

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.09.018

论著 · 基础

过表达 PRC1 对磷酸胺氮芥诱导后卵巢颗粒细胞增殖与凋亡的影响

徐数理, 黄欣怡, 曾文卓, 孙晓峰



基金项目: 国家自然科学基金(81774362, 81303004); 湖南省自然科学基金(2018JJ2290); 长沙市自然科学基金(kq2208187)

作者单位: 410208 长沙, 湖南中医药大学医学院(徐数理、黄欣怡、曾文卓、孙晓峰); 417000 湖南娄底, 娄底职业技术学院

学院医学院(曾文卓)

通信作者: 孙晓峰, E-mail: 003729@hnuem.edu.cn

【摘要】 目的 研究过表达胞质分裂蛋白调节因子 1 (PRC1) 对磷酸胺氮芥诱导后卵巢颗粒细胞增殖与凋亡的影响。方法 2023 年 4 月—2024 年 1 月在湖南中医药大学医学院实验室进行实验。使用磷酸胺氮芥 (PM) 处理原代大鼠卵巢颗粒细胞模拟化疗损伤, 通过慢病毒转染实现 PRC1 过表达。实验组别包括过表达空载组 (OE-NC 组)、OE-NC+PM 组、过表达 PRC1 组 (OE-PRC1 组) 及 OE-PRC1+PM 组。采用 CCK8 和 EdU 染色法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡情况, 蛋白印迹实验 (WB) 检测 PRC1 和凋亡相关蛋白水平。结果 与未经 PM 处理的 OE-NC 组和 OE-PRC1 组比较, OE-NC+PM 组和 OE-PRC1+PM 组的细胞活性、EdU 阳性细胞数、细胞总数、EdU 阳性细胞率、Bcl-2 和 PRC1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 细胞周期分布发生紊乱, Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 OE-NC 组比较, OE-NC+PM 组的细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$); 与 OE-PRC1 组比较, OE-PRC1+PM 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 OE-NC 组比较, OE-PRC1 组的细胞活性、EdU 阳性细胞数、细胞总数、EdU 阳性细胞率、Bcl-2 和 PRC1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与 OE-NC+PM 组比较, OE-PRC1+PM 组的细胞活性、EdU 阳性细胞数、细胞总数、EdU 阳性细胞率、Bcl-2 和 PRC1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 细胞凋亡率显著减少 ($P < 0.01$), OE-PRC1+PM 组细胞的 S 期抬高, DNA 合成加速, Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 过表达 PRC1 可促进化疗损伤卵巢颗粒细胞增殖并抑制其凋亡。

【关键词】 卵巢颗粒细胞; 化疗损伤; 胞质分裂蛋白调节因子 1; 磷酸胺氮芥; 细胞增殖; 细胞凋亡**【中图分类号】** R730.6**【文献标识码】** A

Effect of PRC1 overexpression on proliferation and apoptosis in chemotherapy-damaged ovarian granulosa cells Xu

Shuli*, Huang Xinyi, Zeng Wenzhuo, Sun Xiaofeng.* School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Hunan, Changsha 410208, China

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81774362, 81303004); Hunan Provincial Natural Science Foundation (2018JJ2290); Natural Science Foundation of Changsha City (kq2208187)

Corresponding author: Sun Xiaofeng, E-mail: 003729@hnuem.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1) overexpression on proliferation and apoptosis in ovarian granulosa cells (GCs) damaged by phosphoramidate mustard (PM). **Methods** From April 2023 to January 2024, conducted experiments in the laboratory of the Medical College of Hunan University of Chinese Medicine. Primary rat GCs were treated with PM to simulate chemotherapy injury. Lentiviral transfection achieved PRC1 overexpression. Groups: OE-NC (empty vector), OE-NC+PM, OE-PRC1, OE-PRC1+PM. CCK-8, EdU staining, flow cytometry, and Western blot assessed proliferation, apoptosis, and protein levels. **Results** PM reduced cell viability, EdU+ cells, Bcl-2, and PRC1 while increasing Bax and Cleaved-Caspase-3 (all $P < 0.01$). PRC1 overexpression reversed these effects ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and accelerated S-phase progression. OE-PRC1+PM showed lower apoptosis than OE-NC+PM ($P < 0.01$). **Conclusion** PRC1 overexpression promotes proliferation and inhibits apoptosis in chemotherapy-damaged GCs.

