

• 基础研究 •

4-羟基过氧环磷酰胺通过靶向P53损伤人卵巢颗粒细胞线粒体自噬功能的研究

赵辰希¹, 徐 聪², 谢思远³, 高 超², 覃莲菊², 吴 畏^{1,2*}

¹南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院生殖医学中心, 江苏 南京 210029; ³南京中医药大学医学院·整合医学学院, 江苏 南京 210023

[摘 要] 目的: 探讨环磷酰胺体外活化物4-羟基过氧环磷酰胺(4-hydroperoxy cyclophosphamide, 4-HC)导致人卵巢颗粒细胞系SVOG功能损伤的效应及机制。方法: 以0.2、2.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的4-HC处理SVOG细胞24、48、72 h, CCK-8法检测各组细胞的细胞活力变化, 选择构建损伤模型的时间和浓度; Western blot、RT-qPCR法检测各组线粒体自噬通量的变化; 透射电镜观察正常组和4-HC损伤组线粒体的变化; RT-qPCR检测P53相关基因的表达; 免疫荧光法检测各组P53蛋白, Parkin蛋白以及线粒体外膜蛋白(translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20)的表达水平。结果: 在体外建立了2.0 $\mu\text{mol/L}$ 4-HC处理SVOG细胞48 h诱导的损伤模型。4-HC损伤的SVOG细胞中, 线粒体自噬通量受到抑制且线粒体形态异常, 受损线粒体明显增加; P53的表达水平明显增加; 且存在胞质中P53和Parkin蛋白结合增加, 而线粒体外膜蛋白TOMM20和Parkin蛋白的结合受到抑制。结论: 在体外, 4-HC可能是通过P53-Parkin通路抑制受损线粒体自噬导致人卵巢颗粒细胞受损。

[关键词] 4-羟基过氧环磷酰胺; P53; 线粒体自噬

[中图分类号] R321.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)12-1629-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN240993

Study on 4-Hydroperoxy cyclophosphamide targeting P53 to impair mitophagy function in human ovarian granulosa cells

ZHAO Chenxi¹, XU Cong², XIE Siyuan³, GAO Chao², QIN Lianju², WU Wei^{1,2*}

¹National Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Reproductive Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ³School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the *in vitro* activation product of cyclophosphamide, 4-hydroperoxy cyclophosphamide (4-HC), on the functional impairment of the human ovarian granulosa cell line SVOG, and the potential underlying mechanisms. **Methods:** SVOG cells were treated with 0.2, 2.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ of 4-HC for 24, 48, and 72 h. The cell viability in each group was measured using the CCK-8 assay to determine the optimal time and concentration for constructing an injury model. Western blot and RT-qPCR were used to detect changes in mitochondrial autophagy flux. Transmission electron microscopy was employed to observe mitochondrial changes in both normal and 4-HC-injured cells. RT-qPCR was used to assess the expression of P53-related genes, and immunofluorescence was applied to detect the expression levels of P53, Parkin, and the translocase of the outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) proteins. **Results:** A model of SVOG cell injury induced by 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 4-HC for 48 h was established *in vitro*. Mitochondrial autophagy flux was inhibited, and mitochondrial morphology was abnormal in 4-HC-injured SVOG cells, with a significant increase in damaged mitochondria. The expression level of P53 was significantly increased in 4-HC-injured SVOG cells. An increase in the cytoplasmic interaction between P53 and Parkin protein was observed, while the binding of TOMM20 and Parkin protein was inhibited in 4-HC-injured SVOG cells. **Conclusion:** *In vitro*, 4-HC may induce damage to human ovarian granulosa cells by inhibiting mitochondrial autophagy through the P53-Parkin pathway.

[Key words] 4-hydroperoxy cyclophosphamide; P53; mitophagy

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(12): 1629-1637]

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC2703203); 江苏省生殖医学创新中心(CXZX202207)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: weiwu77@163.com

环磷酰胺是一种常用的治疗实体癌症和血液系统恶性肿瘤的化疗药物,包括乳腺癌、骨癌、软组织肉瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和白血病^[1],也是系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病患者的一线治疗药物^[2]。环磷酰胺是一种烷基化剂,在抗肿瘤治疗同时也会引起一系列的脱靶效应,包括膀胱损害、免疫抑制和与卵巢卵泡衰竭相关的闭经^[3],它的活性代谢产物具有强烈的促性毒性作用^[4],对卵巢具有不可逆的细胞毒性^[5]。在现代生活中,肿瘤的发病率在年轻人群中逐渐升高,这使得使用化疗药物的育龄女性其卵巢受损的发生率也越来越高。研究发现,35岁以下接受化疗的女性中约有30%出现早发性卵巢功能不全,而35岁至40岁女性,这一比例升至50%^[6]。先前研究表明,化疗药物,特别是烷基化药物如环磷酰胺的使用,会导致原始和窦前卵泡的消耗^[7],引起卵巢早衰^[8]。尽管有相应的临床措施,比如生育力保存技术可以使接受化疗药物治疗的患者有几率保存一定的生育能力,但其冻卵复苏后的功能恢复效果尚不能完全确定^[9],因此探索4-羟基过氧环磷酰胺(4-Hydroperoxy cyclophosphamide, 4-HC)诱导细胞损伤的机制,特别是在卵巢颗粒细胞中的作用机制,对于探索减少临床治疗策略的不良反应以及研制新的防治方法至关重要。

