

1- 磷酸- 神经鞘氨醇预防化疗大鼠卵巢功能损害的实验研究

彭 萍, 杨冬梓, 莫亚勤, 郑澄宇, 罗 璐, 张清学
(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘 要: 【目的】探讨 1- 磷酸- 神经鞘氨醇(S1P)对环磷酰胺(CTX)导致的大鼠卵巢功能损害的保护作用及可能机制。【方法】40 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组,即实验对照组(生理盐水组)、CTX 组、S1P+ NS 组及 S1P+CTX 组,每组 10 只,于结束用药的第 1~2 周内的动情间期处死,观察卵泡数量的变化,并采用半定量 RT-PCR 检测卵巢组织 Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 变化。【结果】S1P+CTX 组的原始卵泡、初级卵泡和生长卵泡数与 S1P+NS 组、对照组的差别不显著($P > 0.05$),而 CTX 组的所有卵泡数均少于其余 3 组,其差异均有显著性意义($P < 0.01$)。卵巢组织中,S1P 两组 Bcl-2 mRNA 的表达明显高于对照组及 CTX 组($P < 0.01$),Bax mRNA 表达明显低于对照组及 CTX 组($P < 0.01$);而 CTX 组的 Bcl-2 mRNA 表达明显低于对照组及 S1P 两组($P < 0.01$),Bax mRNA 表达明显高于对照组及 S1P 两组($P < 0.01$)。【结论】S1P 能预防 CTX 导致的大鼠卵巢功能损害,其抗凋亡作用可能是通过调节 Bcl-2 家族成员表达而实现。

关键词: 1- 磷酸- 神经鞘氨醇; 环磷酰胺; 卵巢功能; 大鼠

中图分类号: R711.75

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)01- 0015- 04

Study of the Prevention of Chemotherapy-induced Ovarian Damage by Sphingosine- 1- Phosphate in Rat Model

PENG Ping, YANG Dong- zi, MO Ya- qin, ZHENG Cheng- yu, LUO Lu, ZHANG Qing- xue

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of sphingosine- 1- phosphate (S1P) against cyclophosphamide (CTX) induced gonadotoxicity in female rats. 【Methods】Forty SD female rats were divided randomly into four groups : control (received normal saline(NS), CTX, S1P+NS, S1P+CTX respectively. All rats were killed between the first and the second week in the diestrus stage after stopping medicines to compare the number of the primordial follicles, the primary follicles and the growth follicles. The expression of the Bcl- 2 and Bax mRNA in the ovaries were examined by the RT- PCR. 【Results】The number of primordial follicles, primary follicles and growth follicles in the S1P+CTX group was close to that in the control group and the S1P+NS group ($P > 0.05$). But the number of all kinds of follicles was decreasing in the CTX group, and there were significant differences between that of these groups($P < 0.01$). The levels of the Bcl- 2 mRNA in the two S1P groups were significantly higher than that in the CTX group and the control group, but levels of the Bax mRNA were on the contrary ($P < 0.01$). The level of the Bcl- 2 mRNA in the CTX group was significantly lower than that in the S1P groups and the control group, but the level of the Bax mRNA was on the contrary($P < 0.01$). 【Conclusion】S1P could reduce the cyclophosphamide- induced ovarian damage in rats, and the role of its against apoptosis might through regulating the expression of the Bcl- 2 and Bax mRNA in the ovary.

Key words: sphingosine- 1- phosphate; cyclophosphamide; ovarian function; rat

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1):15- 18; 39]

卵巢功能早衰是化疗药物对女性性腺破坏的一个常见表现。随着医学的进步,化疗患者生存率

显著提高,因此,如何在化疗的同时保存这些妇女的卵巢功能,有着巨大的医学需求。近年,凋亡被

收稿日期: 2006-11-04

基金项目: 卫生部部属(管)医疗机构 2004- 2006 临床学科重点项目(卫规财发 2004 468 号); 国家教育部博士点基金资助项目(20050558093)

