

## 论著·基础研究

SIRT1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人卵巢颗粒细胞氧化应激损伤的影响

和 斌, 李祺越, 洪 岭, 伍园园, 滕晓明, 唐传玲

同济大学附属第一妇婴保健院辅助生殖医学科, 上海 201204

**[摘要]** **目的**·探讨沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人卵巢颗粒细胞氧化应激损伤中的作用及可能机制。**方法**·分别用 0、100、250、500、1 000 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理人卵巢颗粒细胞 SVOG 4、8、12、24 h, CCK-8 法检测细胞活力, 选择合适的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度和处理时间用于建立颗粒细胞体外氧化应激损伤模型。荧光显微镜观察 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后细胞核形态变化, 试剂盒检测细胞丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 实时定量 PCR、Western blotting 分析分别检测 *SIRT1*、衔接蛋白 *P66SHC* (the 66 kDa Src homology 2 domain containing isoform) 及 B 淋巴细胞瘤 -2 因子 (B-cell lymphoma-2, *BCL-2*) mRNA 和蛋白的表达水平; 脂质体转染 SIRT1 过表达质粒后, SVOG 细胞再经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理, 同样观察上述指标的变化。**结果**·250 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SVOG 细胞 12 h, 可诱发细胞活力明显下降 ( $P=0.017$ ), 细胞核固缩, MDA 含量增加 ( $P=0.001$ ), SOD 活性下降 ( $P=0.006$ ); 伴随 *SIRT1*、*BCL-2* mRNA 和蛋白表达降低, *P66SHC* 表达升高。SIRT1 过表达后再经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理, 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比, SVOG 细胞核恢复正常形态, MDA 含量下调 ( $P=0.038$ ), SOD 活性回升 ( $P=0.021$ ), *P66SHC* 表达降低 ( $P=0.002$ ), *BCL-2* 表达升高 ( $P=0.013$ )。**结论**·SIRT1 可能通过下调 *P66SHC* 和上调 *BCL-2* 的表达发挥对抗人卵巢颗粒细胞氧化应激损伤的作用。

**[关键词]** 卵巢颗粒细胞; 沉默信息调节因子 1; 氧化应激损伤; 衔接蛋白 *P66SHC*; B 淋巴细胞瘤 -2 因子

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.12.004 **[中图分类号]** R711.6 **[文献标志码]** A

Effect of SIRT1 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human ovarian granulosa cells

HE Bin, LI Qi-yue, HONG Ling, WU Yuan-yuan, TENG Xiao-ming, TANG Chuan-ling

Department of Assisted Reproductive Medicine, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 201204, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the effect and possible mechanism of silent information regulator 1 (SIRT1) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human ovarian granulosa cells. **Methods**·Human ovarian granulosa cells SVOG were treated with 0, 100, 250, 500, 1 000 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4, 8, 12, 24 h, respectively. The cell viability was measured by CCK-8 method, and the appropriate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and treatment time were used to establish the oxidative stress injury model of granulosa cells *in vitro*. The nuclear morphological changes after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment were observed with fluorescence microscope. The malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activities were detected by chemical chromatometry kits. Real-time quantitative PCR and Western blotting were respectively used to analyze the mRNA and protein levels of *SIRT1*, *P66SHC* (the 66 kDa Src homology 2 domain containing isoform) and B-cell lymphoma-2 (*BCL-2*). The changes of the above indicators were also assessed after SVOG cells were transfected with SIRT1 overexpression plasmid by liposome and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Results**·After treatment with 250 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 h, the SVOG cell viability decreased significantly ( $P=0.017$ ), the cell nuclei shrank, the MDA level increased ( $P=0.001$ ), the SOD activity decreased ( $P=0.006$ ), and the expression of *P66SHC* increased with the decreased expression of *SIRT1* and *BCL-2* at mRNA and protein levels. After overexpression of SIRT1 and treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the nuclei of SVOG cells returned to normal morphology, the MDA level decreased ( $P=0.038$ ), the SOD activity increased ( $P=0.021$ ), the expression of *P66SHC* decreased ( $P=0.002$ ) and the expression of *BCL-2* increased ( $P=0.013$ ). **Conclusion**·SIRT1 can protect human ovarian granulosa cells from oxidative damage by down-regulating the expression of *P66SHC* and up-regulating *BCL-2*.

**[Key words]** ovarian granulosa cell; silent information regulator 1 (SIRT1); oxidative damage; the 66 kDa Src homology 2 domain containing isoform (*P66SHC*); B-cell lymphoma-2 (*BCL-2*)

卵泡是女性的基本生殖单位。在卵泡微环境中, 颗粒细胞紧密包裹在卵母细胞外, 为卵母细胞发育提供营养和促成熟因子, 两者的交互“对话”对卵母细胞的分化发育与成熟起着举足轻重的作用<sup>[1]</sup>。颗粒细胞数量减少、功能受损、细胞间联系中断, 可诱发卵母细胞凋亡, 导致卵巢

功能下降<sup>[2]</sup>。体内各种刺激可诱发卵泡微环境产生活性氧簇物质 (reactive oxygen species, ROS)。正常情况下, 颗粒细胞可通过自身的抗氧化系统保护卵母细胞免受氧化应激损伤<sup>[3]</sup>; 然而, 在体外受精治疗过程中, 颗粒细胞 ROS 异常增加可引起氧化应激损伤, 进一步影响卵子、胚

