

基于Notch信号通路探索菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制

杨一博, 徐颖*, 王璐, 邹钊, 徐盼瑜, 杜寒倩, 李佳珊, 林娜*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对雌性生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用,并从神经源性位点缺口同源蛋白(Notch)信号通路探讨其作用机制。**方法:**将60只5周龄雌性昆明种小鼠随机分为正常组,1、2倍临床等效剂量雷公藤多苷片组(低、高剂量组 $13.65, 27.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),菟丝子总黄酮(低、高剂量组 $150, 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),配伍组(雷公藤多苷片低剂量+菟丝子总黄酮低剂量组),每组10只,连续给药3周后取材,计算子宫、卵巢脏脑指数,光镜下观察卵巢组织病理形态学改变;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中雌二醇含量;免疫荧光法观察卵巢上皮的卵巢生殖干细胞标志物果蝇VASA基因同源类似物(Mvh)、八聚体结合转录因子4(Oct4)、酪氨酸激酶受体(c-kit)、同源框蛋白质(Nanog)及Notch信号通路分子神经源性基因Notch同源蛋白1(Notch1)、Hes家族BHLH转录因子1(Hes1)、锯齿典型Notch配体1(Jagged1)的表达。**结果:**与正常组比较,雷公藤多苷片低剂量组和高剂量组对小鼠子宫、卵巢的脏脑系数及形态学差异无统计学意义,仅可致小鼠闭锁卵泡数显著增加($P < 0.01$);雷公藤多苷片低剂量对卵巢生殖干细胞标志物和Notch信号通路分子的表达有降低趋势,雷公藤多苷片高剂量下Mvh、c-kit、Nanog的表达水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),Notch1、Hes1表达水平显著降低($P < 0.01$);菟丝子总黄酮低剂量组上述指标均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与雷公藤多苷片低剂量组比较,配伍组闭锁卵泡数显著降低($P < 0.01$),Mvh、Nanog表达水平显著升高($P < 0.01$),Notch1、Hes1表达水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**卵巢生殖干细胞是雷公藤多苷片生殖毒性的源头靶点,菟丝子总黄酮可参与调控卵巢生殖干细胞途径缓解雷公藤多苷片所致的生殖损伤,其作用机制可能与Notch信号通路相关。

[关键词] 雷公藤多苷片;菟丝子总黄酮;配伍;卵巢生殖干细胞;神经源性位点缺口同源蛋白(Notch)信号通路

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0009-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220944

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220402.1648.004.html>

[网络出版日期] 2022-04-06 15:22:09

Effect and Mechanism of Cuscutae Semen Total Flavonoids Combined with *Tripterygium wilfordii* Polyglycoside Tablets on Ovarian Germline Stem Cells of Physiological Mice by Notch Signaling Pathway

YANG Yibo, XU Ying*, WANG Lu, ZOU Zhao, XU Panyu, DU Hanqian, LI Jiashan, LIN Na*
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Cuscutae Semen total flavonoids combined with *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets (TWPT) on ovarian germline stem cells of female physiological mice through neurogenic locus notch homolog (Notch) signaling pathway. **Method:** Sixty female Kunming mice (5 weeks old) were randomly divided into normal group, *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets

[收稿日期] 2022-01-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81974537,82004248);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT20011);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A03802)

[第一作者] 杨一博,硕士,从事中药药理学研究,E-mail:yyb0230@163.com

[通信作者] *徐颖,研究员,博士生导师,从事中药生殖药理学和中药药性研究,E-mail:yxu@icmm.ac.cn;