作者简介: 彭萍(1967-),女,湖南常德人,博士研究生,副主任医师;杨冬梓,教授,博士生导师,通讯作者. E- mail: yangdz@mail.sysu.edu.cn

认为是放化疗导致的卵泡丢失的可能机制^[1,2], 这为降低放化疗导致的卵巢功能损害提供了新的途径。1-磷酸-神经鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是细胞凋亡启动因子—神经酰胺进一步分解并磷酸化的产物。S1P能抗衡膜渗透性神经酰胺类似物或外源刺激后通过增加神经酰胺水平而诱导的细胞凋亡。放化疗使卵泡细胞内的神经酰胺生成增加, 诱导细胞凋亡, S1P可阻断神经酰胺的诱导作用, 这在体外细胞培养中得到较好证实^[2-4], 但在体研究较少^[5], 国内尚无此项相关的临床与基础研究, 因此, 我们旨在通过动物实验进一步探讨S1P对环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)导致的大鼠卵巢功能损害的保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要实验试剂

8~9周成年雌性SD大鼠40只购自中山大学实验动物中心, 以标准大鼠颗粒喂养, 室温22℃, 相对湿度85%左右。通过每天阴道涂片观察, 连续2个动情期后进入实验。S1P购自sigma公司, Trizol试剂购自Introvigen公司, RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司, 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 实验大鼠分组

将进入实验组的40只雌性大鼠随机分为4组, 每组10只。分组如下: 实验对照组: 生理盐水0.1 mL/d, 腹腔注射, 连续11d; CTX组: 50 mg/kg的CTX腹腔注射后, 第2天开始连续腹腔注射CTX 5 mg/(kg·d), 共11d; S1P+NS组: 用10 μg/mL浓度的S1P每天4 μg腹腔注射, 连续11d, 于2h后开始注射NS, 量同NS组; S1P+CTX组: 同S1P+NS组注射同量的S1P后, 于2h后开始注射CTX, 量同CTX组。以上用药剂量及用药时限的确定参考相关文献^[5]。

1.3 实验观察及取材

实验中每天通过阴道涂片观察大鼠的性周期变化, 于结束用药的第1~2周内的动情间期处死动物(动物处死均在上午进行), 随机选取一侧卵巢用中性甲醛固定, 另一侧置去RNA酶的冻存管中于液氮罐中保存待用。

1.4 卵巢组织形态学观察及卵泡计数

上述待用双侧卵巢中随机选取一侧组织用中性甲醛固定24h, 石蜡包埋, 连续5 μm切片后HE染色, 光镜(×200倍)下计数具有正常结构的原始卵泡、初级卵泡及生长卵泡(包括次级卵泡、成熟卵泡)^[6]。

1.5 半定量RT-PCR检测卵巢组织Bcl-2及Bax mRNA的变化

1.5.1 引物合成 依据相关文献合成以下引物 Bcl-2: 正义引物: 5'-GTATGATAACCGGGAGATCG-3', 反义引物: 5'-AGCCAGGAGAAATCAAACAG-3', 扩增产物为612bp^[7]; Bax: 正义引物: 5'-AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT-3', 反义引物: 5'-CAAAGATGGTCACTGTCTGC-3', 扩增产物为361bp^[8]; GAPDH: 正义引物: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3', 反义引物: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3', 扩增产物为306bp^[9]。使用时用无菌去离子水配成20 μmol/L。

1.5.2 总RNA的提取 用Trizol试剂抽提卵巢组织的总RNA, 将所得RNA用1 g/L焦碳酸二乙酯(diethylpyro carbonate, DEPC)水溶解, 紫外分光光度计测量A₂₆₀/A₂₈₀比值, 根据比值计算总RNA的量, -80℃保存待用。

1.5.3 逆转录 取组织总RNA 1 μg, 以Random 9 mers为引物, 在AMV逆转录酶的作用下进行逆转录, 反应总体积为10 μL, 包括25 μmol/L MgCl₂, 10×RT缓冲液, 10 mmol/L dNTP混合液, 5 U/μL AMV逆转录酶, 40 U/μL RNA酶抑制剂, 用DEPC超纯水定容至10 μL。反应条件为30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 所获逆转录产物置于-20℃保存。

