.02 \pm 0.20 * *

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

图1 IKK β 、NF- κ B (p65)、I κ B α 和 p-Akt(Ser473) 蛋白表达的 Western blot 分析Fig. 1 Western blot analyses of the protein expression of IKK β ,NF- κ B (p65), I κ B α and p-Akt (Ser473) in granulosa cells

损伤,从而减少卵泡的闭锁,达到延缓卵巢衰老的作用对于治疗女性围绝经综合征具有重要意义。

前期研究发现哈蟆油对大鼠卵巢颗粒细胞有一定的促增殖作用^[6],并且以哈蟆油为君药的复方能通过增加雌二醇的合成,上调抗氧化酶的活性,促进卵泡的发育,改善卵巢功能,延缓卵巢衰老的发生,从而改善围绝经期模型大鼠的不适症状^[11]。

研究发现多种信号通路与 ROS 介导的压力信号传导密切相关,如 NF- κ B 和 PI3K/Akt 信号通路^[12]。Akt 是 PI3K 重要的下游分子,分为 Akt1、Akt2、Akt3 三种亚型,Akt3 在调节细胞数目与大小起着关键作用^[13]。PI3K/Akt 信号通路在细胞增殖、分化、凋亡和其他胞外信号进行反应时起关键作用^[14],p-Akt(Ser473)是 Akt 活化形式之一。Akt 活化后通过多种途径参与细胞内、外多种信号通路的调节。据报道 ROS 可以通过生长因子受体途径引起 Akt 通路的活化,对几种细胞株的研究显示 H₂O₂ 通过内皮生长因子受体经 PI3K 途径激活了 Akt^[15],在化学性缺氧损伤的神经细胞模型中,激活 PI3K/

Akt 信号通路可保护 PC12 细胞对抗化学性缺氧损伤^[16]。研究表明,当细胞遭受氧化损伤,PI3K/Akt 通路的活化对细胞存活非常重要。

本课题研究发现,哈蟆油处理能保护颗粒细胞对抗 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤作用,其保护机制可能涉及多条信号通路。为了探讨 PI3K/Akt 通路是否参与哈蟆油保护颗粒细胞对抗 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤作用,本实验首先观察哈蟆油含药血清能否激活 PI3K/Akt 信号通路。研究结果表明,哈蟆油含药血清能明显增加颗粒细胞 Akt 的活化。但是随着哈蟆油含药血清浓度的增加,对 p-Akt 水平的促进作用逐渐减弱,表明哈蟆油含药血清可以引起颗粒细胞 Akt 的活化。为了进一步研究 Akt 的活化是否由 PI3K 途径介导,通过 RT-PCR 法观察哈蟆油预处理颗粒细胞后 PI3K 和 AKT3 mRNA 水平的变化,发现哈蟆油可对抗 H₂O₂ 诱导 PI3K 和 AKT3 mRNA 水平的下降。

NF- κ B 作为 PI3K/Akt 信号通路下游的核转录因子,是一种广泛存在于真核细胞内的基因多向性

转录因子,可以激活多种细胞进程的基因转录,参与细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应等^[17]。NF- κ B 以 p50-p65 异源二聚体组成,在细胞质中 NF- κ B 与其抑制分子 I κ B α 结合处于静止状态^[18]。当细胞受到外界信号刺激时,PI3K/Akt 信号通路上的 Akt 蛋白发生磷酸化,引起一系列连锁的酶促反应,使 IKK 活化,促使下游 I κ B α 降解而与 NF- κ B 解离,NF- κ B 激活而移位进入细胞核内,恢复 NF- κ B 的转录活性,启动靶基因转录^[19]。