【Key words】 Ovarian granulosa cells; Chemotherapy damage; Protein regulator of cytokinesis 1; Phosphoramidate mustard; Proliferation; Apoptosis

卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 是卵巢内重要的功能性细胞群^[1]。GCs 与卵母细胞存在的双向转导对卵泡的发生发育有重要影响^[2]。环磷酰胺广泛用于多种实体瘤和血液系统肿瘤的化疗中,包括乳腺癌、淋巴瘤、白血病等。研究显示,环磷酰胺及其活性代谢物对卵巢颗粒细胞具有显著损伤^[3]。磷酰胺氮芥 (phosphoramidate mustard, PM) 是环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 的活性代谢产物^[4]。PM 具有强烈的细胞毒性,通过与 DNA 交联来干扰复制和转录,GCs 是增殖分裂活跃的细胞,是 PM 的靶向细胞之一^[5-6]。GCs 受到损伤不仅会影响卵泡的发育,还会导致卵巢储备功能下降,进而造成卵巢早衰和生育力下降^[7]。因此对于女性肿瘤患者而言,探讨如何保护与恢复化疗后的生育能力具有重要意义。

在课题组前期研究中,通过 mRNA 的高通量测序结合生信分析,结果显示,与正常组比较,胞质分裂蛋白调节因子 1 (protein regulator of cytokinesis 1, PRC1) 在化疗损伤 GCs 模型中表达下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且为关键调节因子^[8]。PRC1 通过调节染色体动力学和细胞质分裂,在卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中发挥不可或缺的作用^[9]。基于此,现对 PRC1 在磷酰胺氮芥诱导后 GCs 中的作用进行研究,以期对化疗药物损伤 GCs 的影响及机制提供实验依据,为化疗后女性生育力保留提供新思路,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 细胞、药物:原代大鼠卵巢 GCs (武汉普诺赛公司);磷酰胺氮芥 (美国 MCE, CAS 号:50-18-0)。(2) 试剂及仪器:胎牛血清、DMEM/F12 培养基 (以色列 Biological Industries);青霉素—链霉素、胰蛋白酶、EdU 染色试剂盒 (上海碧云天公司);CCK8 试剂 (广州 Biosharp);APC-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒 (上海百赛);PI 染料 (索莱宝公司,北京);ECL 发光液 (美国 Abbkine);PRC1 过表达慢病毒 (安徽通用公司);PRC1 抗体、Bax 抗体 (英国 abcam);GAPDH 抗体、Bcl-2 抗体 (武汉三鹰公司);Cleaved-Caspase-3 抗体 (美国 CST);辣根过氧化物酶标记抗兔二抗、抗鼠二抗 (艾碧维公司,长沙);小型垂直电泳槽、转印槽、电泳仪、化学发光凝胶成像分析仪、流式细胞仪 (美国 Bio-Rad);细胞培养箱 (德国 Binder);酶标仪 (湖南智科公司);低温高速离心机 (美国 ThermoFisher)。

1.2 方法 2023 年 4 月—2024 年 1 月在湖南中医药大学医学院实验室进行实验。

1.2.1 细胞培养和分组:完全培养基用 90% DMEM-F12、10% 胎牛血清 (FBS) 及 1% 青霉素—链霉素充分

混匀配置而成。复苏原代大鼠 GCs,于完全培养基中进行培养,培养中每隔 2 天更换一次培养基。当镜下观察细胞密度达到 85% 左右,用胰蛋白酶将细胞消化至细胞悬液状态后进行传代处理。取对数生长期的细胞用于本研究,将 GCs 细胞转染后分为过表达空载组 (OE-NC 组)、过表达 PRC1 组 (OE-PRC1 组)。根据预实验,选择 MOI = 100 进行感染。计算每孔所需病毒量后加入,继续在 37℃ 下培养 24 h,镜下观察细胞状态,若细胞状态良好,则添加完全培养基继续培养。感染 72 h 后,GCs 细胞在荧光显微镜 ($\times 100$) 下可见 EGFR 表达呈阳性。通过定量逆转录聚合酶链式反应和蛋白印迹实验 (WB) 验证转染效果,结果显示:与 OE-NC 组比较,OE-PRC1 组中 PRC1 的 mRNA 及蛋白表达水平显著升高,且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),表明 PRC1 过表达成功。整个研究分组为:OE-NC 组、OE-NC + PM 组、OE-PRC1 组、OE-PRC1 + PM 组。