1.5.4 半定量PCR 在上述逆转录反应管中分别加入5×PCR缓冲液, 5 U/μL TaKaRa Ex Taq HS酶, 20 μmol/L相应引物, 灭菌水定容至50 μL。反应条件为94℃ 预变性5 min后, 于PCR仪(美国PE480型)中, 94℃ 30 s, 58℃ (Bcl-2)或(59℃) Bax或55℃ (GAPDH) 45 s, 72℃ 1 min, 分别进行32(Bcl-2)或29(Bax)或30(GAPDH)个循环后, 72℃ 延伸7 min。反应结束后, 取PCR产物5 μL于1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 用UVPlabworks图象分析系统进行各目标基因与内参基因GAPDH条带吸光度(OD)容积定量分析, 两者的OD比值代表Bcl-2及Bax mRNA的相对表达量。

1.6 统计学方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SPSS10.0 统计软件处理, 方差不齐用 welch 法分析, 方差齐用 one way ANOVA 分析, 各组间的两两比较采用 LSD 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 各组大鼠卵泡数量的变化

S1P+CTX 组的原始卵泡、初级卵泡和生长卵泡数与 S1P+NS 组、对照组的差别不显著 ($P > 0.05$), 但 CTX 组的所有卵泡数均少于其余 3 组, 差异均有显著性意义 ($P < 0.01$; 图 1、2; 表 1)。

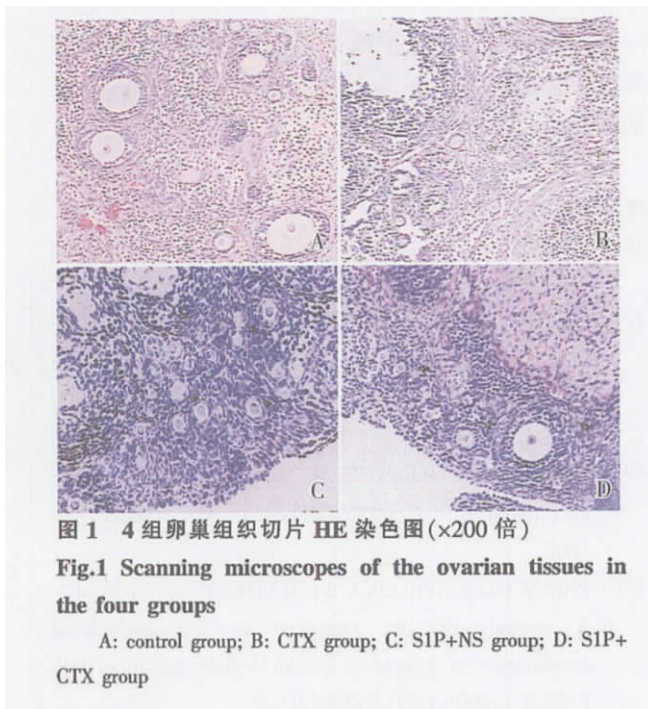


表 1 各组大鼠卵泡数量的变化

Table 1 Changes of the number of primordial follicles, primary follicle and growth follicle in four groups ($\bar{x} \pm s$)

	n	Primordial follicle	Primary follicle	Growth follicle
S1P+CTX	10	475 ± 23 ¹⁾	30 ± 9 ¹⁾	24 ± 5 ¹⁾
S1P+NS	10	481 ± 23 ¹⁾	34 ± 7 ¹⁾	25 ± 4 ¹⁾
NS	10	452 ± 49 ¹⁾	31 ± 7 ¹⁾	22 ± 5 ¹⁾
CTX	10	204 ± 16 ^{2),3),4)}	20 ± 4 ^{2),3),4)}	12 ± 4 ^{2),3),4)}
F		165.478	6.916	15.141
P		0.000	0.001	0.000

Compared with the ctx group, 1) $P < 0.01$; Compared with the ns group 2) $P < 0.01$; Compared with the s1p+ctx group 3) $P < 0.01$; Compared with the s1p+ns group, 4) $P < 0.01$