*林娜,研究员,博士生导师,从事中药药理学及中药药性研究,E-mail:nlin@icmm.ac.cn

low-, high-dose groups ($13.65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $27.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 1 and 2 times clinical equivalent dose), Cuscutae Semen total flavonoids low- and high-dose groups ($150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and combination group ($13.65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ TWPT and $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Cuscutae Semen total flavonoids), with 10 in each group. After 3 weeks of continuous administration, the uterus/brain and ovarian/brain indexes were calculated, and the pathological changes of ovarian tissue were observed under light microscope. The content of estradiol in serum was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence assay was performed to observe the expressions of germline stem cell markers in ovarian epithelium, including mouse vasa homologue (Mvh), octamer-binding transcription factor 4 (Oct4), tyrosine-protein kinase receptor (c-kit), Nanog, Notch signaling pathway molecules, neurogenic locus notch homolog protein 1 (Notch1), hes family BHLH transcription factor 1 (Hes1), and jagged canonical Notch ligand 1 (JAG1). **Result:** Compared with the normal group, low and high doses of TWPT had no significant effect on the uterus/brain and ovary/brain indexes and the uterus and ovary morphologies of mice, while only the number of atretic follicles was increased ($P < 0.01$). The expressions of ovarian germline stem cell markers and Notch signaling pathway molecules had a decreasing trend in TWPT low-dose group, while the expressions of Mvh, c-kit, and Nanog were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the expressions of Notch1 and Hes1 were also reduced ($P < 0.01$) in TWPT high-dose group. However, the above indexes were increased in Cuscutae Semen total flavonoids low-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the low doses of TWPT group, the combination group had a decrease in the increased number of atretic follicles ($P < 0.01$), an improvement in the down-regulated expressions of Mvh and Nanog ($P < 0.01$), and an increase in the expressions of Notch1 and Hes1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Ovarian germline stem cells are the source target of the reproductive toxicity of TWPT. Cuscutae Semen total flavonoids participate in the regulation of the germline stem cell pathways to alleviate the reproductive toxicity caused by TWPT, and its mechanism of action may be related to the Notch signaling pathway.

[Keywords] *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets (TWPT); Cuscutae Semen total flavonoids; combination; ovarian germline stem cells; neurogenic locus notch homolog protein (Notch) signaling pathway

雷公藤多苷片是雷公藤最常用的代表性制剂,被世界卫生组织(WHO)认定为治疗关节炎“中国首创植物新药”,在治疗类风湿关节炎、慢性肾病、红斑狼疮等多种疾病中应用的日益广泛,但其不良反应尤其是临床首发及最突出的生殖损伤严重限制了雷公藤多苷片的临床应用,女性生殖毒性已成为雷公藤临床用药中遇到的重大挑战之一^[1]。目前对雷公藤所致雌性生殖系统损伤机制研究主要集中在抑制卵泡生长发育、引起卵巢细胞凋亡及干扰生殖内分泌3个方面。目前雷公藤多苷片毒性研究的剂量严重高于临床常用剂量,临床指导意义有限,且其生殖毒性成分及深入机制研究缺乏。有研究表明菟丝子总黄酮可降低雷公藤多苷造成的雌性生殖功能损伤,其作用机制与Smad家族成员4(Smad4)、生长分化因子-9(GDF-9)的表达干预卵巢颗粒细胞和卵母细胞的功能相关^[2],其减毒机制尚有待深入探讨。自2004年JOHNSON等^[3]提出原始卵泡池理论,打破了传统的“固定卵泡池学说”,卵巢生殖干细胞作为女性生殖的源头,已成为生殖毒

性研究的新靶点,神经源性位点缺口同源蛋白(Notch)信号通路广泛参与多种成体干细胞不对称分裂的过程,在生殖干细胞增殖、分化和凋亡过程中起着关键性作用,并与细胞衰老密切相关^[4-6],但目前尚无关于雷公藤从卵巢生殖干细胞的角度及Notch信号通路探索其生殖毒性的作用及机制研究。本实验从Notch信号通路探讨菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对雌性生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制。

1 材料

1.1 动物 5周龄雌性昆明种小鼠,共60只,SPF级,体质量26~30 g,购自北京维通利华生物科技股份有限公司,许可证号SYXK(京)2019-0003。动物饲养于中国中医科学院中药研究所实验动物中心,日光灯照明,空调控温,实验操作符合中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查委员会标准(伦理编号2020B136)。适应性饲养3 d后用于实验。

1.2 试剂 大鼠雌二醇(E_2)酶联免疫吸附测定法

(ELISA)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号7ZCBU6H6W2);苏木素、伊红染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为15111830、15111828);果蝇 VASA 基因同源类似物(Mvh)、八聚体结合转录因子4(Oct4)、酪氨酸激酶受体(c-kit)、同源框蛋白质(Nanog)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab27591、ab181557、ab231780、ab106465);Notch1、Hes 家族 BHLH 转录因子1(Hes1)、锯齿典型 Notch 配体1(Jagged1)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 3608S、11988S、70109S);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Earthox 公司,批号 320581);DAPI(美国 Sigma 公司,批号 D9542)。