1.2.2 CCK8 法检测细胞活力:收集对数生长期 GCs 并将细胞密度调整为 2.5×10^3 /孔,接种于 96 孔板,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,待细胞贴壁后,对照组加完全培养基,实验组则参照前期研究^[10]加入含有 300 $\mu\text{mol/L}$ PM 的培养基或单独行慢病毒感染,或同时加入,下同。继续培养 24 h,每孔加入 CCK8 试剂 10 μl 后,在培养箱避光孵育,3.5 h 后在酶标仪的 450 nm 处测定 OD 值,实验重复 3 次并取平均值。

1.2.3 EdU 染色检测细胞增殖:同 1.2.2 进行种板及干预。各组处理 24 h 后,每孔加入 EdU 工作液 100 μl ,放置细胞培养箱孵育过夜。用 4% 多聚甲醛室温下固定细胞 30 min 后弃去。PBS 溶液润洗后每孔加入 0.5% Triton-100 100 μl ,室温下 20 min;PBS 清洗后,每孔加入 click-iT 工作液 100 μl 后室温下避光孵育 30 min;弃掉染液用 PBS 清洗;每孔加入 Hoechst 33342 工作液 100 μl ,室温下避光孵育 15~30 min;吸弃染液后,用 PBS 润洗细胞 2 次,立即于荧光显微镜下观察 ($\times 200$)。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率:收集对数生长期 GCs 种皿,分组处理方法同 1.2.2;细胞处理 24 h 后收集细胞,1 000 r/min、5 min 条件下离心后弃去上清液;用 4℃ 预冷的 PBS 对细胞沉淀洗涤 2 次后计数,确保实验细胞数量 $\geq 1 \times 10^5$;每组加入 Binding buffer (1 \times) 100 μl 重悬细胞,加入 APC-Annexin V 5 μl 和 PI 5 μl 混匀,室温下避光孵育 15 min 后加入 Binding Buffer (1 \times) 400 μl 混匀,用 300 目筛网过滤后立即上机分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期分布情况:调整细胞悬液浓度为 3×10^5 /ml,加入 80%乙醇后放置 -20°C 冰箱过夜进行固定;1 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液后用 PBS 洗涤细胞沉淀 3 次;加入 PI 染液,浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$,体积为 $400 \mu\text{l}$;避光孵育 30 min 后进行流式上机检测,ModFit LT 分析数据。

1.2.6 蛋白印迹实验(WB)检测细胞中 PRC1、Bax、Bcl-2 和 Cleaved-Caspase-3 的蛋白表达:用 4°C 预冷的 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白,蛋白样本通过聚丙烯酰胺电泳分离后将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,用脱脂牛奶于室温下封闭 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,PVDF 膜放于 PRC1、Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase-3、GAPDH(均为 1:1 000)中置于 4°C 摇床过夜。再次用 TBST 洗膜 3 次,根据一抗种属加入二抗(1:5 000)在室温下孵育 2 h,再次用 TBST 洗膜 3 次后在成像系统下进行成像,并用 ImageJ 分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 进行统计分析,GraphPad Prism 9 软件进行图表绘制。计量资料首先使用 Shapiro—Wilktest 和 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性,若符合正态性和方差齐性,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;若不符合正态性和方差齐性,则使用 Kruskal-Wallis 检验,若 Kruskal-Wallis 检验有统计学意义,则用 Dunnett's Test 进行比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

