

• 最新基础研究 •

京尼平对 KGN 细胞株分泌功能影响的研究

王雪娇^{1,2}, 田东梅^{1(通信作者*)}, 廖海霞¹, 李亨利¹, 尹欣¹, 朱明辉¹

(1. 成都中医药大学医学与生命科学学院 / 附属生殖妇幼医院, 四川 成都 611137; 2. 成都西囡妇科医院, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 探讨京尼平 (genipin, GEN) 对 KGN 细胞株培养过程中分泌炎症因子及雌、孕激素功能的影响。方法 培养 KGN 细胞株, 分为实验组和空白对照组。实验组用不同浓度京尼平 (0.05 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$) 干预 KGN 细胞株。ELISA 法检测培养细胞上清液中的白介素 6(IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 4(IL-4)、白介素 5(IL-5)、雌激素 (estrogen, E2)、孕激素 (progesterin, P); 利用 Western blot 法检测羟基类固醇 (17 β) 脱氢酶 2(hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2, HSD17B2)、细胞色素 P45019A1(cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, CYP19A1)、细胞色素 P450c17 α (cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1, CYP17A1)、线粒体解偶联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2) 的蛋白表达水平。结果 不同浓度的京尼平干预 KGN 细胞株后 IL-6 及 IL-1 β 的分泌量与对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$); IL-4、IL-5、E2、P 的分泌量较对照组明显降低 ($P<0.05$), HSD17B2、CYP19A1、CYP17A1、UCP2 的蛋白表达水平与对照组相比均差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 京尼平干预 KGN 细胞株后可显著减少 IL-4、IL-5 此类炎症因子的分泌, 对细胞生长有一定的保护作用, 进一步验证了京尼平的抗炎作用, 但雌孕激素的分泌减少, 对其内分泌功能有一定的影响。

关键词: 京尼平; KGN 细胞株; 炎症因子; 分泌功能

中图分类号: R364.5

文献标识码: B

DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2022.009.018

本文引用格式: 王雪娇, 田东梅, 廖海霞, 等. 京尼平对 KGN 细胞株分泌功能影响的研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2022, 22(009): 74-78.

Study on the Effect of Ginipin on the Secretion Function of KGN Cell Lines

WANG Xue-jiao^{1,2}, TIAN Dong-mei^{1*}, LIAO Hai-xia¹, LI Heng-li¹, YIN Xin¹, ZHU Ming-hui¹

(1. School of medicine and Life Sciences, Chengdu University of traditional Chinese medicine / affiliated reproductive maternal and child hospital, Chengdu Sichuan 611137; 2. Chengdu Xinan gynecological hospital, Chengdu Sichuan 611137)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of genipin (GEN) on the secretion of inflammatory factors and female and progesterone functions in the culture of KGN cell lines. **Methods** Culture KGN cell strains, divided into experimental group and blank control group. The experimental group intervened with KGN cell lines with different concentrations of Ginipin (0.05 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$). ELISA tests for leukoelectride 6 (IL-6), leukocyte 1 beta (IL-1 beta), elethinoline 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), estrogen (estrogen, E2), progesterone (progesterin, P); Testing Protein expression levels of hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2, cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 and uncoupling protein 2 by western blot. **Results** There was no statistical difference between the secretion of IL-6 and IL-1 beta after different concentrations of Ginipin intervention on KGN cell lines ($P>0.05$); The secretion of IL-4, IL-5, E2 and P decreased significantly compared to the control group ($P<0.05$), and the protein expression levels of HSD17B2, CYP19A1, CYP17A1, UCP2 were statistically different from those of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The intervention of Ginipin with KGN cell strain can significantly reduce the secretion of such inflammatory factors as IL-4 and IL-5, which has a certain protective effect on cell growth, and further verifies the anti-inflammatory effect of Ginipin, but the secretion of estrogen decreases, which has a certain effect on its endocrine function.