本研究结果显示,NF- κ B (p65)、IKK β 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达水平上升,I κ B α 蛋白表达水平下降,表明了 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路可能是 NF- κ B 重要活化途径,提示了该通路参与了颗粒细胞氧化应激损伤的过程,哈蟆油可能通过该通路缓解 H₂O₂ 诱导的颗粒细胞氧化应激损伤。因此,在未来研究中仍需进一步深入探讨哈蟆油如何通过保护卵巢颗粒细胞对抗氧化应激的发生,从而延缓卵巢衰老,达到防治围绝经期综合征的目的。

参考文献

- 1 Yu SY (于舒雁), Liu HL (刘会丽), Miao MS (苗明三). Molecular mechanism and features of menopausal syndrome treated by Chinese medicine. *China J Chin Med* (中医学报), 2012, 14: 12-13.
- 2 Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod*, 2012, 86: 27.
- 3 Žitňanová I, Rakovan M, Paduchová Z, et al. Oxidative stress in women with perimenopausal symptoms. *Menopause*, 2011, 18: 1249-1255.
- 4 Lim J, Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod*, 2011, 84: 775-782.
- 5 Chang L (常乐), Liu W (刘汶), Zhang L (张琳). Advances in studies on *Ranae Oviductus*. *J Shenyang Pharmaceutical Univ* (沈阳药科大学学报), 2011, 28: 405-409.
- 6 Peng J (彭娟), Deng HZ (邓虹珠), Ma DD (马丹丹), et al. The effects of *Oviductus Ranae* on the proliferation and secretion of ovarian granulosa cells in rats. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2013, 24: 532-535.
- 7 Liang L (梁磊), Zhang XH (张绪慧), Zhou Y (周毅), et al. Protective effect of *Oviductus Ranae* capsules on the reproductive organs of aged mice. *J South Med Univ* (南方医

- 科大学学报), 2008, 28: 982-985.
- 8 Sai T, Goto Y, Yoshioka R, et al. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 2011, 57: 421-427.
- 9 Markstrom E, Svensson E, Shao R, et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 2002, 123: 23-30.
- 10 Qian Y, Shao L, Yuan C, et al. Implication of differential peroxiredoxin 4 expression with age in ovaries of mouse and human for ovarian aging. *Curr Mol Med*, 2016, 16: 243-251.
- 11 Liang L, Zhang XH, Ji B, et al. Yifuning postpones ovarian aging through antioxidant mechanisms and suppression of the Rb/p53 signal transduction pathway. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 888-896.
- 12 Jayasooriya RG, Lee KT, Choi YH, et al. Antagonistic effects of acetylshikonin on LPS-induced NO and PGE2 production in BV2 microglial cells via inhibition of ROS/PI3K/Akt-mediated NF- κ B signaling and activation of Nrf2-dependent HO-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51: 975-986.
- 13 Mackay HJ, Eisenhauer EA, Kamel-Reid S, et al. Molecular determinants of outcome with mammalian target of rapamycin inhibition in endometrial cancer. *Cancer*, 2014, 120: 603-610.
- 14 Chen CH, Sung CS, Huang SY, et al. The role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in glial scar formation following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2016, 278: 27-41.
- 15 Wang XT, McCullough KD, Franke TF, et al. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem*, 2000, 275: 14624-14631.
- 16 Meng JL (孟金兰), Chen YJ (陈雅嘉), Chen H (陈红), et al. Role of PI3K/Akt in protective effect of hydrogen sulfide against PC12 cells injuries induced by chemical hypoxia. *Chin Phar Bull* (中国药理学通报), 2013, 29: 257-261.
- 17 Liu HN (刘海楠), Chen L (陈雷), Gao YH (高彦宏). NF- κ B 国外最新研究进展. *Chin J Clin Rational Drug Use* (临床合理用药杂志), 2011, 4: 159-160.
- 18 Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, et al. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, 2011, 30: 1615-1630.
- 19 Iyer AK, Azad N, Talbot S, et al. Antioxidant c-FLIP inhibits Fas ligand-induced NF- κ B activation in a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent manner. *J Immunol*, 2011, 187: 3256-3266.