

# 人参皂苷 RH2 通过 BCL2L1/PI3K/AKT 信号通路逆转环磷酰胺诱导的卵巢颗粒细胞损伤

王文芳, 曲 婷\*

**[摘 要]** **目的** 探究人参皂苷 RH2 对环磷酰胺诱导的卵巢颗粒细胞(KGN)损伤的保护作用及分子机制。**方法** 选取 KGN 细胞作为研究对象,应用环磷酰胺刺激建立早发性卵巢功能不全(Premature ovarian insufficiency, POI)的体外模型。设置正常组、模型组(环磷酰胺, 8  $\mu\text{M}$ , 24 h)以及人参皂苷 RH2 组(40  $\mu\text{M}$ , 24 h)。采用 CCK8 法检测人参皂苷 RH2(40  $\mu\text{M}$ , 24 h)对环磷酰胺导致的 KGN 细胞损伤的保护作用;应用 AO/EB 染色检测细胞凋亡情况;网络药理学(Network pharmacology, NP)分析人参皂苷 RH2 在 POI 中的潜在作用靶点以及下游通路。Western blot 法检测 BCL2L1、p-PI3K、p-AKT、PI3K 以及 AKT 的蛋白表达。分子对接检测人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 的结合能力。**结果** 环磷酰胺刺激后, KGN 细胞活性率呈剂量依赖性下降, 而给予人参皂苷 RH2 能够逆转环磷酰胺导致的 KGN 细胞增殖率下降以及细胞凋亡。BCL2L1 可能是人参皂苷 RH2 保护环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的靶点。过表达 BCL2L1 能够增加 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的保护作用。低表达 BCL2L1 能够逆转 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的保护作用。同时, 人参皂苷 RH2 能够逆转由环磷酰胺导致的 KGN 细胞中 p-PI3K/PI3K 以及 p-AKT/AKT 表达升高。并且 BCL2L1 与人参皂苷 RH2 有很好的关联度(-7.28 kcal/mol), 具有很强的结合能力。**结论** 人参皂苷 RH2 对环磷酰胺损伤的卵巢颗粒细胞具有保护作用, 该保护作用可能通过激活 BCL2L1/PI3K/AKT 通路, 抑制卵巢颗粒细胞损伤。

**[关键词]** 人参皂苷 RH2; 网络药理学; 卵巢颗粒细胞; 卵巢损伤

## Ginsenoside RH2 reverses cyclophosphamide-induced ovarian granulosa cell damage through the BCL2L1/PI3K/AKT signaling pathway Wang Wenfang, Qu Ting\* (The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China) \*Corresponding author

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of ginsenoside RH2 on ovarian granulosa cell (KGN) injury induced by cyclophosphamide and its molecular mechanism. **Methods** KGN cells were selected as the research subjects and cyclophosphamide was used to establish the model of premature ovarian insufficiency *in vitro*. Normal group, model group and ginsenoside RH2 (40  $\mu\text{M}$ , 24 h) group were set. The protective effect of ginsenoside RH2 (40  $\mu\text{M}$ , 24 h) on cyclophosphamide-induced KGN cell damage was detected by CCK8 assay. AO/EB staining was performed to detect the apoptosis of KGN cells. Network pharmacology (NP) was used to analyze the potential target of function of ginsenoside RH2 as well as the downstream path. The protein expressions of BCL2L1, p-PI3K, p-AKT, PI3K and AKT were detected by Western blot. The binding ability of ginsenoside RH2 to BCL2L1 was determined by molecular docking. **Results** After cyclophosphamide (8  $\mu\text{M}$ , 24 h) stimulation, the activity rate of KGN cells decreased in a dose-dependent manner, but after ginsenoside RH2 administration, the decrease in proliferation rate of KGN cells caused by cyclophosphamide and the cell apoptosis could be reversed. Meanwhile, BCL2L1 might be the target of ginsenoside RH2 to protect KGN cells from cyclophosphamide-induced damage. Overexpression of BCL2L1 could increase the protective effect of RH2 on cyclophosphamide against granulosa cells. Low expression of BCL2L1 could reverse the protective effect of RH2 on cyclophosphamide against granulosa cells. Meanwhile, ginsenoside RH2 could reverse the increased expression of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT in KGN cells induced by cyclophosphamide. Moreover, BCL2L1 and ginsenoside RH2 had a good correlation degree (-7.28 kcal/mol), showing strong binding ability. **Conclusion** Ginsenoside RH2 has a protective effect on ovarian granulosa cells damaged by cyclophosphamide, which may inhibit the damage to ovarian granulosa cells by activating the BCL2L1/PI3K/AKT pathway.