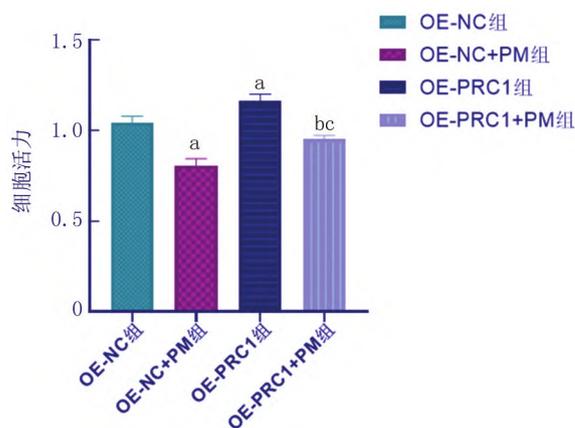
2 结果

2.1 过表达 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞活力的影响 与未经 PM 处理的 OE-NC 组和 OE-PRC1 组比较,OE-NC+PM 组和 OE-PRC1+PM 组的细胞活性均显著降低($P < 0.01$);与 OE-NC 组比较,OE-PRC1 组的细胞活性显著升高($P < 0.01$);与 OE-NC+PM 组比较,OE-PRC1+PM 组的细胞活性显著升高($P < 0.01$),见图 1。

2.2 过表达 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞增殖能力的影响 与未经 PM 处理过的 OE-NC 组和 OE-PRC1 组比较,OE-NC+PM 组和 OE-PRC1+PM 组的 EdU 阳性细胞数、细胞总数和 EdU 阳性细胞率均显著降低($P < 0.01$);与 OE-NC 组比较,OE-PRC1 组的 EdU 阳性细胞数、细胞总数和 EdU 阳性细胞率显著升高($P < 0.01$);与 OE-NC+PM 组比较,OE-PRC1+PM 组的 EdU 阳性细胞数、细胞总数和 EdU 阳性细胞率显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 2、表 1。

2.3 过表达 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞凋亡的影响 与 OE-NC 组比较,OE-NC+PM 组的细胞凋亡率

显著增加($P < 0.01$);与 OE-PRC1 组比较,OE-PRC1+PM 组的细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OE-NC 组比较,OE-PRC1 组的细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OE-NC+PM 组比较,OE-PRC1+PM 组的细胞凋亡率显著减少($P < 0.01$),见图 3、4。



注:与 OE-NC 组比较,^a $P < 0.01$;与 OE-NC+PM 组比较,^b $P < 0.01$;与 OE-PRC1 组比较,^c $P < 0.01$ 。

图 1 CCK8 法检测各组 GCs 细胞活力情况

Fig.1 Detection of cell viability of GCs in each group using the CCK8 method

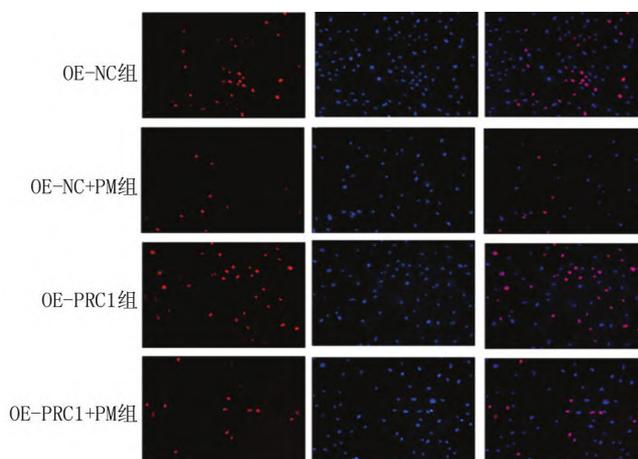


图 2 各组细胞 EdU 染色情况($\times 200$)

Fig.2 EdU staining of cells in each group ($\times 200$)

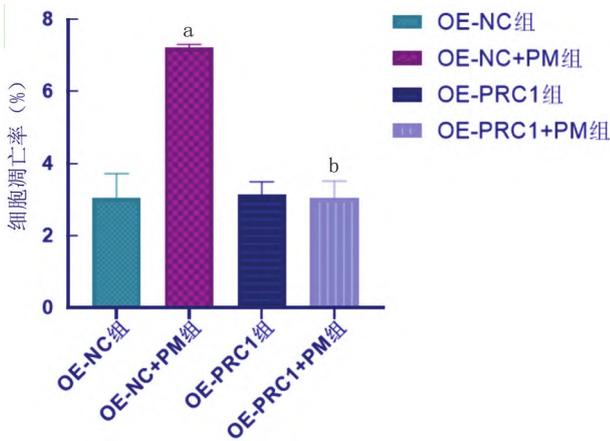
2.4 过表达 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞周期分布的影响 流式细胞术检测显示,与未经 PM 处理过的 OE-NC 组和 OE-PRC1 组比较,OE-NC+PM 组和 OE-PRC1+PM 组的细胞周期分布发生紊乱;与 OE-NC+PM 组比较,OE-PRC1+PM 组细胞的 S 期抬高,DNA 合成加速,见图 5。