1.3 仪器 BX60 型正置显微镜、FV1000(40X-100X)型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);BSA224S 型天平(赛多利斯科学仪器有限公司);BMJ-1B 型组织包埋机(天津天利航空机电有限公司);RM2016 型切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

1.4 中药溶液配制 雷公藤多苷片购于浙江得恩德制药股份有限公司,批号 1706103B,规格 10 mg/片。据说明书所示,人临床给药剂量为 1~1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,临床常用剂量为 1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,按人与小鼠的体表面积计算法换算给药剂量,以 1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹计算小鼠临床等效剂量为 13.65 mg·kg⁻¹·d⁻¹。将雷公藤多苷片研磨成粉,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成质量浓度为 1.365、2.73 g·L⁻¹ 的雷公藤多苷片的混悬溶液。

菟丝子总黄酮购于南京欣厚生物科技有限公司,批号 ZL20200926,纯度 95%。用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成质量浓度为 15、30 g·L⁻¹ 的溶液^[7]。

2 方法

2.1 动物分组与给药 将 60 只昆明种小鼠按随机数字表法分为 6 组:正常组、雷公藤多苷片 1 倍临床等效剂量组(雷公藤多苷片低剂量组),雷公藤多苷片 2 倍临床等效剂量组(雷公藤多苷片高剂量组),菟丝子总黄酮 150 mg·kg⁻¹组(菟丝子总黄酮低剂量组),菟丝子总黄酮 300 mg·kg⁻¹组(菟丝子总黄酮高剂量组),配伍组(菟丝子总黄酮低剂量+雷公藤多苷片低剂量组),每组 10 只,连续给药 3 周,正常组每天灌胃等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。

2.2 取材及组织处理 摘眼球取血,分离血清。取血后脱颈处死小鼠,使用无菌器械剥取全脑、子宫及双侧卵巢,去掉多余的组织和脂肪,称重后左侧

卵巢放在 10% 甲醛组织固定液中进行固定,右侧卵巢置于 -80 °C 冻存。计算子宫、卵巢脏脑指数:按照下列公式计算各脏脑指数:脏器指数=脏器质量(g)/全脑质量(g)×100%。

2.3 ELISA 检测大鼠血清 E₂ 水平 ELISA 检测各组大鼠血清中 E₂,检测方法按试剂盒说明书进行。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠卵巢组织病理形态学改变 将取材固定的左侧卵巢进行常规石蜡包埋,4 μm 厚度切片,脱蜡、水化后,行苏木素染色、伊红溶液染色,脱水、透明,中性树胶封片,显微镜下观察^[8]。显微镜下计数每个卵巢内总卵泡数、闭锁卵泡数、成熟卵泡数、黄体数、原始卵泡数,分别求取平均值及标准方差^[9]。

2.5 免疫荧光法检测卵巢组织中卵巢生殖干细胞标志物 Mvh、Oct4、c-kit、Nanog 及 Notch 信号通路分子 Notch1、Hes1、Jagged1 表达水平 卵巢石蜡切片,脱水,抗原修复,5% BSA 封闭,Mvh(1:50)、Oct4(1:250)、c-kit(1:500)、Nanog(1:50)、Notch1(1:400)、Hes1(1:1000)、Jagged1(1:200)抗体 4 °C 孵育过夜,结合荧光山羊抗兔二抗,滴加 DAPI 核染液,封片,荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 统计学分析 采集得到的图片使用 Image J 进行相应处理,采用 Graphpad Prism 6.00 软件分析实验数据,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠子宫、卵巢脏脑系数和血清 E₂ 的影响 与正常组比较,雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠子宫、卵巢脏脑系数及血清 E₂ 无明显影响。仅雷公藤多苷片高剂量对子宫、卵巢脏脑系数及血清 E₂ 有降低趋势,菟丝子总黄酮对子宫、卵巢脏脑系数有升高趋势,但差异无统计学意义。见表 1。

3.2 对小鼠卵巢组织病理学的影响 正常组小鼠卵巢皮质内可见大小不等的卵泡,颗粒细胞层次多且排列规则,卵泡液丰富,黄体发育好,黄体细胞充实,闭锁卵泡数目较少;与正常组比较,雷公藤多苷片组可见卵巢体积缩小,出现不同程度的萎缩,雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢总卵泡数、成熟卵泡数、黄体数无明显影响,雷公藤多苷片各剂量组小鼠卵巢闭锁卵泡数均显著增多(*P*<0.01),菟丝子总黄酮组小鼠闭锁卵泡数无明显影响,与雷公藤多苷片低剂量组比较,配伍组闭锁卵泡数显著降低(*P*<0.01);与正常组比较,雷公