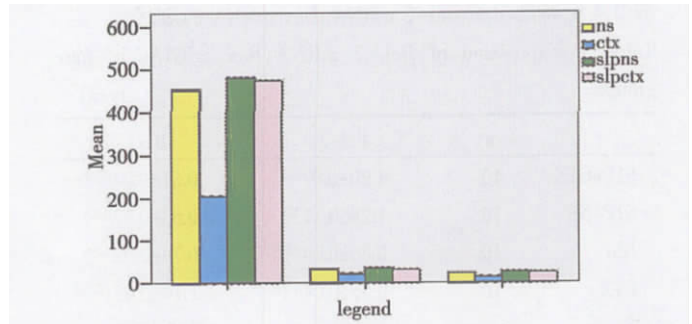


图 2 4 组原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡数的比较

Fig.2 Comparing the number of primordial follicles, primary follicles and growth follicles in four groups

2.2 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2 及 Bax mRNA 的表达变化

S1P+NS 组及 S1P+CTX 组的 Bcl-2 mRNA 表达明显高于对照组及 CTX 组 ($P < 0.01$), 而 Bax mRNA 表达明显低于对照组及 CTX 组 ($P > 0.05$); 但 CTX 组的 Bcl-2 mRNA 表达明显低于对照组及 S1P 两组 ($P < 0.01$), 而 Bax mRNA 表达明显高于对照组及 S1P 两组 ($P < 0.01$; 表 2; 图 3)。

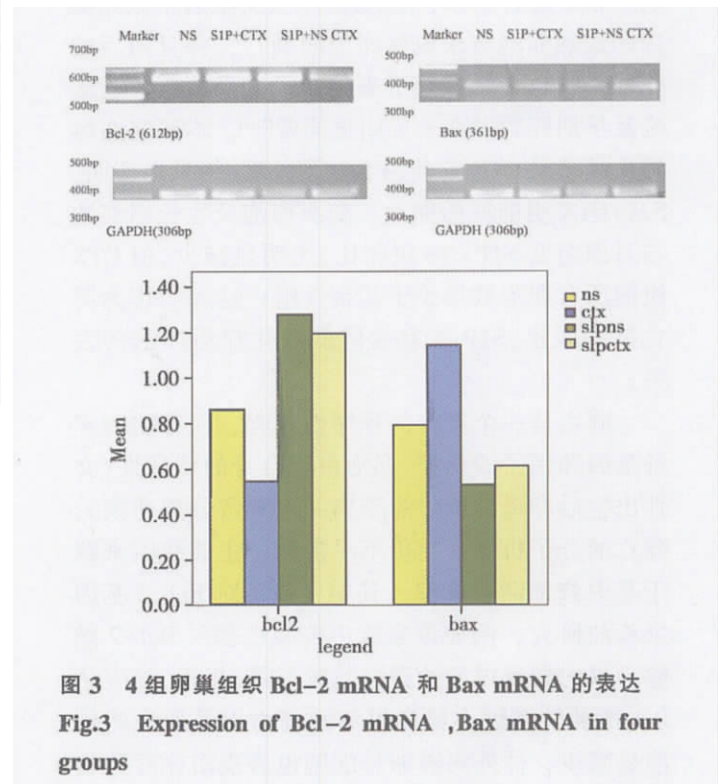


图 3 4 组卵巢组织 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达

Fig.3 Expression of Bcl-2 mRNA, Bax mRNA in four groups

3 讨 论

CTX 是一种在临床上广泛应用于抗肿瘤或免

表 2 4 组卵巢组织 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 的表达
Table 2 Expression of Bcl-2 mRNA, Bax mRNA in four groups

	n	Bcl-2	Bax
S1P+CTX	10	1.20 ± 0.07 ^{1,2)}	0.61 ± 0.04 ^{1,2,4)}
S1P+NS	10	1.28 ± 0.11 ^{1,2)}	0.53 ± 0.37 ^{1,2,3)}
NS	10	0.86 ± 0.04 ^{1,3,4)}	0.79 ± 0.03 ^{1,3,4)}
CTX	10	0.55 ± 0.04 ^{2,3,4)}	1.14 ± 0.05 ^{1,2,3,4)}
F		332.955	455.465
P		0.000	0.001