卵巢颗粒细胞对外界损伤(如化疗药物)高度敏感,是环磷酰胺诱导卵巢毒性的主要靶点^[10]。研究表明,环磷酰胺化疗显著诱导颗粒细胞凋亡^[11],并通过减少非静息颗粒细胞产生的性激素含量导致卵巢卵泡闭锁^[12],最终损伤卵巢功能。虽然环磷酰胺本身在体外无法发挥相应作用,但其活性代谢产物4-HC能够通过增加氧化应激和细胞凋亡,损伤颗粒细胞功能,进而引发卵巢功能不全^[13]。环磷酰胺还通过激活BAX和线粒体凋亡通路,诱导生长卵泡中颗粒细胞的凋亡^[12]。一项体外研究表明,将小鼠卵巢组织与4-HC共培养96 h后,次级卵泡的颗粒细胞出现显著凋亡^[14]。因此,环磷酰胺及其代谢产物4-HC严重损害卵巢细胞的正常功能。线粒体是提供能量和维持稳态的重要细胞器,广泛存在于卵母细胞以及颗粒细胞中。近期研究发现,腹腔注射环磷酰胺的小鼠,其卵巢中线粒体自噬相关Pink1和Parkin的表达水平增加,导致线粒体功能受损,并使得卵巢中活性氧水平升高^[15]。然而,4-HC损伤卵巢颗粒细胞的具体机制依然不明确,关于其在卵巢颗粒细胞中对线粒体的影响及相关机制仍需要进一步探索。

此外,肿瘤抑制因子P53是一种多功能蛋白,参与细胞凋亡和自噬,在调节颗粒细胞的凋亡中起重要作用。P53介导的细胞凋亡主要通过调控促凋亡和抗凋亡因子(如BAX, BCL2通路)实现^[16]。P53基因在大多数人类肿瘤中丢失、突变或失活。因此,在不影响药物的抗癌能力的情况下,P53已成为治疗化疗药物不良反应的理想靶点^[17]。在环磷酰胺诱导的早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)模型的小鼠中,颗粒细胞中P53的表达水平显著增加^[18]。然而,4-HC对颗粒细胞的损伤机制是否与体内实验中观察到的P53表达水平变化相关仍不清楚。因此,本研究通过使用不同浓度和不同暴露时间的4-HC处理SVOG细胞,建立一个卵巢颗粒细胞体外损伤模型,并初步探索4-HC在人卵巢颗粒细胞线粒体中的作用以及其潜在机制。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢颗粒细胞SVOG细胞系由江苏省人民医院生殖中心实验室赠予。4-HC(MCE公司,美国);双抗胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Cell science公司,美国);1640细胞培养基(Gibco公司,美国);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma公司,美国);CCK-8、FastPure 细胞/组织总RNA提取试剂盒(南京诺维赞公司);JC-1试剂盒、4%多聚甲醛固定液、封闭液(上海碧云天公司);戊二醛固定液(北京百瑞极公司);Anti-Parkin抗体、Anti-Pink1抗体、Anti-P62抗体、Anti-Vinculin抗体、Anti-MDM2抗体、Anti-TOMM20抗体、Anti- β -actin抗体(Proteintech公司,美国);Anti-P53抗体(Abcam公司,美国);Triton X-100(BioFroxx公司,德国);Dapi-Fluoromount-G抗荧光淬灭封片剂(SouthernBiotech公司,美国);山羊抗兔IgG(H+L)二抗Alexa Fluor™ 594标记;山羊抗鼠IgG(H+L)二抗Alexa Fluor™ 488标记(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和4-HC处理

将SVOG细胞接种于含有1%双抗和10% FBS的1640培养基中,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养,每3 d更换1次培养基。以DMSO为溶剂,配制4-HC溶液储存浓度为100 mmol/L并以氮气封闭,置于-80℃储存。将4-HC添加到传代后且细胞贴壁的目标培养液中,使得4-HC最终浓度分别为:0.2、2.0、10.0 μ mol/L,混匀培养24、48、72 h。以

DMSO为溶剂对照组,DMSO最终浓度小于0.1%。

1.2.2 CCK-8法检测SVOG细胞活力

接种细胞至96孔板,终体积为100 μL。12 h后显微镜下观察细胞贴壁情况,并加入相应浓度的4-HC到孔板中,设置空白对照组(仅有培养基)、对照组、溶剂对照组(DMSO)、实验组(4-HC浓度为:0.2、2.0、10.0 μmol/L),每组3个复孔。放回培养箱培养24、48、72 h。96孔板中避光加入10 μL CCK-8工作液,在培养箱中避光孵育3 h,酶标仪检测450 nm处的吸光值。各组吸光度按照下列公式计算:(A-C)/(B-C)×100%(A:实验组或溶剂对照组吸光度值,B:对照组吸光度值,C:空白对照组吸光度值),换算为细胞活力百分比。

1.2.3 JC-1检测线粒体膜电位

细胞在6孔板中贴壁培养24 h后,弃去原始培养基,加入配制好的1 mL JC-1工作溶液,在37 ℃下孵育20 min。移除上清液,缓冲液洗涤两次,加入2 mL培养基,最后在共聚焦显微镜下观察细胞线粒体膜电位。

1.2.4 透射电镜观察线粒体超微结构

收集SVOG细胞并以2.5%戊二醛为固定液室温固定1 h,使用伊红染色,将细胞包裹于琼脂糖中并离心,使SVOG细胞聚集于EP管底。待琼脂糖凝固后再加入戊二醛固定,冰上送至南京医科大学分析测试中心进行后续工作。制样后使用JEM-1400Flash透射电子显微镜观察结构。