表1 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠子宫、卵巢脏脑系数和血清E₂的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen* total flavonoids on uterine, ovarian organ and serum estradiol of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	卵巢脏脑系数/%	子宫脏脑系数/%	E ₂ /ng·L ⁻¹
正常组		6.46±1.48	32.80±13.19	712.64±95.83
雷公藤多苷片低剂量组	13.65	6.50±1.98	33.69±12.05	716.18±92.95
雷公藤多苷片高剂量组	27.3	6.13±1.14	30.01±6.02	694.46±123.05
配伍组	13.65+150	6.35±0.90	37.58±15.43	795.22±103.91
菟丝子总黄酮低剂量组	150	6.86±1.34	38.46±18.47	732.13±64.77
菟丝子总黄酮高剂量组	300	7.04±1.30	38.32±12.00	719.55±79.71

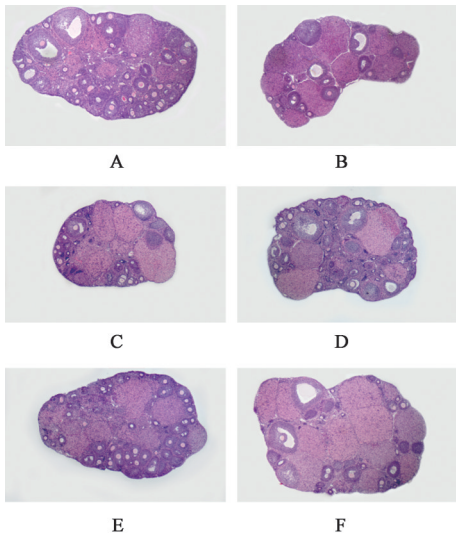
藤多苷片组小鼠卵巢初级卵泡数有降低趋势,与多苷片所致原始卵泡数的降低趋势明显改善雷公藤多苷片低剂量组比较,配伍组可使雷公藤(P<0.05)。见表2、图1。

表2 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢组织病理学的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets, *Cuscutae Semen* total flavonoids on ovarian histomorphology of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	总卵泡数	闭锁卵泡数	成熟卵泡数	黄体数	原始卵泡数
正常组		25.98±9.83	1.40±1.14	0.67±0.82	9.05±3.67	10.20±3.90
雷公藤多苷片低剂量组	13.65	30.00±8.34	9.17±5.15 ¹⁾	0.17±0.41	8.83±2.71	4.50±1.87
雷公藤多苷片高剂量组	27.3	27.50±12.96	9.67±4.18 ¹⁾	0.00±0.00	7.83±3.25	6.33±4.03
配伍组	13.65+150	39.17±9.54	3.00±1.10 ³⁾	0.14±0.38	9.86±4.85	13.00±7.85 ²⁾
菟丝子总黄酮低剂量组	150	41.50±10.39	6.17±3.82	0.17±0.41	12.67±6.22	11.50±6.16
菟丝子总黄酮高剂量组	300	31.14±10.90	2.43±0.53	0.13±0.35	11.13±5.72	9.00±4.96

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与雷公藤多苷片低剂量组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01



注:A.正常组;B.雷公藤多苷片低剂量组;C.雷公藤多苷片高剂量组;D.配伍组;E.菟丝子黄酮低剂量组;F.菟丝子黄酮高剂量组(图2、图3同)

图1 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢病理形态学的影响(HE,×40)

Fig. 1 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen* total flavonoids on ovarian histomorphology of mice(HE,×40)

3.3 对小鼠卵巢组织中生殖干细胞标志物的影响

与正常组比较,雷公藤多苷片低剂量组小鼠卵巢生殖干细胞标志物的表达有降低趋势,差异无统计学意义;雷公藤多苷片高剂量组Mvh、c-kit、Nanog的表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01);菟丝子总黄酮低剂量组Mvh、c-kit、Nanog的表达水平明显升高(P<0.05, P<0.01);与雷公藤多苷片低剂量组比较,配伍组Mvh、Nanog表达水平显著升高(P<0.01)。见图2、表3。