KEY WORDS: ginipin; KGN cell strain; inflammatory factor; secretion function

0 引言

京尼平是中药杜仲分离出的一种重要成分,既往研究表明,其作用有:保肝利胆、抗炎、抗氧化,抗血栓、抗肿瘤以及抗抑郁等作用,同时也可以用于治疗糖尿病、癌症以及中枢神经系统疾病等作用^[1-3]。Tao Zuo^[4]等研究表明京尼平可以通过有效的抑制大部分白细胞介素(IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β)的产生,从而达到减少 KGN 细胞株凋亡以及减轻氧化应激造成的损伤的作用,同时也可减少多囊卵巢综合征患者的炎症损伤。

在妇产科领域,氧化应激对人类的生殖过程有负面影响,随着女性年龄的增加,卵母细胞逐渐衰老加快,其抗氧化的能力也随之下降,易导致卵母细胞减数分裂过程发生异常,如染色体分离障碍,这导致形成非整倍体胚胎,从儿发生反复种植失败及反复流产。目前临床上能使用的抗氧化剂较少,既往大部分研究均在模拟氧化应激状态下探讨京尼平的抗炎及抗氧化作用,在非氧化应激模型下,京尼平是否也有较好的抗炎症因子分泌功能尚不明确,故本实验讨论了在非氧化应激状态下京尼平对 KGN 细胞的分泌功能的影响及可能的调节通路,以期临床使用京尼平提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

KGN 细胞株、京尼平(Cayman)、胎牛血清(gibco)、DMEM/F12 培养基(gibco)、胰酶(gibco)、双抗(碧云天)、DMSO(Sigma)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)、HSD17B2 抗体(affinity)、CYP19A1 抗体(affinity)、CYP17A1 抗体(proteintech)、UCP2 抗体(proteintech)、生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(英国 abcam--艾博抗(上海)贸易有限公司);Human IL-1 β ELISA KIT、Human IL-6 ELISA KIT、Human E ELISA KIT、Human IL-4 ELISA KIT、Human IL-5 ELISA KIT、Human P ELISA KIT(上海茁彩生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 KGN 细胞株的培养

培养液使用 10% 胎牛血清 +1% 双抗的 DMEM/F-12,将 KGN 细胞常规培养在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱中。

1.2.2 实验分组及干预方式

分为实验组和空白对照组,实验组分别加入浓度为 0.05 μ mol/L, 0.1 μ mol/L, 0.2 μ mol/L, 0.3 μ mol/L 的京尼平干预,对照组为 5/1000DMSO。

1.2.3 ELISA 检测上清液中 IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-5、E2、P 含量

根据酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒说明书方法测定各组细胞上清液中的 IL-1 β 、IL-6 和 IL-4、IL-5、E2、P 因子含量。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

复苏后的 KGN 细胞被接种到培养皿中,常规培养 24 h 后,显微镜下观察细胞密度达到 70%~80%,进行分组实验,收集各组细胞获得总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,每孔以 40 μ g 样品上样进行 SDS-PAGE,采用湿法进行 Western blot 转膜(PVDF 膜)1 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 I 抗(HSD17B2、CYP19A1、CYP17A1、UCP2 浓度为 1 : 500~1 : 1 000, β -actin 浓度为 1 : 5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,II 抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, ECL 化学显色, image J 软件分析蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

运用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。数据采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。在方差齐性检验的基础上行方差分析,并用 SNK-q 检验行各组均数间的两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 结果

1.4.1 添加京尼平对 KGN 细胞培养上清液中 IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-5、E2、P 含量的影响

1.4.1.1 与对照组相比,添加京尼平后,随着京尼平浓度的增加,上清液中雌激素、孕激素分泌量

表 1 不同浓度京尼平干预 KGN 细胞株后 IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-5、E2、P 分泌($\bar{x} \pm s$)

分组 (mM)	IL-4(pg/mL)	IL-5(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	E2(pg/mL)	P (ng/mL)
Ctrl	2.297 \pm 0.080	3.11 \pm 0.128	9.690 \pm 1.128	2.697 \pm 0.106	11.383 \pm 0.172	1.603 \pm 0.021
0.05	2.107 \pm 0.031	2.983 \pm 0.057	9.817 \pm 0.866	2.70 \pm 0.164	10.887 \pm 0.046	1.50 \pm 0.03
0.1	2.030 \pm 0.034	2.980 \pm 0.046	9.970 \pm 1.807	2.637 \pm 0.227	10.883 \pm 0.269	1.403 \pm 0.29
0.2	1.877 \pm 0.645	2.777 \pm 0.120	9.663 \pm 0.892	2.78 \pm 0.161	10.523 \pm 0.217	1.390 \pm 0.41
0.3	1.833 \pm 0.045	2.673 \pm 0.137	10.073 \pm 1.137	2.89 \pm 0.241	10.500 \pm 0.128	1.291 \pm 0.01