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81971383); 上海市自然科学基金 (17ZR1422000); 上海市市级医疗卫生学科建设项目 (2017ZZ02015)。

**[作者简介]** 和 斌 (1992—), 男, 硕士生; 电子信箱: dahebinbin@163.com。

**[通信作者]** 唐传玲, 电子信箱: ttangirl56@sina.com。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81971383); Natural Science Foundation of Shanghai (17ZR1422000); Shanghai Municipal Medical and Health Discipline Construction Project (2017ZZ02015)。

**[Corresponding Author]** TANG Chuan-ling, E-mail: ttangirl56@sina.com。

胎质量以及临床妊娠结局<sup>[4-5]</sup>。因此,保护颗粒细胞免受氧化损伤对于维持和提高女性的生育能力具有重要意义。

沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是脱乙酰酶 Sirtuin 家族中研究最深入的一个成员。其通过对多种非组蛋白及组蛋白赖氨酸残基进行去乙酰化修饰来调节基因表达,参与细胞衰老、糖脂代谢、氧化应激、炎症、细胞凋亡等生理活动<sup>[6]</sup>,也是细胞抵抗氧化应激损伤的重要分子<sup>[7]</sup>。近年来,很多研究发现 SIRT1 在调节卵巢功能方面也发挥重要作用,可以促进高脂饮食肥胖小鼠的卵泡存活<sup>[8-9]</sup>。此外,SIRT1 具有促进人卵巢颗粒细胞的增殖以及维护颗粒细胞稳态的作用<sup>[10]</sup>,但目前有关 SIRT1 在颗粒细胞氧化损伤中作用的研究并不多见。 $H_2O_2$  作为 ROS 的主要成员,极易透过细胞膜,可用于模拟体内的氧自由基损伤,而且性质相对稳定,易于获得,已成为研究细胞氧化应激损伤的常用工具。本研究用  $H_2O_2$  处理 SVOG 细胞 (非肿瘤源性的永生化人卵巢颗粒细胞系),建立人卵巢颗粒细胞体外氧化应激模型,测定有关氧化应激相关指标,并分析衔接蛋白 P66SHC (the 66 kDa Src homology 2 domain containing isoform) 与 B 淋巴细胞瘤-2 因子 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 等氧化应激有关分子的表达情况,探讨 SIRT1 在  $H_2O_2$  诱导的 SVOG 细胞氧化应激损伤中的作用及可能机制,以期为了保护颗粒细胞免于氧化应激损伤、维持卵泡正常发育提供新的对策。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司,DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司,丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、实时荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,CCK8 试剂盒购自苏州新赛美生物科技有限公司,反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 抗体、兔抗人 SIRT1、P66SHC、BCL-2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体均购自美国 ProteinTech 公司,4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 购自美国 Sigma 公司,增强化学发光法 (ECL) 试剂购自美国 Millipore 公司,Opti-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司,转染试剂盒 Lipofectamine<sup>®</sup>3000 购自美国 ThermoFisher 公司,ABI StepOne Q-PCR 仪器购自美国 ThermoFisher 公司,BX51

荧光显微镜和 DP70 数字成像系统购自日本 Olympus 公司,Spectramax M5 酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司。SIRT1 过表达质粒 pcDNA3.1-SIRT1 委托江苏知萌生物医药科技有限公司构建,所有引物均由上海生工生物有限公司合成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** SVOG 细胞购自上海泽叶生物科技有限公司,使用含有 10% 血清的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃、5%  $CO_2$  培养箱中培养。本研究所有实验经同济大学附属第一妇婴保健院伦理委员会批准。SVOG 细胞根据实验需要被分为空白对照组 (对照组)、 $H_2O_2$  处理组 ( $H_2O_2$  组)、SIRT1 过表达质粒转染组 (SIRT1 组) 和 SIRT1 过表达质粒转染后  $H_2O_2$  处理组 (SIRT1+ $H_2O_2$  组)。

**1.2.2 细胞转染 SIRT1 过表达质粒** 将 SVOG 细胞按  $5 \times 10^5$ /mL 接种到 6 孔板中,待细胞生长融合至约 80% 时换液行 SIRT1 过表达质粒转染。一个无菌 EP 管中加入 3.75  $\mu$ L Lipofectamine<sup>®</sup>3000 试剂,用 125  $\mu$ L Opti-MEM 培养基稀释,并充分混匀;在另一个无菌 EP 管中将 1.5  $\mu$ g 质粒稀释于 125  $\mu$ L Opti-MEM 培养基,然后添加 P3000<sup>™</sup> 试剂 5  $\mu$ L,充分混匀。将上述 2 个 EP 管中液体按 1:1 比例混匀,室温孵育 10 min 后,加至 6 孔板中,250  $\mu$ L/孔,放置于培养箱中继续培养 48 h 后,qPCR 和 Western blotting 检测 SIRT1 过表达情况。

**1.2.3 细胞氧化应激模型** 参考文献<sup>[11-12]</sup> 采用  $H_2O_2$  建立细胞氧化损伤模型,使用不同浓度  $H_2O_2$  (0、100、250、500、1 000  $\mu$ mol/L) 处理 SVOG 细胞,分别于 4、8、12、24 h 后,通过细胞核形态,细胞活力等数据,选取细胞核形态和活力具有显著性变化,且细胞存活率处于 50% ~ 70% 的最低浓度和合适时间作为后续诱导氧化损伤模型的条件。