3.4 对小鼠卵巢组织中Notch信号通路分子的影响

与正常组比较,雷公藤多苷片低剂量组小鼠Notch1、Hes1、Jagged1的表达有降低趋势,差异无统计学意义;雷公藤多苷片高剂量组Notch1、Hes1表达水平显著降低(P<0.01);菟丝子总黄酮低剂量组Notch1、Hes1表达水平明显升高(P<0.05, P<0.01);菟丝子总黄酮高剂量组Notch信号通路分子表达水平有升高趋势,差异无统计学意义;与雷公藤多苷片低剂量组比较,配伍组可显著改善雷公藤多苷片所致Notch1、Hes1表达水平的降低趋势(P<0.05, P<0.01)。见图3、表4。

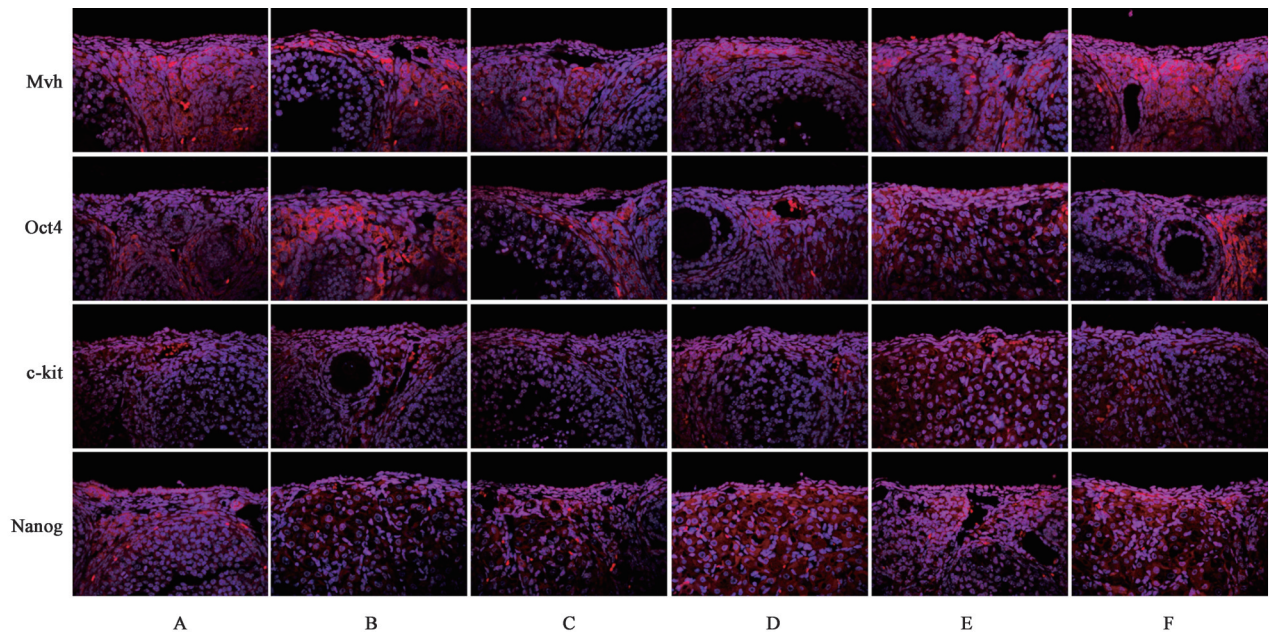


图2 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢组织中生殖干细胞标志物的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 2 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen* total flavonoids on ovarian reproductive stem cell markers in mice(IF,×600)

表3 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢组织中生殖干细胞标志物的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen* total flavonoids on ovarian reproductive stem cell markers in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Mvh/1×10 ²	Oct4/1×10 ²	c-kit/1×10 ²	Nanog/1×10 ²
正常组		21 102.10±1 181.63	19 755.40±1 064.01	16 733.80±907.26	18 408.45±1 300.50
雷公藤多苷片低剂量组	13.65	17 846.32±406.35	18 573.35±764.46	14 423.52±1 532.39	14 148.46±3 342.15
雷公藤多苷片高剂量组	27.3	15 887.07±1 089.60 ²⁾	17 129.56±1 328.95	11 510.15±1 620.96 ¹⁾	12 030.34±1 129.66 ²⁾
配伍组	13.65+150	22 657.60±1 757.52 ³⁾	19 907.99±669.72	18 785.60±2 962.35	22 499.22±3 043.04 ³⁾
菟丝子总黄酮低剂量组	150	26 638.72±2 525.76 ²⁾	21 583.01±2 096.85	21 532.83±1 028.30 ¹⁾	23 614.00±674.72 ¹⁾
菟丝子总黄酮高剂量组	300	22 311.93±1 265.23	20 253.38±295.71	19 114.52±2 344.00	20 588.84±933.68