注: Ctrl 组为对照组,0.05 为京尼平 0.05mmol/L,0.1 为京尼平 0.1mmol/L,0.2 为京尼平 0.2mmol/L,0.3 为京尼平 0.3mmol/L。

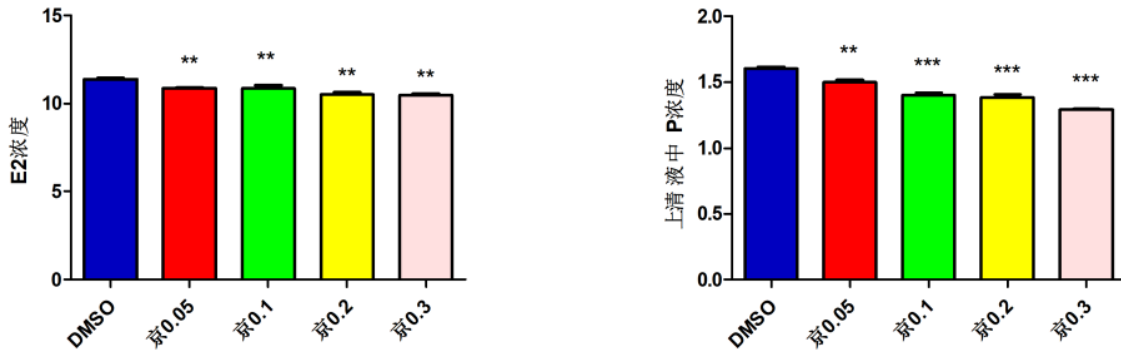


图 1

注: DMSO 组为对照组, 0.05 为京尼平 0.05mmol/L, 0.1 为京尼平 0.1mmol/L, 0.2 为京尼平 0.2mmol/L, 0.3 为京尼平 0.3mmol/L。与对照组相比, ** 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.01$ 。

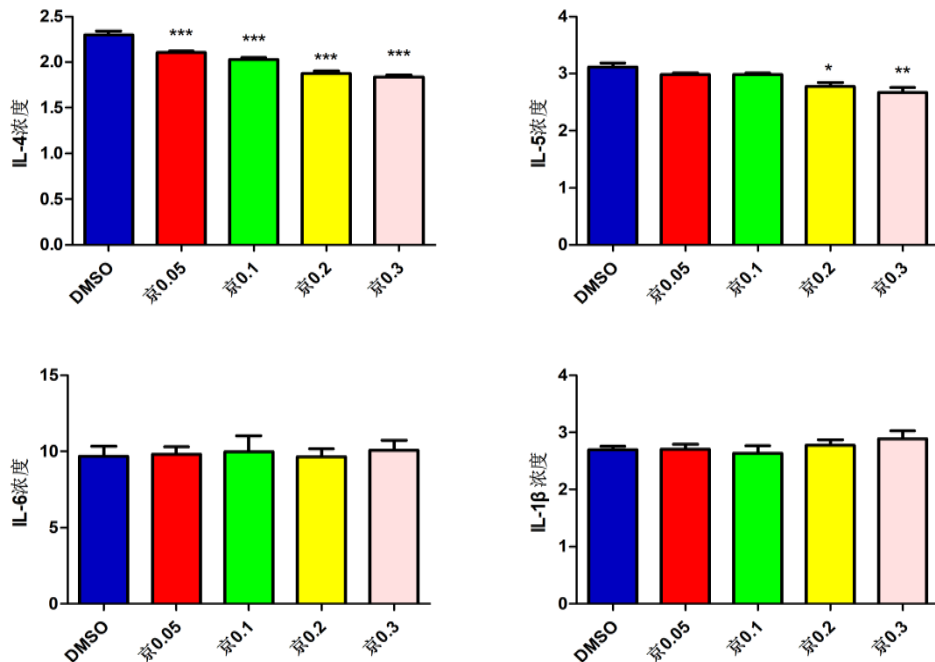


图 2

注: DMSO 组为对照组, 0.05 为京尼平 0.05mmol/L, 0.1 为京尼平 0.1mmol/L, 0.2 为京尼平 0.2mmol/L, 0.3 为京尼平 0.3mmol/L。与对照组相比, ** 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.01$ 。