1.2.5 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测相关mRNA的表达

采集样品后,加入5 μL RNA保护剂和340 μL RLT缓冲液(包含1%β-巯基乙醇)及5 μL载体RNA,以防总RNA降解。将样品转移到装有gDNA吸附柱的2 mL收集管中,在4 ℃下以12 000 g离心30 s,弃掉滤柱,保留收集管里的液体。向收集管中加入等体积的350 μL 70%乙醇,并充分混合。将样品和沉淀物一起转移到RNeasy离心柱,密封后在4 ℃、12 000 g离心15 s,移除液体。加入700 μL RW1到柱中,再次密封和离心,弃掉液体。加入500 μL RPE液,重复密封和离心步骤并弃液。随后用800 μL 80%乙醇清洗离心柱,离心2 min后弃掉流出液和收集管。将离心柱放在新的2 mL收集管上,开盖全速离心以干燥,换上1.5 mL无RNA酶管,加入14 μL超纯水,离心1 min收集RNA,立即冷冻或逆转录。冰上解冻cDNA逆转录试剂盒并进行涡旋和离心,将样本逆转录为cDNA。以GAPDH为内参基因,RT-qPCR反应体系(20 μL):2×TB Green Master,Mix 10 μL,cDNA 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,无菌蒸馏水7.2 μL。上机,按照程序流程设置温度和时间进行反应。引物序列见表1。

1.2.6 蛋白质印迹实验

SVOG细胞在加入蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液中裂解,并在冰上放置30 min。随后离心并收集上清液测定蛋白浓度,将样品在95 ℃下变性5~10 min。

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

Gene name	Forward primers	Reverse primers
P53	5'-ACTAAGCGAGCACTGCCCAAC-3'	5'-CCTCATTCAGCTCTCGGAACATC-3'
Parkin	5'-CGTGTGATTTTTCGCCGGAAG-3'	5'-CCACTCGTGTCAAGCTC-3'
Pink1	5'-GGCTTCCGTCTGGAGGATTAT-3'	5'-CCTGCCGAGATATTCACA-3'
GAPDH	5'-GACGCTGGTGTGCTATTGCT-3'	5'-CTACTCCTTGGACGGCCATGTGT-3'

之后,将20 μg蛋白加到10%或12%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,并以120 V进行电泳1.5 h。分离后的蛋白质随后被转移到硝酸纤维素膜上,之后将膜置于封闭缓冲液(5%脱脂奶粉、0.05% Tween-20,20 mmol/L Tris缓冲盐溶液,pH 8.0)中,在室温下孵育至少1 h,并在4 ℃下与一抗过夜孵育。随后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗鼠二抗孵育1 h,化学发光法检测信号。

1.2.7 免疫荧光法

细胞在4%多聚甲醛中固定15 min,通透细胞膜

后并封闭,加入配制好的抗体,在4 ℃下孵育过夜。次日,细胞爬片与CoraLite488标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)和山羊抗兔IgG抗体(H+L)在室温下孵育1 h。细胞核使用DAPI进行染色。通过共聚焦显微镜采集信号。

1.3 统计学方法

所有统计学结果均采用GraphPad Prism 8进行分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料间比较采用独立样本t检验,多组资料间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