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与雷公藤多苷片低剂量组比较³⁾P<0.01

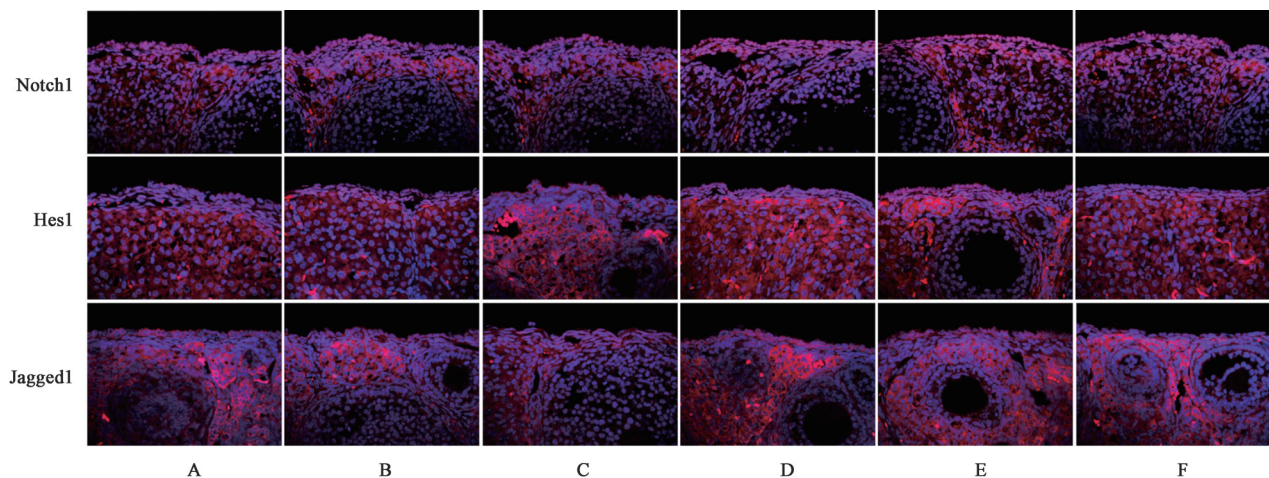


图3 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢组织中Notch信号通路分子的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 3 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen* total flavonoids on ovarian Notch signaling pathway molecule in mice(IF,×600)

表4 雷公藤多苷片及菟丝子总黄酮对小鼠卵巢组织中Notch信号通路分子的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets and *Cuscutae Semen total flavonoids* on ovarian Notch signaling pathway molecule in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Notch1/1×10 ²	Hes1/1×10 ²	Jagged1/1×10 ²
正常组		21 962.58±1 726.34	19 974.23±1 472.38	21 624.53±1 315.80
雷公藤多苷片低剂量组	13.65	18 255.17±2 194.26	17 640.90±577.89	18 838.37±1 424.64
雷公藤多苷片高剂量组	27.3	14 032.23±326.30 ²⁾	15 431.57±950.93 ²⁾	17 870.38±2 364.31
配伍组	13.65+150	24 575.48±3 052.76 ⁴⁾	22 484.18±1 921.45 ³⁾	22 432.07±1 859.45
菟丝子总黄酮低剂量组	150	27 842.60±1 600.33 ¹⁾	24 406.37±2 748.14 ²⁾	23 290.74±2 442.95
菟丝子总黄酮高剂量组	300	24 181.23±1 326.93	22 769.00±554.18	22 361.78±1 350.29

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与雷公藤多苷片低剂量组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01