**1.2.4 CCK8 法检测细胞活力** 为了观察  $H_2O_2$  处理对人卵巢颗粒细胞活力的影响,使用 CCK8 试剂盒进行细胞活力检测。将 SVOG 细胞按  $1 \times 10^4$ /100  $\mu$ L 接种到 96 孔板中,待细胞融合至约 80% 后,加入含有不同浓度  $H_2O_2$  的培养基,分别于 4、8、12、24 h 后,每孔加入 CCK8 试剂 10  $\mu$ L,继续培养 1 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度值 [ $D(450\text{ nm})$ ],计算细胞活力 =  $[D(450\text{ nm})_{\text{加药}} - D(450\text{ nm})_{\text{空白}}] / [D(450\text{ nm})_{\text{未加药}} - D(450\text{ nm})_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

**1.2.5 荧光显微镜观察细胞核形态** 将培养皿中的细胞,PBS 浸洗 3 次,加入 DAPI,室温避光孵育 5 min,PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察细胞核形态。

**1.2.6 氧化应激指标检测** MDA 和 SOD 是反映氧化应

激状态的常用指标。MDA 是胞膜脂质过氧化终产物, 可间接反映细胞受自由基攻击所受的损害, 而 SOD 是机体内清除自由基的重要抗氧化酶。收集不同处理组细胞的裂解液, 检测 MDA 含量和 SOD 活性, 实验均严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.7 qPCR 检测** 收集细胞样品, 加入 TRIzol 提取细胞 RNA, 采用反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 按照 qPCR 试剂盒说明书检测 *SIRT1*、*P66SHC*、*BCL-2*、 $\beta$  肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 的 mRNA 水平。每个样本设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。各待测基因引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab 1 Primers used for qPCR

Gene	Primer
<i>SIRT1</i>	
Forward	5'-GGTATTATGCTCGCCTTGC-3'
Reverse	5'-TGACAGAGAGATGGCTGGAA-3'
<i>P66SHC</i>	
Forward	5'-TCCTCCAGGACATGAACAAGCTGA-3'
Reverse	5'-TGGGCTTATTGACAAAGCTCCCGT-3'
<i>BCL-2</i>	
Forward	5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA-3'
Reverse	5'-GGTCACATGTAAAGCCAGCCT-3'
$\beta$ -actin	
Forward	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
Reverse	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

**1.2.8 Western blotting 检测蛋白水平** 收集细胞裂解液, 离心后吸取上清液, 蛋白定量。配制 10% 分离胶及 5% 浓缩胶, 蛋白上样, 70 V 电泳 30 min, 125 V 电泳 70 min, 300 mA 转膜 120 min。室温下封闭 2 h, 分别加入兔抗人 *SIRT1*、*P66SHC*、*BCL-2*、*GAPDH* 多克隆抗体 (1:1 000 稀释), 4 ℃ 摇床孵育过夜, 充分洗涤后, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, 充分洗涤后, 加入 ECL 发光液, 曝光, 经数码凝胶图像处理系统扫描图像。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间比较使用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析结合 Tukey 检验。所有实验重复 3 次, 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理诱导 SVOG 细胞氧化应激损伤

采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SVOG 细胞诱导颗粒细胞体外氧化应激损伤模型。CCK-8 细胞活力实验结果 (图 1A) 显示, 随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度及处理时间的增加, SVOG 细胞的活力逐渐下降。250  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h, SVOG 细胞的活力下降至对照组的 60% 左右, 差异有统计学意义 (*P* = 0.017)。荧光显微镜观察结果 (图 1B) 显示, 250  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h, SVOG 细胞的细胞核明显缩小, 染色质凝集呈颗粒团块状分布, 表明颗粒细胞发生凋亡; 同时检测氧化应激相关分子, 结果 (图 1C、D) 显示, MDA 含量升高 (*P* = 0.001), SOD 活性下降 (*P* = 0.006), 进一步证实 250  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SVOG 细胞 12 h 可诱导颗粒细胞体外氧化应激损伤, 因此选择该 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度和处理时间用于后续实验。