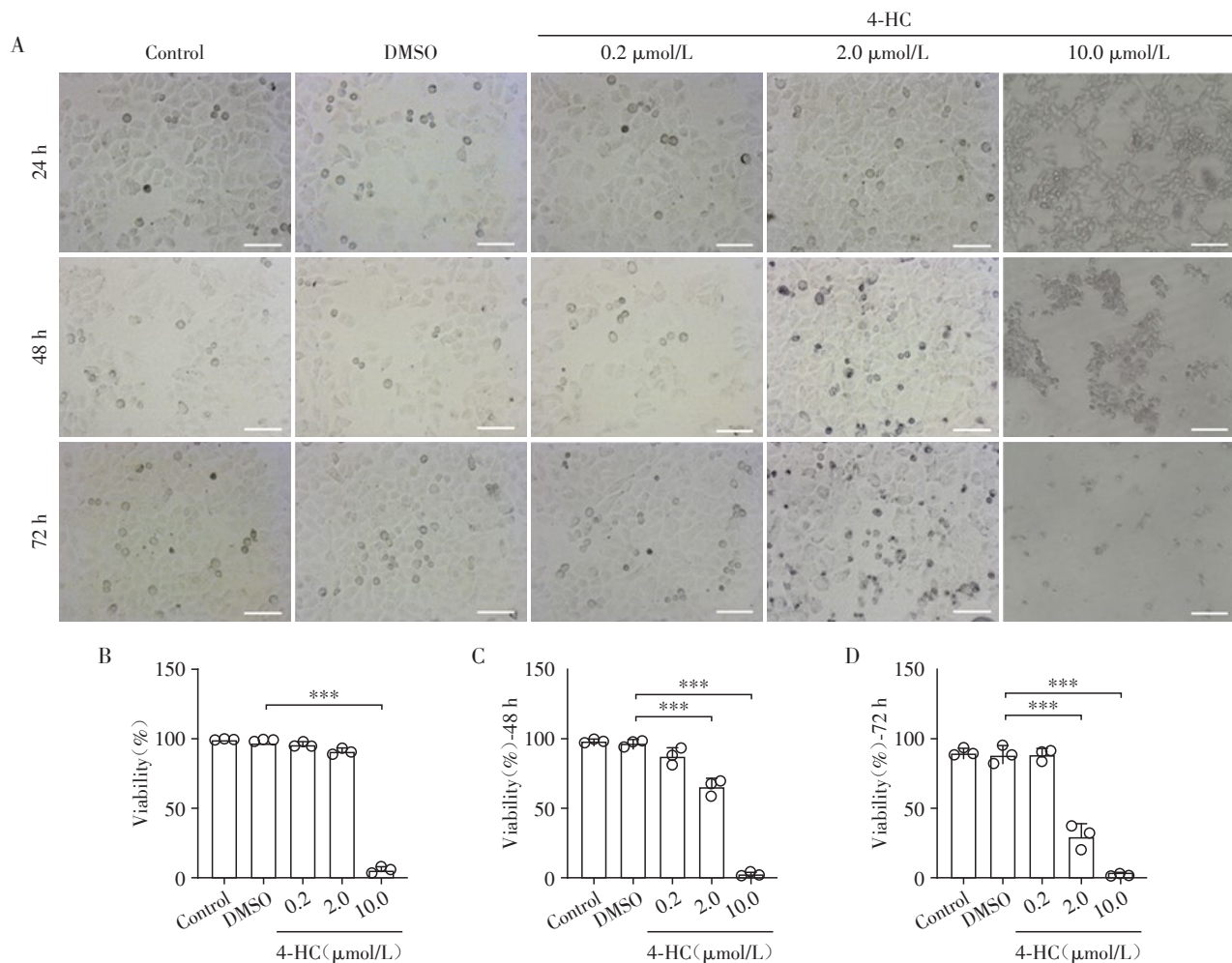
2.1 建立体外卵巢颗粒细胞4-HC损伤模型

为确定4-HC对卵巢颗粒细胞损伤作用的浓度和暴露时间,本研究检测了不同4-HC添加浓度(0.2、2.0、10.0 μmol/L)在不同暴露时间(24、48、72 h)下的细胞形态,分为对照组、溶剂对照(DMSO)组、0.2 μmol/L 4-HC组、2.0 μmol/L 4-HC组、10.0 μmol/L 4-HC组,并采用CCK-8法检测细胞活力。显微镜下观察细胞形态,结果显示,对照组、DMSO组和0.2 μmol/L组在24 h、48 h以及72 h的卵巢颗粒细胞贴壁生长,表面平滑,边界清晰,并无损伤表型;10.0 μmol/L组细胞24 h后死亡;2.0 μmol/L组作用24 h的卵巢颗粒细胞无损伤表型,但是48 h后存在

细胞皱缩,结构松散,细胞核变大,部分细胞不贴壁的损伤表型,而72 h后细胞老化严重,出现更严重的皱缩和死亡,只有少量细胞存活(图1A)。CCK-8法观察各组细胞活力结果显示,培养24 h后,0.2 μmol/L组和2.0 μmol/L组与对照组差异无统计学意义,而10.0 μmol/L组细胞无法存活;培养48 h后,0.2 μmol/L组与对照组无明显差异,而2.0 μmol/L组与对照组有显著差异;培养72 h后0.2 μmol/L组与对照组无明显差异,2.0 μmol/L组与对照组有显著差异,且存活率下降至20%(图1B~D),因此选择2.0 μmol/L的4-HC体外作用卵巢颗粒细胞48 h诱导损伤模型。

2.2 在4-HC损伤的卵巢颗粒细胞中线粒体自噬受到抑制

探索4-HC损伤卵巢颗粒细胞的机制对于研究



A: Cell morphology at different 4-HC concentrations(0.2, 2.0, 10.0 μmol/L)and various exposure times(24, 48, 72 h)(scale bars=200 μm). B-D: CCK8 assay was used to detect the cell viability of SVOG cells exposed to different concentrations of 4-HC(0.2, 2.0, 10.0 μmol/L) and at various time points(24, 48, 72 h). ****P* < 0.001(*n*=3).

图1 建立体外SVOG 4-HC损伤模型

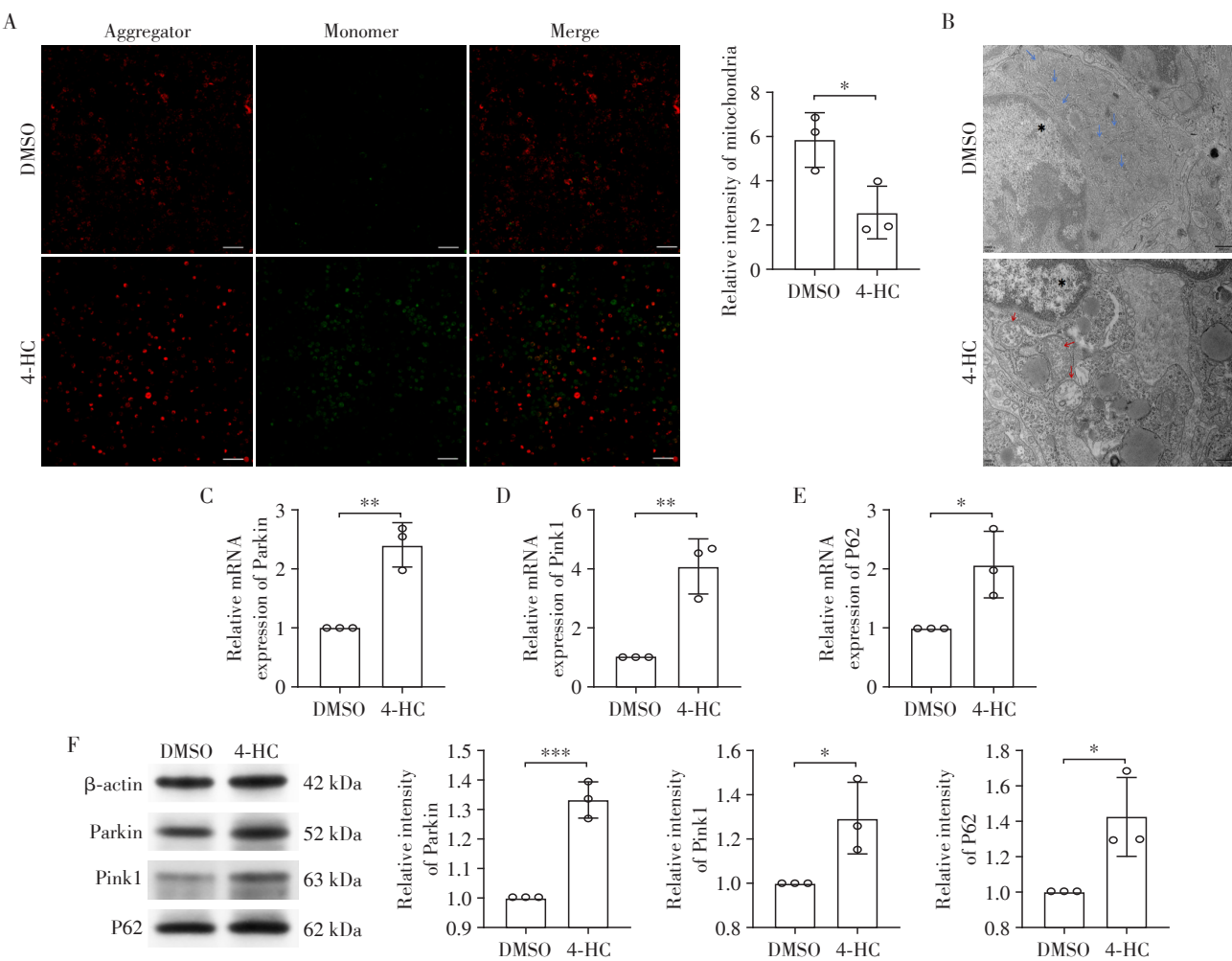
Figure 1 Establishment of an *in vitro* model of 4-HC-induced damage in SVOG cells