逐渐减少, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体如图 1。

1.4.1.2 添加京尼平后, 培养基上清液中的 IL-6, IL-1 β 较对照组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$), IL-4、IL-5 含量随着京尼平浓度的上升, 其分泌量逐渐减少, 其中 IL-4 的分泌量每组均较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), IL-5 的分泌量仅高浓度组 (京尼平浓度 ≥ 0.2 mmol/L) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。具体如图 2 所示。

1.4.2 京尼平对 KGN 细胞 HSD17B2、CYP19A1、CYP17A1、UCP2 蛋白水平的影响

不同浓度京尼平 (0、0.05mmol/L、0.1mmol/L、0.2mmol/L、0.3mmol/L) 加入培养基中, 对 KGN 细胞株干预 24 小

时后提取细胞总蛋白, 检测 CYP17A1、CYP19A1、HSD17B2、UCP2 蛋白表达, 结果如下: 随着京尼平浓度的增加, CYP17A1 及 HSD17B2 的表达量与对照组比较呈逐步上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CYP19A1 及 UCP2 蛋白的表达实验组与对照组相比在京尼平浓度为 0.2mmol/L 时表达量最高 ($P < 0.01$)。

2 讨论

哺乳动物卵巢中最大的细胞群是颗粒细胞群, 其在卵巢激素的合成、以及卵泡液的产生、甚至是在卵母细胞间的信息交换、卵母细胞的生长发育和成熟等方面都起着极其重要的作用, 临床上取卵后收集的颗粒细胞均已黄素化, 本身培养极其困难,

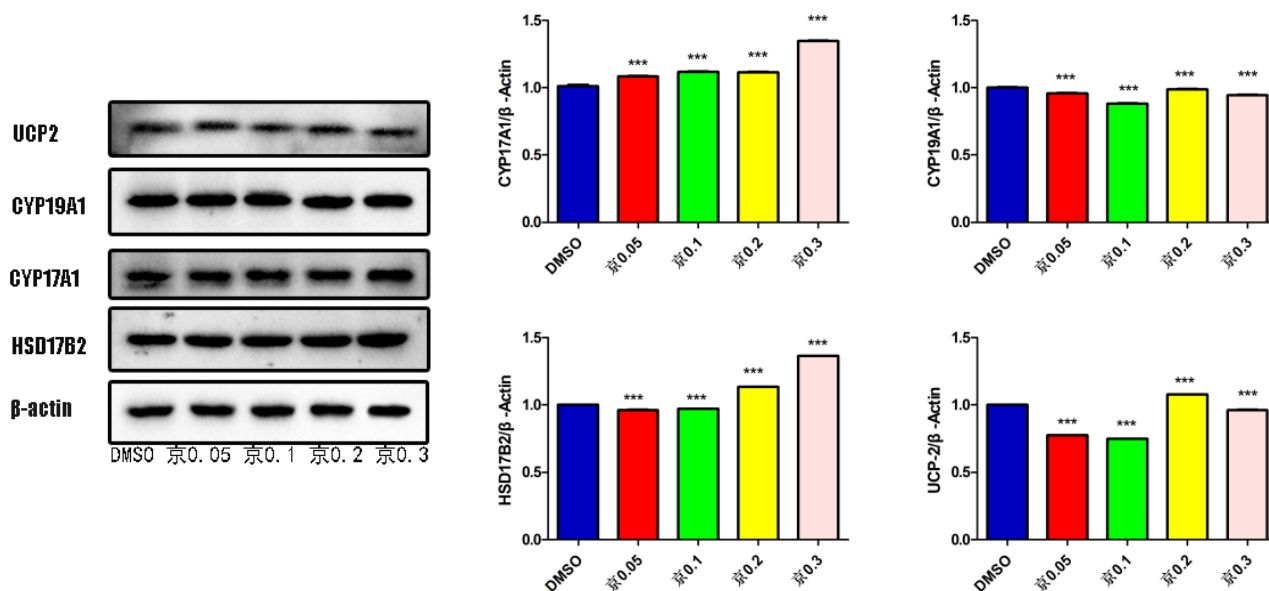


图3 不浓度京尼平干预 KGN 细胞株 24h 后 CYP17A1、CYP19A1、17β-HSD2、UCP2 蛋白表达

注: DMSO 组为对照组, 0.05 为京尼平 0.05mmol/L, 0.1 为京尼平 0.1mmol/L, 0.2 为京尼平 0.2mmol/L, 0.3 为京尼平 0.3mmol/L。与对照组相比, ** 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.01$ ($n=3$)。