2.2 氧化应激状态下 SVOG 细胞 SIRT1、P66SHC 与 BCL-2 的表达水平

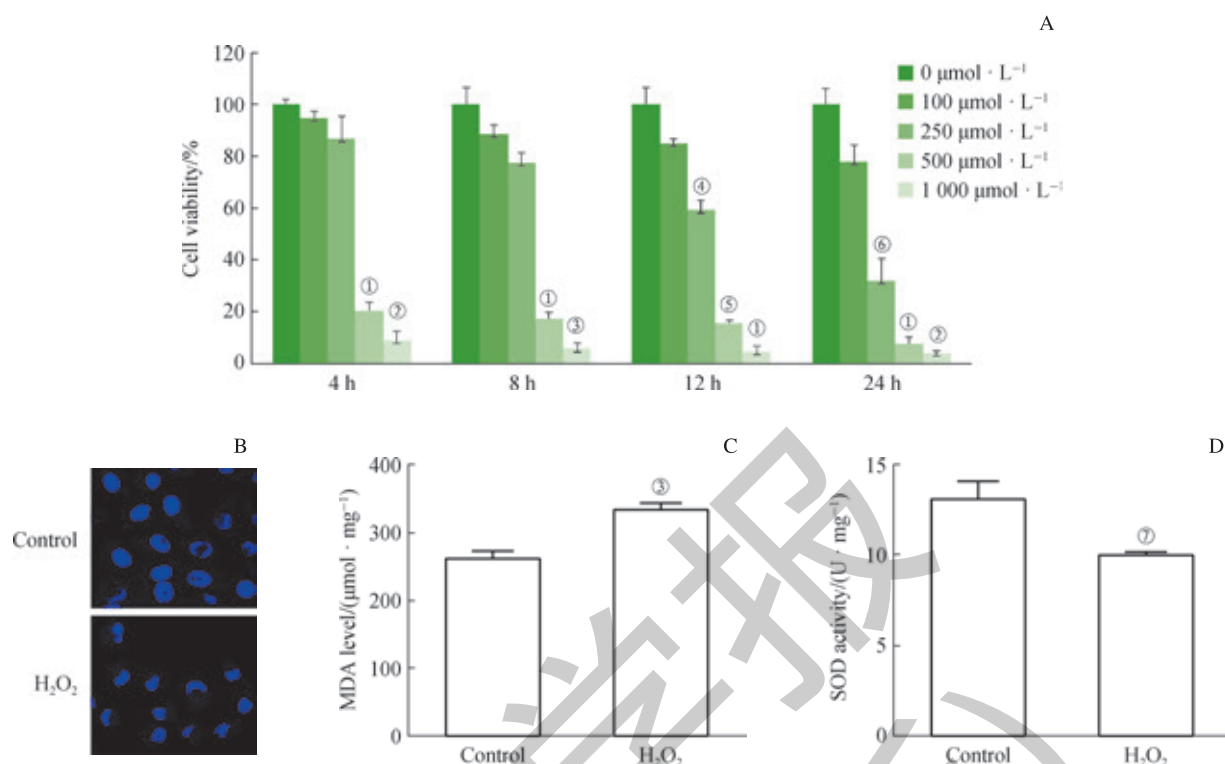
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SVOG 细胞后, qPCR 结果 (图 2A、B、C) 显示, SVOG 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, *SIRT1* 及 *BCL-2* 的 mRNA 水平与对照组相比明显下降, *P66SHC* 明显升高, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05)。Western blotting 结果 (图 2D) 进一步证实 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, SVOG 细胞 *SIRT1* 表达下降, *P66SHC* 表达升高, *BCL-2* 表达下降。表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SVOG 细胞氧化损伤伴随着 *SIRT1*、*BCL-2* 的表达水平下降及 *P66SHC* 的表达升高。

2.3 SVOG 细胞转染 SIRT1 过表达质粒后 P66SHC 及 BCL-2 的表达

通过脂质体转染 *SIRT1* 过表达质粒, 转染 48 h 后收集细胞进行检测。qPCR (图 3A、B、C) 结果显示, *SIRT1* 组与对照组相比, *SIRT1* 及 *BCL-2* 的 mRNA 水平均升高 (均 *P* < 0.05), 而 *P66SHC* 的 mRNA 水平下降 (*P* = 0.000); Western blotting 结果与 qPCR 的结果一致 (图 3D)。

2.4 SIRT1 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SVOG 细胞氧化应激损伤的影响

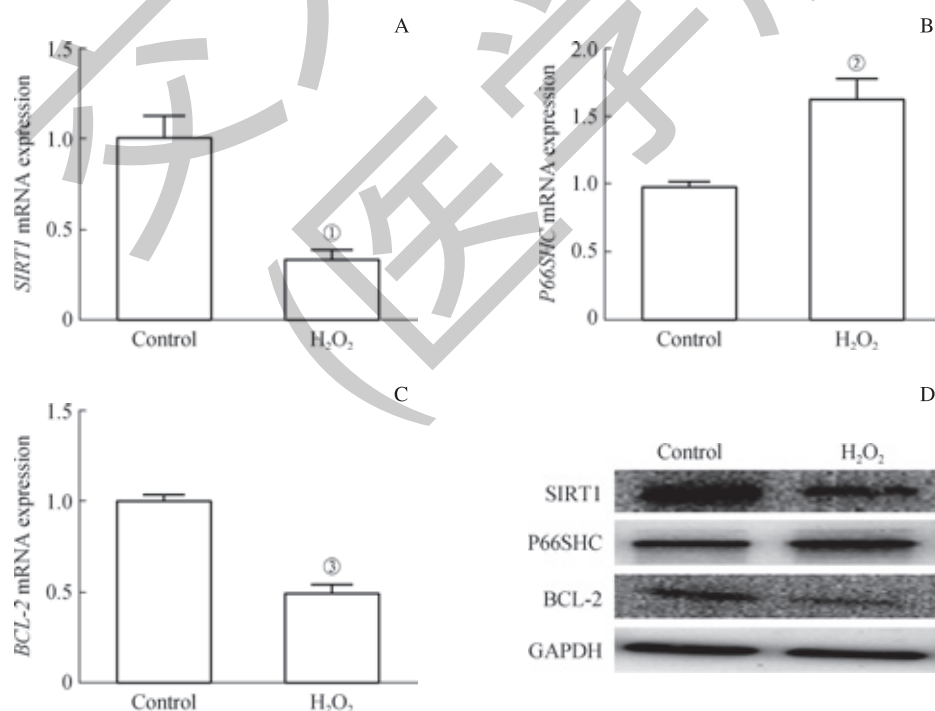
SVOG 细胞转染 *SIRT1* 过表达质粒及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比 (图 4), 细胞核形态正常, 呈圆形或椭圆形, 荧光分布均匀; MDA 含量下降 (*P* = 0.038), SOD 活性升高 (*P* = 0.021)。这些结果提示上调 *SIRT1* 表达可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SVOG 细胞氧化应激损伤。