**Key words:** Ginsenoside RH2; Network pharmacology; Ovarian granulosa cell; Ovarian damage

## 0 引言

早发性卵巢功能不全(Premature ovarian insufficiency, POI)是人类的主要不孕症之一。现有证据表明, 约有 1% ~ 5% 的 40 岁以下女性存在

POI<sup>[1]</sup>。患有 POI 的女性主要表现为不孕不育、更年期症状提前等症状, 同时伴有骨质疏松、自身免疫性疾病、缺血性心脏病, 甚至可以导致女性死亡风险增加<sup>[1-2]</sup>。根据病理特征, POI 的发生被归因于原始卵泡发育异常、闭锁加速导致的卵泡过早枯竭, 卵泡匮乏, 最终引发不孕。POI 的发病机制尚未明确, 而且针对药物治疗研究的 POI 模型尚未明确, 目前研究者经常使用 2 种表型模型: “自

收稿日期: 2022 - 11 - 09  
作者单位: 哈尔滨医科大学附属第一医院药学部, 黑龙江 哈尔滨 150001  
\* 通信作者  
DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202303001

然衰老”模型以及“化疗诱导”模型。其中,以环磷酸诱导的卵巢颗粒细胞(KGN)可作为POI体外模型进行研究<sup>[3]</sup>。目前,POI的主要治疗方法是激素替代疗法,如雌激素、孕酮和脱氢表雄酮等<sup>[4]</sup>。但这些治疗措施无法从根本上解决卵巢衰老及卵巢储备量下降导致的不孕问题,因此开发一种切实保护卵巢功能的POI治疗药物迫在眉睫。

人参是一种多年生草本植物,具有补气、活血、抗衰老、益智等功效<sup>[5-7]</sup>。人参皂苷RH2是人参中发现的三萜类甾体化合物,在不影响细胞正常功能的情况下,显示出多种生物活性<sup>[8]</sup>。鉴于人参皂苷Rg1能有效促进卵泡的形成,上调抗衰老因子p16的表达;同时,Rg1还可以减少颗粒细胞的凋亡,抑制卵泡闭锁,从而增强卵巢功能<sup>[9-10]</sup>。而Rg1在体内被脱糖基化为RH2,RH2很可能是其有效成分<sup>[11]</sup>。此外,人参皂苷RH2可通过减轻心肌细胞的局部死亡以及抑制体内炎症因子的释放,抑制急性心肌梗死的病理发展<sup>[12]</sup>。RH2对POI的治疗作用及其机制方面尚不明确,本研究对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养以及转染 KGN细胞购自北纳生物科技有限公司。进行STR鉴定分析以确保细胞真实性。KGN细胞培养在含有高糖DMEM并添加10%胎牛血清以及1%青-链霉素,细胞在温度为37℃的恒温CO<sub>2</sub>孵箱中培养。为了保持细胞独特的功能特性,KGN细胞仅使用第4代到第9代间的细胞作为实验对象。参照现有的研究,环磷酸胺(CXT,1 mg/ml,美国西格玛公司)8 μM作用24 h作为POI模型的诱导剂<sup>[3]</sup>。将不同表达的BCL2L1(锐博,中国)的质粒分别转染到KGN细胞中作用72 h,进行后续实验。

1.2 细胞计数 分别将正常组、模型组(环磷酸胺,8 μM,24 h)以及人参皂苷RH2组(40 μM,24 h)的KGN细胞接种于96孔板(2 × 10<sup>3</sup>个/孔,200 μl完全培养基)。在0、6、12、24、48 h评估一次细胞增殖活性。待作用时间完成后,在培养孔中加入CCK-8溶液(10 μl/孔,货号:MA0218-1,大连美伦生物)。在5% CO<sub>2</sub>和37℃孵育2 h后,用Sunrise Microplate Reader(赛默飞,中国)在450 nm处读取吸光度。

1.3 蛋白印迹分析(Western blot) 采用蛋白酶抑制剂以及细胞裂解液(1:100)提取不同组别细胞中的蛋白。使用BCA试剂盒检测蛋白浓度<sup>[13]</sup>。12% SDS-PAGE凝胶(碧云天,中国)分离蛋白质

样品,然后转移到硝酸纤维素膜上(PALL,美国)。用5%脱脂牛奶在室温下封闭膜2 h,并在4℃下用以下抗体过夜:抗β-actin(编号:AC004,1:25 000,Abclonal,美国)以及BCL2L1(编号:R23603,1:1 000,正能生物,中国)。硝酸纤维素膜在PBST中洗涤3次,然后与HRP结合的山羊抗兔抗体(GB23303,1:3 000)孵育。显影正常蛋白与β-actin的灰度值比率,以确定某些蛋白质改变。使用Image J软件对图像进行定量分析。

1.4 AO/EB染色以及流式细胞术检测细胞凋亡

AO/EB染色(西格玛,美国)用于分析RH2以及环磷酸胺对于KGN细胞凋亡的影响。将AO以及EB按照1:1的配比溶解在试剂中,其中以每毫升溶液中含有20 μl AO以及EB的混合溶液为宜。通过荧光显微镜(凤凰,中国)在5个随机区域分析图像。