Compared with the ctx group, 1) P < 0.01; Compared with the ns group, 2) P < 0.01; Compared with the s1p+ctx group, 3) P < 0.01; Compared with the s1p+ns group, 4) P < 0.01

疫抑制治疗的烷化剂, 其诱导的卵巢功能损害机制与卵母细胞及颗粒细胞的凋亡密切相关, 由于卵母细胞和颗粒细胞的凋亡, 卵泡也随之消亡, 最终导致卵巢生殖与内分泌功能的丧失^[10]。近期, 体外实验^[2-4]的研究结果发现 S1P 能够有效预防由抗肿瘤药物所诱发的卵母细胞凋亡, 而 Morita 等^[5]的在体试验亦发现在用放射线对雌性大鼠进行照射前用 S1P 进行干预, 能够防止接受辐射小鼠卵巢内的成熟卵泡与未成熟卵泡的凋亡, 并且随后的体外受精也提示保存下来的卵子其受精率不受影响及早期胚胎发育未见明显异常^[5,11]。本研究在雌性大鼠接受 CTX 前使用 S1P 预处理, 结果也表明, S1P+CTX 组的原始卵泡、初级卵泡及生长卵泡数与对照组及 S1P+NS 组相比, 无明显减少, 但 CTX 组的所有卵泡数均少于其余 3 组; 这表明作为凋亡抑制因子, S1P 能有效降低放化疗后卵泡的丢失。

凋亡是一个严密的程序性过程, 受细胞内多种基因和因子的调控, 卵泡由于自身的特殊性(女性出生后卵母细胞停滞于第一次减数分裂前期), 凋亡的分子机制目前仍不尽清楚, 主要线索来源于基因修饰动物模型, 其中主要是对 Bcl-2 基因家族的研究, 例如该家族中抗凋亡基因 Bcl-2 敲除小鼠的卵巢内原始卵泡数量下降, 相反, 高表达 Bcl-2 的转基因小鼠卵母细胞凋亡以及卵泡闭锁明显减少, 体外培养卵母细胞也表现对化疗药物诱导凋亡的抵抗^[12,13]。另一方面, 如果敲除该基因家族中的促凋亡基因 Bax, 小鼠卵巢内的卵泡在出生时与正常小鼠相当, 但进入青春期和生育期后 Bax 基因缺如小鼠卵泡丢失的速率明显低于正常

小鼠, 而且敲除 Bax 基因的小鼠卵母细胞也表现对化疗药物诱导凋亡的抵抗^[14,15]。上述研究成果显示 Bcl-2 基因家族成员在卵泡凋亡调控中发挥重要作用, Bcl-2/Bax 的比例决定卵泡是否接受诱导凋亡的信号。本研究结果发现 S1P 能够增加 Bcl-2 mRNA 的表达, 同时减少 Bax mRNA 的表达, 从而有效地预防 CTX 导致的大鼠卵巢功能的损害。

综上所述, S1P 能预防 CTX 导致的大鼠卵巢功能损害, 并且 S1P 的抗凋亡作用可能是通过调节 Bcl-2 家族成员表达而实现, 但 S1P 通过什么途径调控对 Bcl-2 家族成员的基因表达, 是通过线粒体途径还是通过死亡受体-/Caspase-8 途径? 这将是我们的下一步研究的内容; 另外采用凋亡抑制因子保护卵巢功能的同时, 是否会对化疗效果造成一定的影响, 以及保护卵巢后, 其子代有没有发育异常, 也有待于进一步的研究, 尤其是随机、双盲的大样本的临床研究。

参考文献:

- [1] MORITA Y, TILLY J L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass [J]. *Dev Biol*, 1999, 213(1): 1- 17.
- [2] Tilly JL, Kolesnick R N. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585(12):135- 138.
- [3] SPIEGEL S, KOLESNICK R. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent[J]. *Leukemia*, 2002,16(9):1596-1602.
- [4] PEREZ GI, JURISCOVA A, MATIKAINEN T, et al. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline [J]. *FASEB J*, 2005,19(7):860- 862.
- [5] MORITA Y, PEREZ GI, PARIS F. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphat therapy [J]. *Nat Med*, 2000, 6(10):1109- 1114.
- [6] DANFORTH D R, ARBOGASTA L K, FRIEDMAN C I. Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5):1333- 1338.
- [7] SATO T, IRIE S, KRAJEWSKI S, et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein [J]. *Gene*, 1994,140(2):291- 292.
- [8] HAN J, SABBATINI P, PEREZ D, et al. The E1B 19k protein blocks apoptosis by interacting with and

(下转第 39 页 to page 39)

需要进行大量的耐药分子流行病学调查数据, 由于白念珠菌存在高度的遗传多态性, 如果在了解不同白念珠菌基因图谱上设计更为恰当和有针对性的引物, 采用精心设计的退火温度, 就能准确的识别基因型与耐药性的关系, 从而大大加快耐药分子机制的研究。

参考文献:

- [1] WHITE T C, MARR K A, BOWDEN R A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(2):382- 402.
- [2] PFALLER M A, MESSER S A, HOLLIS R J, et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolate of candida spp[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1723- 1727.
- [3] BARAN J Jr, KLAUBER E, BARCZAK J, et al. Trends in antifungal susceptibility among Candida sp. Urinary isolates from 1994 and 1998[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2):870- 871.
- [4] FAVRE B, DIOMON M, RYDER N S, et al. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 - demethylase contribute to azole resistance in Candida albicans [J]. *Microbiology*, 1999, 145:2715- 2725.
- [5] ASAI K, TSUCHIMORI N, OKONOJI K, et al. Formation of azole-resistant Candida albicans by mutation of sterol 14- demethylase P450[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5):1163- 1169.
- [6] WHITE T C, HOLLEMAN S, DY F, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (6): 1704- 1713.
- [7] 穆里斯 KB, 费里 F, 吉布斯 R. 陈受宜, 朱立煌, 等译. 聚合酶链式反应[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 276- 279.
- [8] DASSANAYAKE R S, ELLEPOLA A N, SAMARANAYAKE Y H, et al. Molecular heterogeneity of fluconazole - resistant and - susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale [J]. *APMIS*, 2002, 110(4): 315- 324.
- [9] CLEMONS K V, FEROZE F, HOLMBERG K, et al. Comparative analysis of genetic variability among Candida albicans isolates from different geographic locales by three genotypic methods[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6):1332- 1336.
- [10] BARTIE K L, WILLIAMS D W, WILSON M J, et al. PCR fingerprinting of Candida albicans associated with chronic and other oral condition [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 4066- 4075.
- (编辑 黄小延)
-
- (上接第 18 页 from page 18)
- inhibiting the p53- inducible and death- promoting Bax protein [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(4):461- 477.
- [9] WONG H, ANDERSON WD, CHENG T, et al. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer - dropping" method [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223(2):251- 258.
- [10] De FELICI M, KLINGER FG, FARINI D, et al. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10 (2):182- 191.
- [11] PARIS F, PEREZ GI, FUKS Z, et al. Sphingosine 1- phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9):901- 902.
- [12] HUSSEIN M R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms [J]. , 2005, 11(2):162- 177.
- [13] MORITA Y, PEREZ G I, MARAVEI D V, et al. Targeted expression of Bcl- 2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy- induced oocyte apoptosis in vitro [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(6):841- 850.
- [14] TAKAI Y, CANNING J, PEREZ G I, et al. Bax, caspase- 2, and caspase- 3 are required for ovarian follicle loss caused by 4- vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo [J]. *Endocrinol*, 2003, 144(1): 69- 74.
- [15] PEREZ GI, ROBLES R, KNUDSON C M, et al. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax- deficiency [J]. *Nat Genet*, 1999, 21 (2):200- 203.
- (编辑 张恩健)