减少环磷酰胺临床治疗不良反应并开发新的防治手段具有重要意义。线粒体是卵巢中最重要的细胞器。为研究4-HC损伤与线粒体是否相关,使用JC-1检测线粒体膜电位,分为DMSO组和4-HC组,结果显示,与DMSO组相比,4-HC组的线粒体膜电位显著下降(图2A, $P < 0.05$),表明4-HC可能损伤了SVOG的线粒体功能。利用透射电镜对各组的线粒体超微结构进行观察,结果显示,与DMSO组相比,4-HC组的线粒体异常肿胀,线粒体嵴变形且空泡化严重,细胞内受损线粒体明显增多(图2B),表明线粒体受到损伤并提示线粒体自噬可能受到阻碍。进一步对各组的线粒体自噬通量进行检测,RT-qPCR和WB结果显示,与DMSO相比,4-HC组的Parkin、Pink1以及P62的mRNA和蛋白表达均显

著性升高(图2C~F, P 均 < 0.001)。因此,4-HC可能抑制了卵巢颗粒细胞中的线粒体自噬,使得受损线粒体增加,阻碍了线粒体的正常功能。

2.3 P53蛋白在4-HC损伤的卵巢颗粒细胞胞质中累积

P53作为调控颗粒细胞凋亡的重要因子,在线粒体自噬中也发挥着不可或缺的作用。为研究4-HC抑制线粒体自噬的机制,检测了各组P53的表达水平。免疫荧光结果显示,4-HC组中P53的荧光强度明显增加,且胞质中更为显著($P < 0.05$),DMSO组中P53低表达,且细胞核中表达较多(图3A)。WB结果显示,4-HC组中P53的表达水平较DMSO组显著增加;MDM2是一种通过结合P53并促进其降解的蛋白质,4-HC组中MDM2的表达水平显著降低



A: JC-1 fluorescence signal in SVOG cells (scale bars=100 μ m). B: Characteristic TEM images of mitochondria in SVOG cells. The blue arrows represent normal mitochondria, the red arrows represent damaged mitochondria, and the asterisks represent the cell nucleus (scale bars=200 nm). C-E: The relative mRNA expression levels of Parkin (C), Pink1 (D) and P62 (E) in SVOG cells were measured by RT-qPCR. F: Western blot detection of autophagy-related proteins. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图2 在4-HC损伤的SVOG细胞中线粒体自噬受到抑制

Figure 2 The mitophagy was inhibited in SVOG cells damaged by 4-HC

(图3B、C, $P < 0.01$)。因此,4-HC使P53在卵巢颗粒细胞中累积,而这一现象与4-HC抑制线粒体自噬的关系仍需要进一步探索。

2.4 4-HC可能通过P53-Parkin通路抑制线粒体自噬

4-HC体外损伤卵巢颗粒细胞会使细胞中Parkin蛋白增加,提示Parkin依赖的线粒体自噬通路可能出现异常。免疫荧光检测TOMM20与Parkin的表达,与DMSO组相比,4-HC组中Parkin蛋白与

TOMM20蛋白的共定位明显降低(图4A、B)。而Parkin蛋白含量增加,提示Parkin依赖的线粒体自噬通路受到了阻塞,将P53蛋白与Parkin蛋白免疫荧光共染色,与DMSO相比,4-HC组中P53蛋白明显增加且在胞质中与Parkin蛋白共定位明显,而DMSO组中几乎没有共定位(图4C、D)。因此,在4-HC体外损伤卵巢颗粒细胞中,P53在胞质中累积,可能竞争性结合胞质Parkin蛋白,阻止Parkin蛋白向受损的线粒体移位,从而抑制了线粒体自噬。