表 1 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effect of PRC1 on the proliferative capacity of GCs cells after PM injury

组别	n	EdU 阳性细胞数	细胞总数	EdU 阳性细胞率 (%)
OE-NC 组	3	24.67±1.15	82.67±1.53	0.30±0.01
OE-NC+PM 组	3	8.67±0.58 ^a	51.67±5.69 ^a	0.17±0.01 ^a
OE-PRC1 组	3	44.67±3.21 ^a	103.33±6.66 ^a	0.43±0.03 ^a
OE-PRC1+PM 组	3	18.33±0.58 ^{b,c}	79.67±3.21 ^{b,c}	0.23±0.01 ^{b,c}
F 值		225.300	60.570	139.600
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 OE-NC 组比较,^a $P<0.01$;与 OE-NC+PM 组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$;与 OE-PRC1 组比较,^c $P<0.01$ 。



注:与 OE-NC 组比较,^a $P<0.01$;与 OE-NC+PM 组比较,^b $P<0.01$ 。

图 4 流式细胞术检测各组细胞凋亡率比较

Fig. 4 Comparison of apoptosis rates among various groups detected by flow cytometry

2.5 过表达 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞 Bax、Bcl-2 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响 与未经 PM 处理过的 OE-NC 组和 OE-PRC1 组比较,OE-NC+PM 组

和 OE-PRC1+PM 组的 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$), Bcl-2、PRC1 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与 OE-NC 组比较,OE-PRC1 组的 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$), Bcl-2、PRC1 蛋白表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与 OE-NC+PM 组比较,OE-PRC1+PM 组的 Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$), Bcl-2、PRC1 蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图 6、表 2。

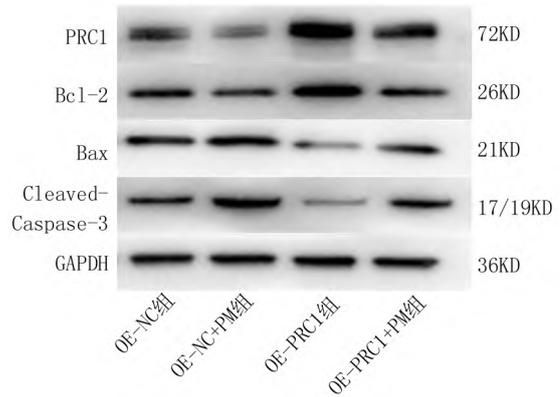


图 6 各组细胞 Bax、Bcl-2、PRC1、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达情况比较

Fig.6 Comparison of Bax, Bcl-2, PRC1, and Cleaved-Caspase-3 protein expression in various groups of cells

3 讨论

化疗源性卵巢早衰 (chemotherapy associated ovarian failure, COF) 是一种医源性疾病,是指女性在使用化疗药物后导致卵巢作为内分泌腺和生殖器官的功能受损。其损伤机制主要是通过诱导卵母细胞和 GCs 产生 DNA 交联引发细胞凋亡,导致卵泡过度激活