4 讨论

雷公藤多苷片所致的女性生殖毒性已成为其临床用药中遇到的重大挑战之一,毒性机制不清严重限制了其在临床中的应用,本研究探讨菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对雌性生理小鼠卵巢生殖干细胞的影响,并从Notch信号通路探讨其作用机制,结果发现菟丝子总黄酮可显著降低雷公藤多苷片所致正常小鼠卵巢闭锁卵泡数的增加,显著升高雷公藤多苷片所致卵巢生殖干细胞标志物和Notch信号通路分子表达水平的降低趋势,表明菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片可能通过Notch信号通路参与调控卵巢生殖干细胞途径。

目前对雷公藤所致生殖系统的毒性作用及机制研究中,毒性研究的剂量严重高于临床常用剂量,对临床应用指导意义有限,为了更符合临床实际情况,本研究采用1、2倍临床等效剂量的雷公藤多苷片进行研究,发现两剂量均可致正常小鼠卵巢闭锁卵泡数显著增加。结合前期预实验结果发现菟丝子总黄酮1倍临床等效剂量对小鼠卵巢生殖干细胞标志物的表达影响更优于其2倍临床等效剂量的作用,因此本实验选择1倍临床等效剂量菟丝子总黄酮配伍1倍临床等效剂量雷公藤多苷片进行减毒作用机制研究。

卵巢生殖干细胞自被发现以来,许多学者已经通过原代培养等方法在多种哺乳动物甚至人类卵巢中发现了卵巢生殖干细胞^[10-11]。存在于卵巢皮质层中的卵巢生殖干细胞可通过增殖分化形成生殖细胞使卵巢能始终存在卵泡的更新,从而补充原始卵泡池的耗竭^[3,12]。已有文献证明,果蝇Mvh、Oct4、c-kit、Nanog等多种生殖细胞和干细胞标志物均在哺乳动物卵巢生殖干细胞中特异性表达^[13-15]。卵巢生殖干细胞作为女性生殖的源头,是生殖毒性研究的新靶点,但目前尚无从卵巢生殖干细胞角度

研究雷公藤的生殖毒性实验。本实验首次从卵巢生殖干细胞角度探索雷公藤多苷片对雌性生理小鼠的生殖毒性。结果表明雷公藤多苷片低剂量对卵巢生殖干细胞标志物的表达有降低趋势,雷公藤多苷片高剂量可显著降低Mvh、c-kit、Nanog的表达水平,菟丝子总黄酮低剂量可显著升高Mvh、c-kit、Nanog的表达水平,菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片后可显著升高雷公藤多苷片对卵巢生殖干细胞标志物表达水平的降低趋势。提示菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对女性生殖毒性的作用可能通过干预女性生殖的源头卵巢生殖干细胞途径相关。

Notch信号通路参与卵巢生殖干细胞的不对称分裂,在生殖干细胞增殖、分化和凋亡过程中起着关键性的作用^[16]。研究发现,Notch信号通路参与卵巢内的卵泡启动和发育,当抑制Notch信号后小鼠卵巢内原始卵泡形成减少^[17]。Notch信号通路包括Notch配体、Notch受体以及下游分子^[18],目前研究者已在哺乳动物体内发现了4种同源受体(Notch1-Notch4)和5种同源配体(Delta1-Delta3、Jagged1-Jagged2)^[19],而Notch通路的重要配体Jagged1与膜受体Notch1结合,经一路信号转导最终激活效应靶基因Hes1、Hes5,调控细胞的增殖与分化^[20]。Notch信号通路与哺乳动物卵巢功能关系密切,参与调控卵巢生殖干细胞的增殖、分化。本实验研究发现雷公藤多苷片低剂量对Notch1、Hes1、Jagged1的表达有降低趋势,雷公藤多苷高剂量可显著降低Notch1、Hes1表达水平,菟丝子总黄酮低剂量可显著升高Notch1、Hes1表达水平,菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片后可不同程度显著升高其对Notch1、Hes1的表达水平的降低,提示菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片可能通过Notch信号通路参与调控女性生殖的源头卵巢生殖干细胞途径。