**Note:** A. Cell viability detected by CCK8 in SVOG cells treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . B. Cell viability detected by DAPI staining in SVOG cells treated with  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 12 h ( $\times 200$ ). C. The MDA level in SVOG cells treated with  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 12 h. D. The SOD activity in SVOG cells treated with  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 12 h. <sup>①</sup>  $P=0.002$ , <sup>②</sup>  $P=0.003$ , <sup>③</sup>  $P=0.001$ , <sup>④</sup>  $P=0.017$ , <sup>⑤</sup>  $P=0.004$ , <sup>⑥</sup>  $P=0.005$ , <sup>⑦</sup>  $P=0.006$ , compared with the control ( $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) group.

**图 1**  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理诱导的人卵巢颗粒细胞 SVOG 氧化应激损伤

**Fig 1**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in human ovarian granulosa cells SVOG

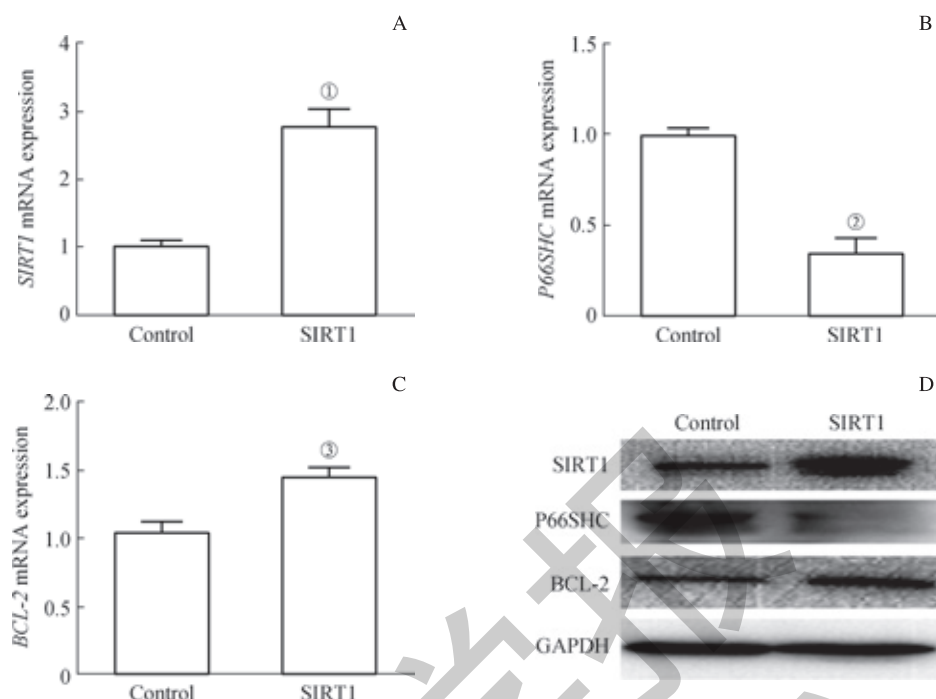


**Note:** A. SIRT1 mRNA expression. B. P66SHC mRNA expression. C. BCL-2 mRNA expression. D. SIRT1, P66SHC and BCL-2 protein expressions. <sup>①</sup>  $P=0.001$ , <sup>②</sup>  $P=0.002$ , <sup>③</sup>  $P=0.000$ , compared with the control group.

**图 2**  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理人卵巢颗粒细胞 SVOG 12 h 后 SIRT1、P66SHC 与 BCL-2 mRNA 和蛋白表达水平的变化

**Fig 2** Changes of mRNA and protein expression levels of SIRT1, P66SHC and BCL-2 in the human ovarian granulosa cells SVOG treated with  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 12 h