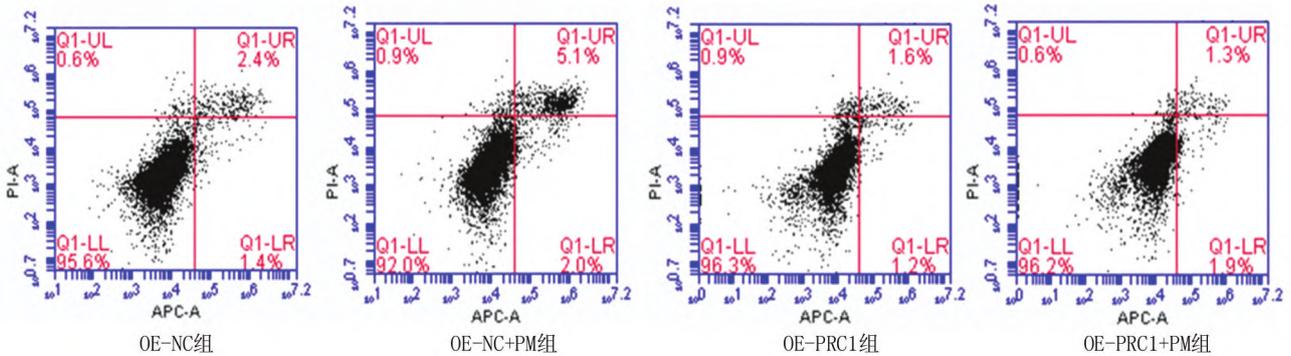
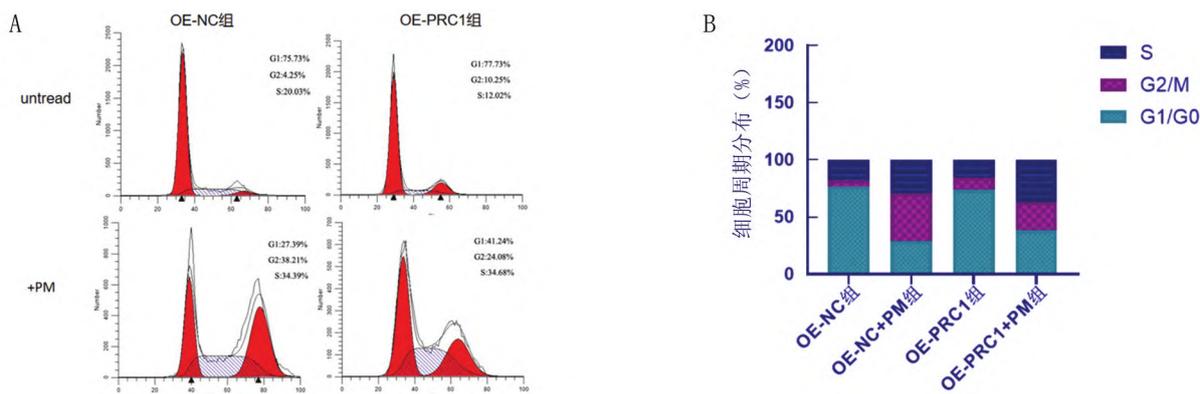


图 3 各组 GCs 细胞凋亡情况比较

Fig.3 Comparison of apoptosis in GCs cells across groups



注:A.各组细胞周期分布图;B.各组细胞周期分布统计图

图 5 流式细胞术检测细胞周期分布情况

Fig.5 Flow cytometry detection of cell cycle distribution

表 2 PRC1 对 PM 损伤后 GCs 细胞 Bax、Bcl-2 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白水平的影响 (x±s)

Tab.2 Effect of PRC1 on the protein levels of Bax, Bcl-2, and Cleaved-Caspase-3 in GCs cells after PM injury

组别	n	Bax	Bcl-2	PRC1	Cleaved-Caspase-3
OE-NC 组	3	0.76±0.09	0.91±0.05	0.59±0.07	0.73±0.07
OE-NC+PM 组	3	1.03±0.15 ^a	0.49±0.10 ^A	0.36±0.03 ^A	1.20±0.07 ^A
OE-PRC1 组	3	0.39±0.02 ^A	1.11±0.01 ^a	1.10±0.07 ^A	0.35±0.05 ^A
OE-PRC1+PM 组	3	0.75±0.06 ^{bC}	0.77±0.08 ^{BC}	0.83±0.16 ^{Bc}	0.70±0.11 ^{BC}
F 值		24.260	41.440	33.190	58.980
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 OE-NC 组比较,^AP<0.01,^aP<0.05;与 OE-NC+PM 组比较,^BP<0.01,^bP<0.05;与 OE-PRC1 组比较,^CP<0.01,^cP<0.05。

或休眠,最终导致卵泡闭锁。在化疗药物中以环磷酰胺为代表的烷化剂卵巢毒性最强,烷化剂作用于有丝分裂指数高的细胞。卵巢对化疗药物敏感,在卵巢体细胞中,卵母细胞并不发生增殖分裂,而 GCs 是卵泡中最大的细胞群,增殖分裂快,支持着卵泡的生长发育,GCs 的凋亡会导致卵泡的提前闭锁。本研究结果表明,PM 损伤处理 GCs 细胞后,细胞活力下降、细胞增殖能力下降、细胞凋亡率增加、细胞周期抑制导致 GCs 的 S 期、G2/M 期阻滞。这些结果证实 PM 促进 GCs 细胞凋亡并抑制细胞增殖,与课题组前期研究一致^[8]。