且不能传代, 而 KGN 细胞株具有易培养, 易传代等好处, 且能模拟正常人颗粒细胞的大部分生理活性, 比如激素合成、凋亡调节、表达 FSHR 等, 被认为是研究人颗粒细胞最佳模型^[5], 故本实验采用 KGN 细胞株进行相关研究。

2.1 京尼平对 KGN 细胞株分泌雌孕激素功能的影响

本实验结果提示添加京尼平干预 KGN 细胞株后, 其 E2 及 P 分泌量的多少与京尼平浓度呈反比。既往较多研究均认为在辅助生殖中添加雌孕激素对患者有较大的益处, 陈某的研究显示^[6] ART 患者在接受 GnRH-ant 方案时, 补充 E2 可提高胚胎植入率, 张某等^[7] 文献总结提示经口服避孕药和 E2 预处理后可改善辅助生殖中促排卵的效果。吕某某等认为^[8] 促排卵过程中, 高水平孕激素的添加能有效抑制 LH 峰, 且卵子的成熟数量和质量并不会受高水平孕激素影响, 因此, 认为此种诱导排卵方式或许可以降低卵巢过度刺激综合征的发生率, 高孕激素状态下促排卵方案不失为一种辅助生殖的新方案和新选择, 对于需要生殖力保存患者有重要意义。笔者认为, 目前京尼平对雌孕激素分泌机制影响的研究甚少, 故在临床中针对无明显氧化应激的患者, 京尼平的疗效还有待进一步研究。

2.2 京尼平对 KGN 细胞株分泌雌孕激素相关蛋白的影响

17β-HSDs 是一种氧化还原酶, 在雌、孕激素合

成中发挥重要作用, 在生殖系统中拥有重要调节功能, 同时还具有氧化和还原活性, 对类固醇激素含量也有一定的影响^[9]。17β-HSD2 是 17β-HSDs 的一种亚型, 主要存在于人体的肝脏、乳腺、以及分泌期子宫内膜、胎盘、肾脏中^[10]; 活性的 17β-HSDs 可被其转化成低活性酮类固醇, 17β-HSD2 还可降低 E2 和雄激素活性^[11,12]。孕激素经可转化成雌激素, 而 KGN 细胞株不分泌雌激素, 本实验中雌激素水平下降后孕激素分泌也随之下降, 与 17β-HSD 逐步增加结果一致。

CYP17A1 是一种多功能酶, 具有裂解酶和羟化酶两种活性, 催化生成所有内源性雄激素。在本实验中, 随着京尼平浓度的增加, CYP17A1 的蛋白表达量也同步增加, 与左涛^[13] 等研究高浓度京尼平 (0.05mmol/L) 促进 17β-HSDs 和 CYP17A1 表达增加实验结果较一致。而本实验 CYP19A1 的表达量与京尼平浓度无明显相关性, 仅提示在较高浓度 (0.2mmol/L) 时表达量增加, CYP19A1 是激素转化和合成的关键酶之一, 睾酮和雄烯二酮转变成雌二醇, 以及排卵前卵巢合成类固醇激素的关键酶均是 CYP19A1, 因此关于雌孕激素的分泌与 CYP19A1 的关系可进行进一步探究。

UCP2 能调节线粒体膜电位和能量代谢。主要分布在肝脏、肾脏、免疫细胞、脑、中枢神经系统和脂肪细胞等组织中; 线粒体代谢在人卵巢功能中有重要意义, 研究发现人卵巢颗粒细胞有 UCP2 蛋白

的表达^[18],认为UCP2也可参与调节卵细胞生长、发育及成熟^[19]。Ge H^[20]等研究表明UCP2被抑制后卵泡细胞合成孕激素下降。本研究中UCP2的表达与京尼平的浓度改变呈抛物线型改变,在浓度为0.2mmol/L时表达量最高,与孕激素的改变无明显相关性,故笔者认为UCP2的表达是否与孕激素分泌调剂有关还存在争议,可进一步探究。