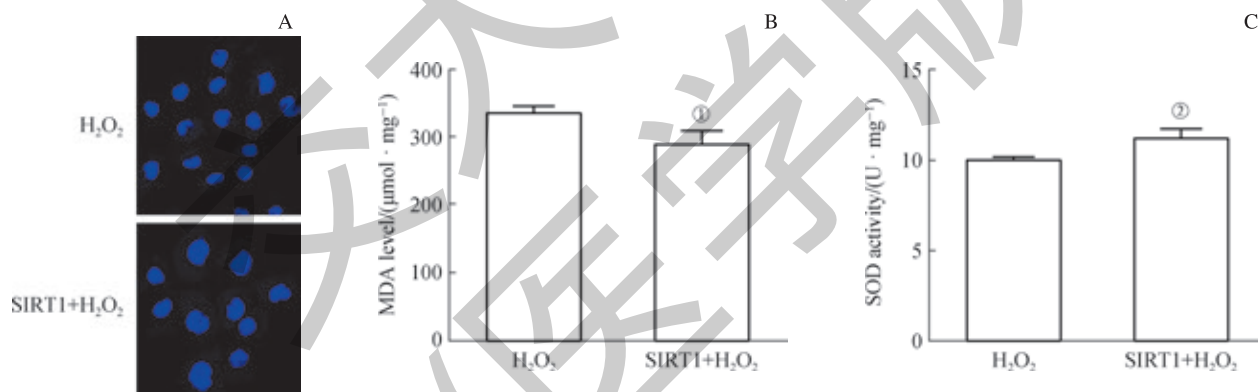




**Note:** A. *SIRT1* mRNA expression. B. *P66SHC* mRNA expression. C. *BCL-2* mRNA expression. D. *SIRT1*, *P66SHC* and *BCL-2* protein expressions. <sup>①</sup> $P=0.003$ , <sup>②</sup> $P=0.000$ , <sup>③</sup> $P=0.004$ , compared with the control group.

**图 3** SIRT1 过表达质粒转染后对人卵巢颗粒细胞 SVOG 的 *P66SHC* 与 *BCL-2* mRNA 和蛋白表达水平的影响

**Fig 3** Effects of *SIRT1* overexpression plasmid transfection on mRNA and protein expression levels of *P66SHC* and *BCL-2* in the human ovarian granulosa cells SVOG



**Note:** A. Cell viability measured by DAPI staining in  $H_2O_2$ -treated SVOG cells after overexpression of *SIRT1* gene ( $\times 200$ ). B. The level of MDA in  $H_2O_2$ -treated SVOG cells after overexpression of *SIRT1* gene. C. The activity of SOD in  $H_2O_2$ -treated SVOG cells after overexpression of *SIRT1* gene. <sup>①</sup> $P=0.038$ , <sup>②</sup> $P=0.021$ , compared with  $H_2O_2$  group.

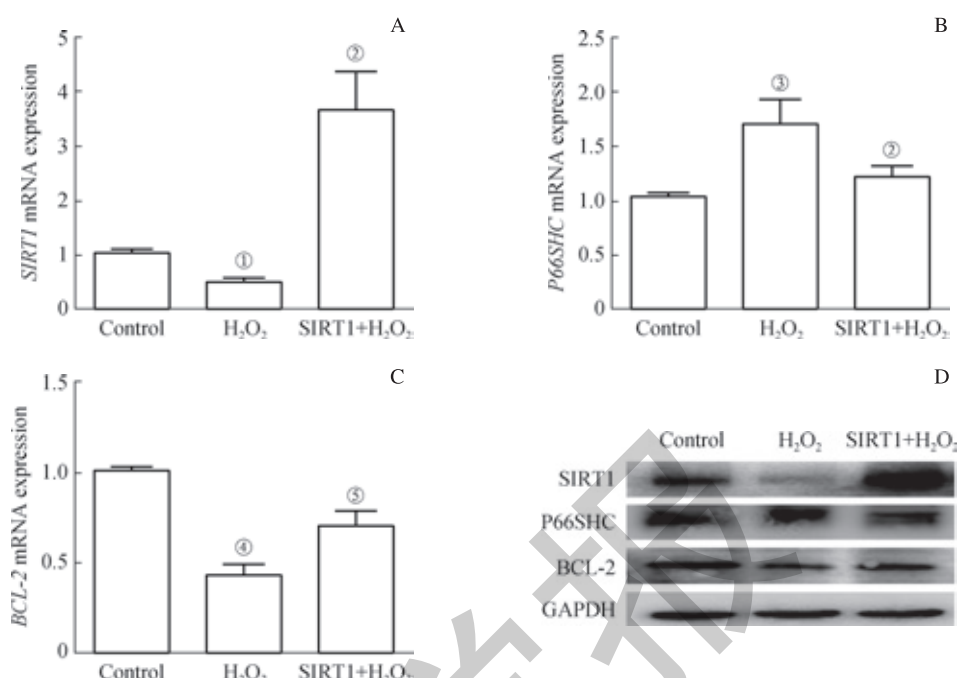
**图 4** SIRT1 过表达质粒转染后对  $H_2O_2$  诱导人卵巢颗粒细胞 SVOG 氧化应激损伤的影响

**Fig 4** Effect of *SIRT1* overexpression plasmid transfection on oxidative stress injury induced by  $H_2O_2$  in human ovarian granulosa cells SVOG

## 2.5 过表达 SIRT1 对氧化应激状态下 SVOG 细胞 *P66SHC* 及 *BCL-2* 表达的影响

SIRT1 过表达后, 氧化应激状态下 SVOG 细胞的 *P66SHC* 及 *BCL-2* mRNA 和蛋白表达水平见图 5。qPCR 结果显示, SVOG 细胞转染 SIRT1 过表达质粒及  $H_2O_2$

处理后与  $H_2O_2$  组比较, *P66SHC* 表达下降 ( $P=0.002$ ), *BCL-2* 表达升高 ( $P=0.013$ )。Western blotting 结果与 qPCR 的结果一致。这表明 SIRT1 可能是通过调控 *P66SHC* 及 *BCL-2* 的表达参与  $H_2O_2$  诱导的 SVOG 细胞氧化应激损伤。