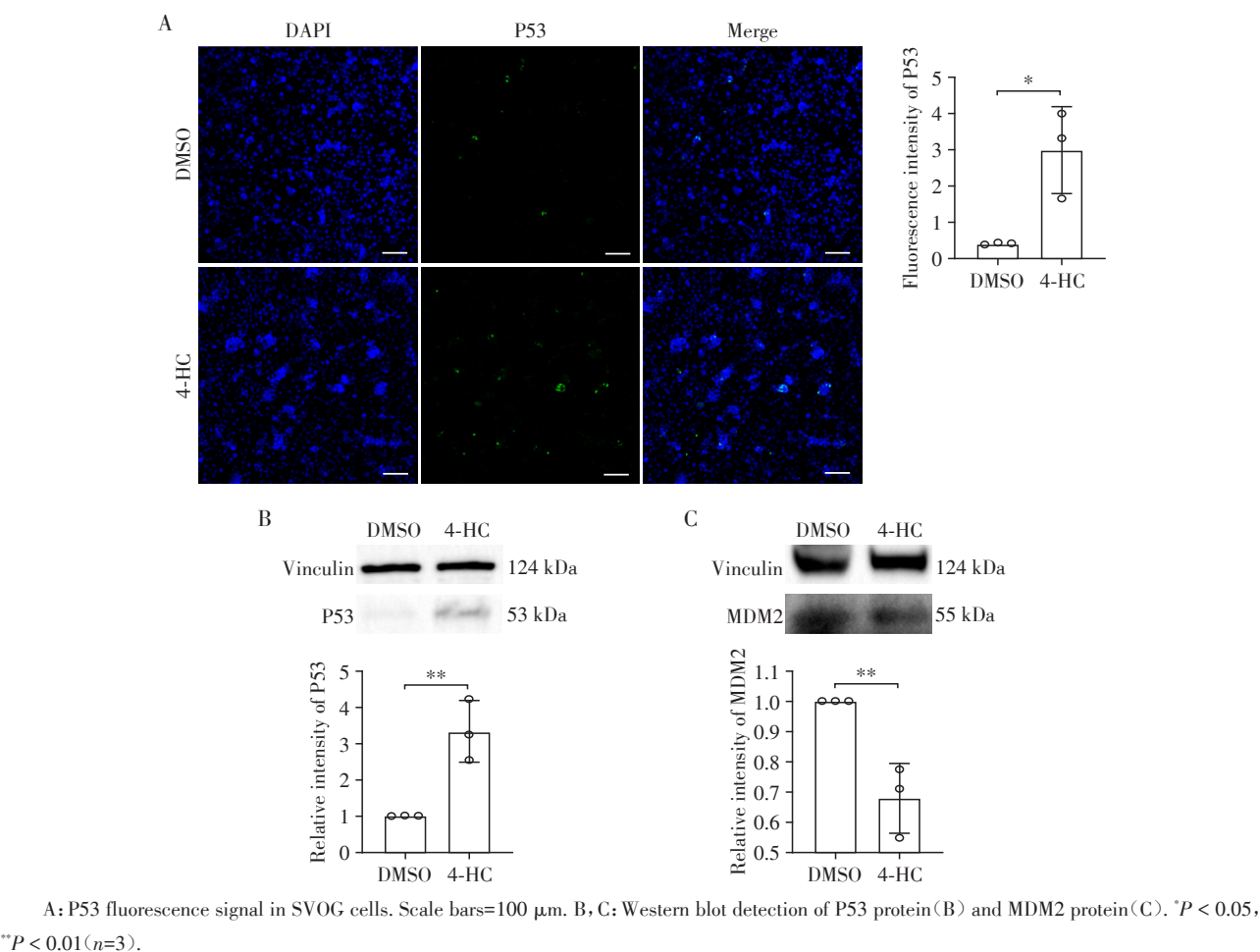


图3 P53蛋白在4-HC损伤的SVOG细胞胞质中累积

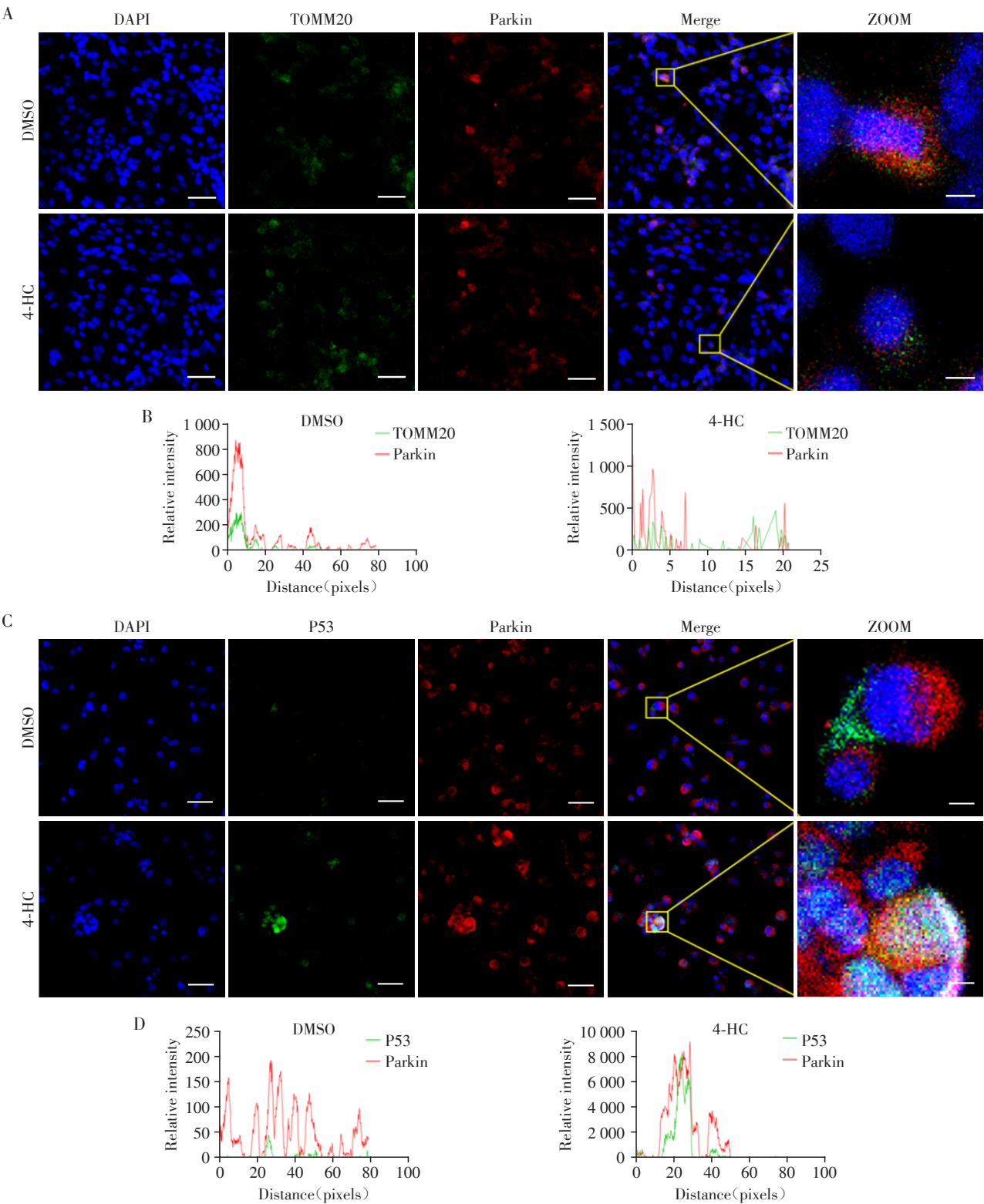
Figure 3 The P53 protein accumulated in SVOG cells damaged by 4-HC