PRC1 属于微管相关蛋白家族,是细胞有丝分裂纺锤体中央区形成所必需的微管捆束蛋白^[11]。它不仅是细胞质分裂生物过程中的重要因子,也是周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinases, CDK)作用的底物蛋白,因此对细胞的增殖分裂和周期调控有着不可或缺的作用,一旦失调则会加剧染色体不稳定性(chromosome instability, CIN)^[12]。PRC1 在卵巢发育、功能维持和疾病中的作用也逐渐受到关注^[13]。在卵母细胞中,随着细胞体外发育,PRC1 的 mRNA 含量随之升高,有可能促进第一极体的排出^[14]。另一报道表明,PRC1 通过调节染色体动力学和细胞质分裂在卵母细胞的成熟和早

期胚胎发育中发挥了重要作用^[15]。PRC1 通过沉默特定的基因,维持卵巢中卵母细胞和 GCs 的正常分化与发育^[16]。有研究强调了 PRC1 在基因转录网络中的重要表观遗传调控因子作用以及对建立包括原始卵泡在内的卵巢储备的重要意义^[17]。已有研究表明,PRC1 的低表达会导致细胞增殖抑制、促进凋亡、导致细胞阻滞在 G2/M 期^[18]。另有研究表明,在细胞中敲低 PRC1 会导致细胞周期阻滞和凋亡,阻碍细胞的迁移和侵袭^[19]。而体外实验表明,过表达 PRC1 可促进细胞的增殖和迁移,并促进细胞进入分裂期^[20],与本研究类似。本研究通过实验论证了在磷酸氮芥诱导后 GCs 中 PRC1 对细胞功能的影响及其分子机制,证明过表达 PRC1 可以提高 PM 损伤后 GCs 的细胞活性,促进 PM 损伤后 GCs 细胞增殖能力且降低了对 G2/M 期的阻滞,有效抑制了 PM 对 GCs 带来的凋亡损伤。

Caspase-3 是一种半胱氨酸一天冬氨酸蛋白酶,作为凋亡家族的主要执行者,它也在细胞凋亡中起关键作用^[21]。在 Caspase-3 活化过程中经过剪切产生的活性片段—Cleaved-Caspase-3,其表达程度可反映 Caspase-3 的活性和细胞凋亡情况^[22]。Bcl-2 家族蛋白中的 Bcl-2 和 Bax,在调控细胞凋亡过程中发挥着至关

重要的作用^[23]。Bax 和 Bcl-2 之间的相互作用和动态平衡决定了线粒体外膜的通透性变化,进而导致凋亡相关蛋白进入细胞质,激活 Caspase 级联反应,最终引发细胞死亡^[24]。本研究发现,PM 损伤处理后,Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平降低。过表达 PRC1 后,Bax 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平降低、Bcl-2 蛋白表达水平升高,提示 PRC1 的过表达能够抑制 PM 诱导的细胞凋亡,从而可能在保护细胞存活方面发挥重要作用。

综上,在 PM 损伤处理后,卵巢 GCs 增殖能力受损,加速细胞凋亡,过表达 PRC1 对 PM 损伤后卵巢 GCs 有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、调节细胞周期的作用;其分子机制可能是通过上调 Bcl-2、下调 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 而引起的。提示 PRC1 有望成为治疗 COF 的潜在靶点。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

徐数理:设计研究方案,论文撰写;黄欣怡:论文修改;曾文卓:数据整理与分析;孙晓峰:研究指导

参考文献

[1] Babayev E, Duncan FE. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: The local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality[J]. *Biol Reprod*, 2022, 106(2):351-365. DOI: 10.1093/biolre/iaoh241.

[2] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality[J]. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(2):159-177. DOI: 10.1093/humupd/dmm040.

[3] Ganesan S, Keating AF. The ovarian DNA damage repair response is induced prior to phosphoramidate mustard-induced follicle depletion, and ataxia telangiectasia mutated inhibition prevents PM-induced follicle depletion [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 292: 65-74. DOI: 10.1016/j.taap.2015.12.010.