**Note:** A. *SIRT1* mRNA expression. B. *P66SHC* mRNA expression. C. *BCL-2* mRNA expression. D. *SIRT1*, *P66SHC* and *BCL-2* protein expressions. <sup>①</sup>  $P=0.001$ , <sup>②</sup>  $P=0.006$ , <sup>③</sup>  $P=0.005$ , compared with the control group; <sup>④</sup>  $P=0.002$ , <sup>⑤</sup>  $P=0.013$ , compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

**图 5** SIRT1 过表达质粒转染后对氧化应激状态下人卵巢颗粒细胞 SVOG 的 *P66SHC* 与 *BCL-2* mRNA 和蛋白表达水平的影响

**Fig 5** Effects of SIRT1 overexpression plasmid transfection on mRNA and protein expression levels of *P66SHC* and *BCL-2* in human ovarian granulosa cells SVOG under oxidative stress

### 3 讨论

正常情况下, 机体内的氧化与抗氧化系统维持动态平衡。当这种平衡状态被有害刺激打破时, 就会导致氧化应激损伤, 表现为多种疾病组织病理渐进性损伤变化。在女性生殖系统中, 氧化应激可导致卵巢颗粒细胞功能异常甚至凋亡<sup>[13]</sup>, 进而导致卵巢功能受损, 但其具体机制尚未阐明。本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SVOG 细胞株, 建立颗粒细胞体外氧化应激损伤模型, 探索缓解卵巢颗粒细胞氧化应激损伤的分子靶点及其作用机制。

作为 ROS 的主要成员, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的羟自由基可引发脂质过氧化反应, 促进 ROS 产生, 诱导细胞氧化损伤。我们的早期研究<sup>[12]</sup> 在滋养细胞上也观察到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够诱导滋养细胞氧化损伤, 促进 ROS 产生, 破坏线粒体膜电位。因此, 本研究也通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理来诱导卵巢颗粒细胞氧化损伤, 建立氧化应激模型。本实验结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 SVOG 细胞活力下降, 细胞核明显缩小, 染色质凝集呈颗粒团块状分布, 表明颗粒细胞发生凋亡。氧化应激可导致机体内抗氧化物质和氧化物生成之间的不平衡状态, 过量 ROS 能够攻击细胞生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 并形成脂质过氧化物。MDA 是脂质过氧化反应的重要产物, 能引起蛋白质、核酸等生物大分子的交

联, 产生细胞毒性作用。另一方面, ROS 消耗细胞内的抗氧化物质, 引起细胞内抗氧化酶 (如 SOD) 活性下降<sup>[14]</sup>。SVOG 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 脂质过氧化物 MDA 水平显著升高, 而抗氧化酶 SOD 水平明显下降; 说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理能够有效诱导卵巢颗粒细胞产生氧化应激损伤。

SIRT1 可以通过对其底物分子的去乙酰化作用, 参与多种细胞生理过程。大量研究表明, SIRT1 参与调控细胞的氧化应激从而影响细胞的存活。Gay 等<sup>[15]</sup> 报道在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的神经元细胞氧化损伤模型中 SIRT1 表达下降; Prola 等<sup>[16]</sup> 研究发现, 抑制或降低 SIRT1 活性会加重内质网诱导型心肌损伤, 激活 SIRT1 则会对心肌细胞产生保护作用。近年来的研究表明 SIRT1 也参与调控卵巢功能。如在肥胖小鼠中, 使用 SIRT1 激动剂可以通过激活 SIRT1 信号通路以及抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路恢复卵巢功能, 并且延长卵巢的寿命<sup>[9]</sup>。在多囊卵巢综合征大鼠模型体内, 卵巢表达 SIRT1 的水平显著下降<sup>[8]</sup>。Lai 等<sup>[17]</sup> 报道, 患有多囊卵巢综合征的不孕妇女颗粒细胞的氧化应激水平高于输卵管因素导致的不孕妇女, 可能进一步影响卵子和胚胎质量, 从而影响体外受精胚胎移植的助孕结局。本研究在卵巢颗粒细胞体外氧化应激损伤模型中也发现, 250 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 可诱发 SVOG 细胞氧化应激损伤, 同时 SIRT1

表达降低;而 SVOG 细胞转染 SIRT1 过表达质粒后再经  $H_2O_2$  处理,细胞 MDA 含量下降,SOD 活性上升,表明上调 SIRT1 表达具有抗卵巢颗粒细胞氧化应激损伤作用。

衔接蛋白 P66SHC 是调控氧化应激和生命周期的关键因子,可以感知氧化应激信号的刺激,从细胞质转位至线粒体,氧化细胞色素 C 产生大量 ROS,造成细胞的氧化损伤<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>发现,小鼠 *P66shc* 基因敲除后,机体对抗氧化应激诱导的 DNA 损伤和细胞凋亡能力增强,寿命延长。SIRT1 是调控细胞氧化应激的重要分子,可以通过直接或间接途径调控 P66SHC 表达。Wils 等<sup>[20]</sup>研究发现,在高糖诱导的心血管内皮损伤过程中,SIRT1 和 P53 均可通过影响 P66SHC 的表达水平调控 ROS 的产生;在组织和 DNA 损伤时,SIRT1 可通过作用于 P53,减少 P53 依赖的细胞凋亡<sup>[21]</sup>;而 P66SHC 作为 P53 的下游信号分子参与氧化应激介导的细胞凋亡<sup>[22]</sup>。本研究发现  $H_2O_2$  诱导 SVOG 细胞氧化损伤,伴随着 SIRT1 表达下降,P66SHC 表达显著升高。过表达 *SIRT1* 基因则抑制 *P66SHC* 基因表达,细胞氧化损伤减轻。这些结果提示 SIRT1 可能通过抑制 *P66SHC* 的表达从而缓解  $H_2O_2$  诱导的细胞氧化