3 讨论

在现代社会,年轻人肿瘤的发病率逐渐上升,这导致育龄女性在接受化疗时卵巢功能受到不同程度的损害。环磷酰胺作为临床常用的化疗药物,是损伤女性癌症治疗患者卵巢功能的主要原因之一。目前,在临床中,缺乏减轻环磷酰胺导致女性生育能力受损的有效治疗方法^[19]。因此研究环磷

酰胺损伤卵巢的潜在作用机制对于研制出有效的临床治疗应对策略或者预防方法至关重要。本研究探讨了环磷酰胺的体外活化物4-HC对人卵巢颗粒细胞系SVOG的功能损伤及其可能机制,发现4-HC对SVOG细胞产生显著的损伤作用,并伴随线粒体自噬通量的抑制,这一结果提示4-HC可能通过影响细胞内的自噬途径导致线粒体功能障碍。

本研究发现,4-HC在一定浓度范围内对细胞具



A: Immunofluorescence images of TOMM20 (green) and Parkin (red) in each group of cells. Scale bars=100 μm , scale bars (ZOOM)=10 μm . B: Colocalization analysis of TOMM20 and Parkin protein in each group of cells. C: Immunofluorescence images of P53 (green) and Parkin (red) protein in each group of cells. Scale bars=100 μm , scale bars (ZOOM)=10 μm . D: Colocalization analysis of P53 and Parkin protein in each group of cells ($n=3$).

图4 4-HC通过P53-Parkin通路抑制线粒体自噬

Figure 4 4-HC inhibited mitophagy through the p53-Parkin pathway

有显著的毒性作用,且2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的4-HC处理SVOG颗粒细胞的损伤状态。先前研究显示^[20],当分离的卵巢暴露于4-HC(20 $\mu\text{mol/L}$)时,卵泡存活率和

卵母细胞成熟率均显著降低,这可能由于卵巢中微环境的存在,减轻了4-HC的毒性作用,使得4-HC的损伤浓度阈值增加。

卵巢颗粒细胞是包裹在卵母细胞表面的细胞,在卵泡发育和卵母细胞成熟中起着重要作用^[21]。先前的一项研究表明,当雌性动物接受化疗时,卵巢颗粒细胞会通过细胞凋亡相关信号通路丢失损伤,在体内外添加环磷酰胺以及其活化物4-HC都会损害腔前卵泡^[22]。从小鼠中分离卵巢组织,在体外用4-HC培养96 h后发现4-HC损伤了次级卵泡的颗粒细胞的凋亡^[14]。过去研究多集中于利用干细胞治疗化疗损伤的卵巢颗粒细胞凋亡,来自人多能干细胞-间充质干细胞的外泌体能够抑制环磷酰胺诱导的细胞凋亡^[23]。然而,干细胞在临床应用中存在诸多限制,难以广泛使用。不可避免的挑战包括自体组织来源不足、细胞移植成功率低、潜在的致癌风险以及免疫排斥以及高昂的费用等问题,导致其可行性仍然受到限制^[24]。

透射电子显微镜的结果显示4-HC损伤的颗粒细胞线粒体形态严重受损并出现空泡化,受损线粒体数量明显增加且膜电位紊乱。4-HC诱导的颗粒细胞线粒体功能异常伴随着线粒体自噬通路的阻塞。通过免疫荧光和WB分析结果显示P53在胞质中累积,并阻碍依赖Parkin的线粒体自噬通路。P53作为一种关键的细胞周期调控蛋白,广泛参与细胞的应激反应、DNA损伤修复和细胞凋亡。已有研究表明,P53不仅调控细胞凋亡,还参与自噬的调控。本研究中P53表达的增加可能通过与Parkin的相互作用,抑制了受损线粒体的自噬,进而导致线粒体的积累和功能异常。表明4-HC可能是通过调控P53-Parkin通路影响线粒体自噬,进而对卵巢颗粒细胞产生毒性作用。研究显示,Parkin介导的线粒体自噬抑制是阿霉素引起的心脏毒性致病性改变的主要原因之一^[25],阿霉素作为一种抗肿瘤药物,会导致心肌细胞损伤,包括线粒体障碍并引起氧化应激。