2.3 京尼平对炎症因子的影响

本实验的结果显示,IL-6、IL-1 β 较对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),但随着京尼平浓度增加,炎症因子IL-4及IL-5的浓度逐渐降低,且差异有统计学意义,进一步证明了京尼平的抗炎作用。不同的辅助性T细胞和细胞因子可以由辅助性T淋巴细胞分化而来。Th2可分泌IL-4、IL-5、IL-6等细胞因子,其中IL-4具有免疫调节多效性,IL-5具有促进炎症反应的作用^[14]。有研究表明IL-4能促进B细胞增殖,抑制Th1细胞因子的分泌,提高机体免疫耐受能力,对维持妊娠有着重要意义^[15,16]。而不良妊娠结局常常与Th1细胞因子增多(IL-2、IFN- γ)和Th2细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6)的降低有关^[17]。

3 结论

在非炎症状态下,京尼平可以明显降低炎症因子IL-4、IL-5的分泌,但对IL-6、IL-1 β 分泌无明显影响,进一步证实了其抗炎作用。但随着京尼平浓度的增加,对雌孕激素的分泌有一定的抑制作用。

参考文献

- [1] Shanmugam MK, Shen H, Tang FR, et al. Potential role of genipin in cancer therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 133: 195-200.
- [2] Guan L, Feng H, Gong D, et al. Anti-inflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 495(2-3): 201-8.
- [3] Lili Guan, Haiyan Feng, et al. Genipin ameliorates age-related insulin resistance through inhibiting hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. *Experimental Gerontology*, 2013, 48(12): 1387-1394.
- [4] Zuo T, Xu W, Li H, et al. Geniposide and geniposidic acid, modified forms of genipin, attenuate genipin-induced mitochondrial apoptosis without altering the anti-inflammatory ability in KGN cell line[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2017, 26: 499-508.
- [5] 田东梅. 脱氢表雄酮对人卵巢黄素化颗粒细胞及KGN细胞株凋亡作用的研究[D]. 成都中医药大学, 2016.
- [6] 陈峦峦, 司徒冰, 李斯晨, 等. 辅助生殖技术患者在促性腺激素释放激素拮抗剂方案补充雌二醇疗效的Meta分析[J]. *中南药学*, 2019, 17(12): 2180-2185.
- [7] 张巧利, 贾焯维, 周丽颖, 等. 口服避孕药和雌激素预处理在辅助生殖技术中的应用进展[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(10): 1037-1041.
- [8] 吕珍珍, 杨勇莉. 高孕激素状态下促排卵方案[J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2019, 6(24): 7-8.
- [9] Bedaiwy MA, Elnashar SA, Goldberg JM, et al: Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28: 51-55.
- [10] Augoulea A, Alexandrou A, Creatsa M, et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress[J]. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2012, 286(1): 99-103.
- [11] S Gupta, A Agarwal. Role of oxidative stress in endometriosis[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006, 13(1): 126-134.
- [12] Goud P T, Goud A P, Joshi N, et al. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis[J]. *Fertility and Sterility*, 2014, 102(1): 151-159.
- [13] 左涛, 宋航. 杜仲中环烯醚萜类物质对性激素转化的调控作用[J]. *化工进展*, 2016, 35(S2): 319-323.
- [14] 刘丹, 李云, 钟礼立. 白细胞介素5、嗜酸粒细胞与支气管哮喘[J]. *医学综述*, 2010, 16(12): 1783-1785.
- [15] 党慧敏, 刘艳巧, 刘润侠, 等. 补肾活血方联合地屈孕酮对复发性流产患者临床疗效及Th1/Th2型细胞因子的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(6): 832-836.
- [16] 成雁, 郭红玲, 滕银成. Treg/Th17平衡失调在复发性流产中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2016(3): 322-328.
- [17] 邱佩佩. 原因不明复发性流产患者TH1/TH2型细胞因子的表达分析[D]. 石河子大学, 2014.
- [18] Agarwal A, Makker K, Sharma R. REVIEW ARTICLE: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2008, 59(4): 2-11.
- [19] Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 1462-7.
- [20] Ge H, Zhang F, Shan D, et al. Effects of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 Inhibition by Genipin in Human Cumulus Cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015: 323246.