[4] Madden JA, Hoyer PB, Devine PJ, et al. Involvement of a volatile metabolite during phosphoramidate mustard-induced ovotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.taap.2014.03.006.

[5] Anderson RA, Wallace WH. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(6): 1469-1475. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.014.

[6] Ganesan S, Keating AF. Phosphoramidate mustard exposure induces DNA adduct formation and the DNA damage repair response in rat ovarian granulosa cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 282(3):252-258. DOI: 10.1016/j.taap.2014.11.017.

[7] Takahashi A, Yousif A, Hong L, et al. Premature ovarian insufficiency: Pathogenesis and therapeutic potential of mesenchymal stem cell [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(5): 637-650. DOI: 10.1007/s00109-021-02055-5.

[8] 黄欣怡. Plk1 在磷酸胺氮芥致卵巢颗粒细胞损伤中的作用及机制 [D]. 长沙:湖南中医药大学,2024.

[9] 曹杰, 李民, 蒯鹏帆, 等. PRC1 通过激活 Wnt/ β -catenin 途径促进胶质母细胞瘤细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(10):1747-1752.

[10] 黄欣怡, 曾文卓, 徐数理, 等. 基于转录组学分析研究左归丸对化疗损伤性颗粒细胞的保护机制 [J]. *中医药导报*, 2023, 29(3):23-29. DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2023.03.005.

[11] 梁志刚. PRC1 对非小细胞肺癌细胞增殖和周期的影响及潜在机制的研究 [D]. 苏州:苏州大学,2018.

[12] Zhou CJ, Wang DH, Kong XW, et al. Protein regulator of cytokinesis 1 regulates chromosome dynamics and cytoplasmic division during mouse oocyte meiotic maturation and early embryonic development [J]. *FEBS J*, 2020, 287(23):5130-5147. DOI: 10.1111/febs.15458.

[13] Guo J, Zhang T, Guo Y, et al. Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(23):E5326-E5333. DOI: 10.1073/pnas.1800352115.

[14] 王新洁, 许钟峯, 王海龙. PRC1 对于小鼠卵母细胞作用机制的初步研究 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2020, 28(2):10-14. DOI: 10.19848/j.cnki.ISSN1005-2739.2020.02.1601.

[15] 孙莹莹. 组蛋白 H3K9me3 在小鼠卵母细胞成熟过程中的作用及其机制研究 [D]. 郑州:郑州大学,2022.

[16] Maezawa S, Yukawa M, Hasegawa K, et al. PRC1 suppresses a female gene regulatory network to ensure testicular differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(8):501. DOI: 10.1038/s41419-023-05996-6.

[17] Gao M, Zhang T, Chen T, et al. Polycomb repressive complex 1 modulates granulosa cell proliferation in early folliculogenesis to support female reproduction [J]. *Theranostics*, 2024, 14(4):1371-1389. DOI: 10.7150/thno.89878.

[18] Hao Y, Zhu Y, Sun F, et al. MicroRNA-30c-5p arrests bladder cancer G2/M phase and suppresses its progression by targeting PRC1-mediated blocking of CDK1/Cyclin B1 axis [J]. *Cell Signal*, 2023, 110:110836. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110836.

[19] 戴龙飞. PRC1 在肝内胆管细胞癌中的表达与作用机制研究 [J]. *中国医药指南*, 2023, 21(19):75-77,81. DOI: 10.15912/j.cnki.gocm.2023.19.018.

[20] 马丹丹, 张翌, 林振宇, 等. PRC1 在胰腺癌中的细胞生物学功能及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(2):189-195. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.003.

[21] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(4):1633-1645. DOI: 10.1002/bab.2233.

[22] 李永宁, 肖晶晶, 赵建勇. Caspase-3 及 Cleaved-Caspase-3 在氟中毒大鼠肝脏中表达 [J]. *贵州医药*, 2016, 40(3):239-240,337.

[23] Samia S, Sandeep Chary P, Khan O, et al. Recent trends and advances in novel formulations as an armament in Bcl-2/Bax targeted breast cancer [J]. *Int J Pharm*, 2024, 653:123889. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.123889.

[24] Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10):732-748. DOI: 10.1038/s41580-023-00629-4.

(收稿日期:2024-11-05)