本研究揭示了4-HC通过P53-Parkin通路抑制线粒体自噬的潜在机制,为理解卵巢颗粒细胞的损伤机制提供了重要的理论依据。线粒体自噬在维持细胞稳态和功能中起着至关重要的作用,4-HC引发的线粒体自噬抑制可能是SVOG细胞功能障碍的关键原因之一。因此,靶向调控P53-Parkin通路可能成为预防或缓解4-HC引发的卵巢颗粒细胞损伤的潜在策略。然而,本研究存在一些局限性。首先,实验主要基于体外模型,未来需要通过体内实

验进一步验证在实际生理病理环境中的适用性。体内药物的代谢动力学与分布受诸多因素影响,如肝肾功能、酶活性、药物相互作用等,这可能导致血液或组织中的药物浓度与实验设定的浓度存在差异。因此,实验结果的临床应用仍有待验证。其次,P53和Parkin之间的相互作用机制仍需进一步研究,以明确其具体的调控网络和信号通路。

综上所述,本研究表明4-HC可能通过P53-Parkin通路抑制线粒体自噬,进而导致SVOG细胞的功能损伤。这一发现为深入理解环磷酰胺诱导卵巢颗粒细胞损伤的机制提供了新见解,也为预防化疗导致的卵巢损伤的提供了潜在靶点。

[参考文献]

- [1] PETRILLO S K, DESMEULES P, TRUONG T Q, et al. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 253(2): 94-102
- [2] THORBINSON C, ONI L, SMITH E, et al. Pharmacological management of childhood-onset systemic lupus erythematosus [J]. *Paediatr Drugs*, 2016, 18(3): 181-195
- [3] HUDSON M M. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2010, 116(5): 1171-1183
- [4] EMADI A, JONES R J, BRODSKY R A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009, 6(11): 638-647
- [5] LOPEZ S G, LUDERER U. Effects of cyclophosphamide and l-buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(11): 1366-1377
- [6] MEIROW D, NUGENT D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(6): 535-543
- [7] TRUDGEN K, AYENSU-COKER L. Fertility preservation and reproductive health in the pediatric, adolescent, and young adult female cancer patient [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2014, 26(5): 372-380
- [8] CHO H W, LEE S, MIN K J, et al. Advances in the treatment and prevention of chemotherapy-induced ovarian toxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7792
- [9] CASCANTE S D, BERKELEY A S, LICCIARDI F, et al. Planned oocyte cryopreservation: the state of the ART [J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 47(6): 103367
- [10] ATAYA K M, VALERIOTE F A, RAMAHI-ATAYA A J. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary [J]. *Cancer Res*, 1989, 49(7): 1660-1664

[11] AMSTERDAM A, KEREN-TAL I, AHARONI D, et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary[J]. Steroids, 2003, 68(10-13): 861-867

[12] ZHAO X J, HUANG Y H, YU Y C, et al. GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats[J]. Gynecol Oncol, 2010, 118(1): 69-75

[13] NIE Z Y, ZHANG L, CHEN W, et al. The protective effects of pretreatment with resveratrol in cyclophosphamide-induced rat ovarian granulosa cell injury: *in vitro* study[J]. Reprod Toxicol, 2020, 95: 66-74

[14] LUAN Y, EDMONDS M E, WOODRUFF T K, et al. Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide[J]. J Endocrinol, 2019, 240(2): 243-256

[15] LU G, LI H X, SONG Z W, et al. Combination of bone marrow mesenchymal stem cells and moxibustion restores cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency by improving mitochondrial function and regulating mitophagy[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 102

[16] WANG X Y, SIMPSON E R, BROWN K A. p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis[J]. Cancer Res, 2015, 75(23): 5001-5007

[17] FERBER D. Cancer research. A new way to combat therapy side effects[J]. Science, 1999, 285(5434): 1651, 1653

[18] XIONG Y, LIU T, WANG S W, et al. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway[J]. Gene, 2017, 596: 1-8

[19] DOLMANS M M, DONNEZ J, CACCIOTTOLA L. Fertility preservation: the challenge of freezing and transplanting ovarian tissue[J]. Trends Mol Med, 2021, 27(8): 777-791

[20] ALEXANDRI C, VAN DEN STEEN G, DEMEESTERE I. Let-7a mimic transfection reduces chemotherapy-induced damage in a mouse ovarian transplantation model[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 10863

[21] HERNÁNDEZ-ANGELES C, CASTELO-BRANCO C. Early menopause: a hazard to a woman's health[J]. Indian J Med Res, 2016, 143(4): 420-427

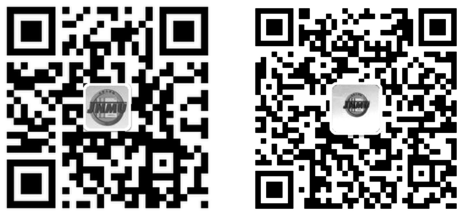
[22] PEREZ G I, KNUDSON C M, LEYKIN L, et al. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction[J]. Nat Med, 1997, 3(11): 1228-1232

[23] ZHANG L F, MA Y B, XIE X G, et al. Human pluripotent stem cell-mesenchymal stem cell-derived exosomes promote ovarian granulosa cell proliferation and attenuate cell apoptosis induced by cyclophosphamide in a POI-like mouse model[J]. Molecules, 2023, 28(5): 2112

[24] LEVY O, KUAI R, SIREN E M J, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies[J]. Sci Adv, 2020, 6(30): eaba6884

[25] LI W L, WANG X P, LIU T H, et al. Harpagoside protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity via P53-parkin-mediated mitophagy[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 813370

[收稿日期] 2024-09-20
(本文编辑:戴王娟)



欢迎关注本刊微博、微信公众号!