损伤。

氧化应激状态下,ROS 过量导致 DNA 损伤,可激活 P53 并快速转移到线粒体,与线粒体膜上的 BCL-2 家族成员相互作用,调节细胞凋亡<sup>[23]</sup>。BCL-2 能够阻止细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质,从而抑制细胞凋亡,是参与调控线粒体凋亡途径的凋亡抑制蛋白<sup>[24]</sup>。BCL-2 也可以通过减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成,发挥间接的抗氧化作用<sup>[25]</sup>。本研究显示,在  $H_2O_2$  诱导的 SVOG 细胞氧化损伤模型中,SIRT1 表达下降的同时,BCL-2 表达下降;SIRT1 过表达后再经  $H_2O_2$  处理,BCL-2 表达上调。这些结果提示 SIRT1 可能通过上调 BCL-2 表达缓解  $H_2O_2$  诱导的细胞氧化损伤。

综上所述,在  $H_2O_2$  诱导的人颗粒细胞 SVOG 体外氧化应激损伤模型中,调控细胞氧化应激的 SIRT1 表达降低;转染过表达 SIRT1 后,SVOG 细胞氧化损伤减轻,促过氧化损伤的 P66SHC 表达下调,抗过氧化的 BCL-2 表达上调。本研究发现了 SIRT1 参与调控人卵巢颗粒细胞氧化应激损伤的一种可能机制,进一步的研究将有望为临床上保护卵巢功能的治疗提供新的靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Albertini DF. A cell for every season: the ovarian granulosa cell[J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(10): 877-878.
- [2] Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, et al. Apoptosis in mammalian oocytes: a review[J]. Apoptosis, 2015, 20(8): 1019-1025.
- [3] Tiwari M, Tripathi A, Chaube SK. Presence of encircling granulosa cells protects against oxidative stress-induced apoptosis in rat eggs cultured *in vitro*[J]. Apoptosis, 2017, 22(1): 98-107.
- [4] Yang HY, Xie Y, Yang DY, et al. Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25310-25322.
- [5] Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, et al. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(2-3): 91-97.
- [6] Bonkowski MS, Sinclair DA. Slowing ageing by design: the rise of NAD<sup>+</sup> and sirtuin-activating compounds[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(11): 679-690.
- [7] Zhang WJ, Huang QB, Zeng ZH, et al. Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 7543973.
- [8] Tao X, Zhang X, Ge SQ, et al. Expression of SIRT1 in the ovaries of rats with polycystic ovary syndrome before and after therapeutic intervention with exenatide[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7): 8276-8283.
- [9] Zhou XL, Xu JJ, Ni YH, et al. SIRT1 activator (SRT1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice *via* activating SIRT1 and suppressing mTOR signaling[J]. J Ovarian Res, 2014, 7: 97.
- [10] Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, et al. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 659687.
- [11] Lang JY, Ma K, Guo JX, et al. Oxidative stress induces B lymphocyte DNA damage and apoptosis by upregulating p66shc[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(4): 1051-1060.
- [12] Tang CL, Liang J, Qian JF, et al. Opposing role of JNK-p38 kinase and ERK1/2 in hydrogen peroxide-induced oxidative damage of human trophoblast-like JEG-3 cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(3): 959-968.
- [13] Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome[J]. J Biomed Sci, 2016, 23: 36.
- [14] Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, et al. Oxidative stress in placental pathology[J]. Placenta, 2018, 69: 153-161.
- [15] Gay NH, Phopin K, Suwanjang W, et al. Neuroprotective effects of phenolic and carboxylic acids on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. Neurochem Res, 2018, 43(3): 619-636.
- [16] Prola A, Pires Da Silva J, Guilbert A, et al. SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 $\alpha$  deacetylation[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 343-356.
- [17] Lai QH, Xiang WP, Li Q, et al. Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome[J]. Front Med, 2018, 12(5): 518-524.
- [18] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. Cell, 2005, 122(2): 221-233.
- [19] Ramsey JJ, Tran D, Giorgio M, et al. The influence of Shc proteins on life span in mice[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014, 69(10): 1177-1185.
- [20] Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes[J]. Pharmacol Ther, 2017, 170: 98-115.
- [21] Ong ALC, Ramasamy TS. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming[J]. Ageing Res Rev, 2018, 43: 64-80.
- [22] Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, et al. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2002, 21(24): 3872-3878.
- [23] Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53[J]. FEBS Lett, 2001, 493(2-3): 65-69.
- [24] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 65-80.
- [25] Wang GX, Tu HC, Dong YY, et al.  $\Delta$ Np63 inhibits oxidative stress-induced cell death, including ferroptosis, and cooperates with the BCL-2 family to promote clonogenic survival[J]. Cell Rep, 2017, 21(10): 2926-2939.

[收稿日期] 2020-04-05

[本文编辑] 瞿麟平