卵巢功能的衰老和生殖能力的下降,主要原因

正是原始卵泡池的消耗远远多于卵巢生殖干细胞的补充,最终造成原始卵泡池的耗竭。因此,卵巢生殖干细胞与卵巢的功能密切相关。Notch信号通路在多种体干细胞的增殖和分化中发挥重要作用。有实验研究表明,在不孕和衰老小鼠卵巢皮层中,卵巢生殖干细胞标志物Mvh、Oct4及Notch信号通路分子Notch1、Hes1的表达量均显著下降,鉴于此,通过预实验对5、7周的小鼠卵巢上皮生殖干细胞标志物Mvh的表达进行对比研究,选择了表达量较多的5周龄小鼠作为实验对象^[21]。本实验着重探讨菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对雌性生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制,为了更符合雷公藤多苷片的临床实际使用情况,课题组亦在开展菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷片对关节炎大鼠病理模型体内卵巢生殖干细胞的作用及机制研究,并拟通过其对生理和病理模型的对比研究探讨雷公藤多苷片女性生殖损伤是否符合中医“有故无殒”的学术思想。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 徐颖,樊媛芳,赵元,等. 近40年雷公藤生殖毒性研究概述[J]. 中国中药杂志,2019,44(16):3406-3414.
- [2] 崔瑞琴,丁樱. 菟丝子总黄酮对雷公藤多苷片所致生殖损伤雌鼠卵巢损伤表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(8):246-247.
- [3] JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary [J]. Nature, 2004, 428 (6979):145-150.
- [4] TANG Z, WEI J, YU Y, et al. Gamma-secretase inhibitor reverts the Notch signaling attenuation of osteogenic differentiation in aged bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Cell Biol Int, 2016, 40 (4):439-447.
- [5] ZYGMUNT D A, SINGHAL N, KIM M L, et al. Deletion of pofut1 in mouse skeletal myofibers induces muscle aging-related phenotypes in cis and in trans [J]. Mol Cell Biol, 2017, doi: 10.1128/MCB.00426-16.
- [6] MANOKAWINCHOKE J, NATTASIT P, THONGNGAM T, et al. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):10124.
- [7] 苗明三,彭孟凡,闫晓丽,等. 菟丝子总黄酮对来曲唑致多囊卵巢综合征大鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(16):17-23.
- [8] 陶玲,白敦耀,臧振中,等. 雷公藤甲素阿魏酸醇质体

凝胶经皮给药的长期毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(7):95-104.

- [9] 樊媛芳,徐颖,苏晓慧,等. 雷公藤多苷片对II型胶原诱导性关节炎雌性大鼠生殖毒性的影响[J]. 中国中药杂志,2019,44(16):3486-3493.
- [10] YANG H, YAO X, TANG F, et al. Characterization of female germline stem cells from adult mouse ovaries and the role of rapamycin on them [J]. Cytotechnology, 2018, 70(2):843-854.
- [11] WANG N, SATIRAPOD C, OHGUCHI Y, et al. Genetic studies in mice directly link oocytes produced during adulthood to ovarian function and natural fertility [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):10011.
- [12] CELIK O, CELIK E, TURKCUOGLU I, et al. Germline cells in ovarian surface epithelium of mammals: A promising notion [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10:112.
- [13] WHITE Y A, WOODS D C, TAKAI Y, et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive age women [J]. Nat Med, 2012, 18(3):413-421.
- [14] PATEL H, BHARTIYA D, PARTE S. Further characterization of adult sheep ovarian stem cells and their involvement in neo-oogenesis and follicle assembly [J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1):3.
- [15] WOODS D C, WHITE Y A, TILLY J L. Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: An assessment of the literature and a view toward the future [J]. Reprod Sci, 2013, 20(1):7-15.
- [16] SONG X, CALL G B, KIRILLY D, et al. Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the drosophila ovary [J]. Development, 2007, 134 (6):1071-1080.
- [17] CHEN C L, FU X F, WANG L Q, et al. Primordial follicle assembly was regulated by Notch signaling pathway in the mice [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(3):1891-1899.
- [18] NYSTUL T, SPRADLING A. Regulation of epithelial stem cell replacement and follicle formation in the drosophila ovary [J]. Genetics, 2010, 184 (2):503-515.
- [19] GALVÃO A M, FERREIRA-DIAS G, SKARZYNSKI D J. Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum [J]. Mediators Inflamm, 2013:420186.
- [20] LIU J, LU W G, YE F, et al. Hes1/Hes5 gene inhibits differentiation via down-regulating Hash1 and promotes proliferation in cervical carcinoma cells [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(7):1109-1116.
- [21] 梁夏,潘泽政,叶海峰,等. Notch信号通路参与卵巢生殖干细胞的调控及卵巢的衰老进程[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2019,35(4):428-435.

[责任编辑 孙丛丛]