1.5 网络药理学筛选人参皂苷RH2潜在作用靶点以及下游通路

1.5.1 人参皂苷RH2化学成分和靶点基因获取

将“Ginsenoside RH2”导入PubChem网站获取SMILE结构, PubChem: CC(=CCCC(C)(C1CCC2(C1C(CC3C2(CCC4C3(CCC(C4(C(C)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)C)C)O)C)O)C,图1。将该结构通过SWISS数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>; 阈值:Probability > 0)、Targetnet数据库(<http://targetnet.scbdd.com/home/index/>; 阈值:AUC > 0.7, Probability > 0)、STITCH数据库(<http://stitch.embl.de/>, 阈值:0.15),分别预测Ginsenoside RH2药效成分的潜在作用靶点基因。SWISS和Targetnet提供了涉及370 000多种化合物的综合药理信息,还可以预测与该化合物相关的蛋白质靶点,便于更好地了解其药理作用。STITCH数据库是一个搜索已知和预测的化合物和蛋白质之间相互作用的平台,人参皂苷RH2结构见图1。

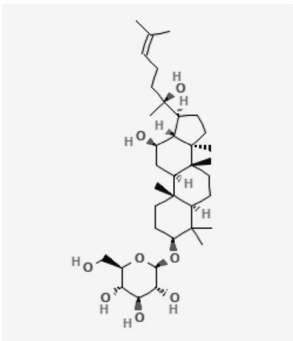


图1 人参皂苷RH2的结构图

**1.5.2 POI 靶点基因的获取** 在以下 2 个数据库中筛选 POI 相关靶点:选择早发性卵巢功能不全的关键词“premature ovarian insufficiency”,通过人类基因综合数据库 (GeneCards, <https://www.genecards.org/>) 和 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 数据库 (<https://omim.org>) 得到疾病相关靶基因。GeneCards 数据库可以全面显示基因型与表型之间的关系、基因相互作用、信号通路和临床意义。OMIM 数据库是一个不断更新的数据库,由人类孟德尔遗传疾病组成,主要研究人类遗传变异与表型性状之间的关系。

**1.5.3 成分-靶点-疾病网络的构建和拓扑属性分析** 将人参皂苷 RH2 和 POI 的共同靶点导入 string 平台 (<https://string-db.org/>),构建成分-靶点-疾病的蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI),过滤条件被选择为“智人”。最终构建了一个 PPI 网络图,其中“节点”信息为目标,节点之间的关系用“边”表示,进行拓扑结构分析,创建一个可视化显示,分析出核心度最高的前 5 个蛋白,最终预测出潜在的核心靶点。

**1.5.4 人参皂苷 RH2 抗 POI 下游通路分析** 利用注释、可视化和集成 R 包“clusterProfiler”对基因本体论 (GO) 功能和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 途径富集进行分析。GO 功能分析主要用于描述所鉴定基因可能具有的功能类型,包括细胞功能、分子功能 (MF) 和生物学功能。KEGG 富集分析用于获得 RH2 抗 POI 的潜在信号通路。

**1.6 分子对接** 为了评估候选药物/小分子与其靶标之间的结合能和相互作用模式,采用计算机蛋白-配体对接软件 Autodock Vina 1.2.2 进行分析。从 PubChem 化合物数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获得人参皂苷 RH2 的分子结构。蛋白 BCL2L1 (PDB 编号 1R2D;分辨率 1.95Å) 的 3D 坐标是从 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 下载的。首先对蛋白和配体文件进行准备,将所有蛋白质和分子文件都转换为 PDBQT 格式,去除所有水分子,并添加极性氢原子。网格框居中以覆盖每个蛋白质的结构域并适应自由分子运动。对接口袋设置为一个 30Å × 30Å × 30Å 的正方形口袋,格点距离为 0.05 nm。利用 Autodock Vina 1.2.2 (<http://autodock.scripps.edu/>) 进行分子对接研究及模型可视化分析。

**1.7 统计分析** 数据来自至少 3 个独立的实验,并以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组之间的比较采用  $t$  检验。而

三组及以上的比较采用单因素方差分析中的 Tukey 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人参皂苷 RH2 逆转环磷酰胺诱导的卵巢颗粒细胞损伤

**2.1.1 人参皂苷 RH2 逆转环磷酰胺导致的 KGN 细胞活性降低** 我们之前的研究发现人参皂苷 RH2 (40  $\mu\text{M}$ , 24 h) 能够逆转 LPS 导致的颗粒细胞炎症以及对活性氧的影响。因此,选择 RH2 (40  $\mu\text{M}$ , 24 h) 以及环磷酰胺 (8  $\mu\text{M}$ , 24 h) 单独或共同处理 KGN 细胞。分别检测 4 组 (正常组、人参皂苷 RH2 组、环磷酰胺组以及环磷酰胺 + 人参皂苷 RH2 组) 中 KGN 细胞活性的改变,结果显示,相对于正常组,环磷酰胺组中的细胞增殖活性明显降低,而人参皂苷 RH2 能够逆转由环磷酰胺导致的 KGN 细胞活性降低 (图 2),同时,单独加入人参皂苷 RH2 组细胞活性与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

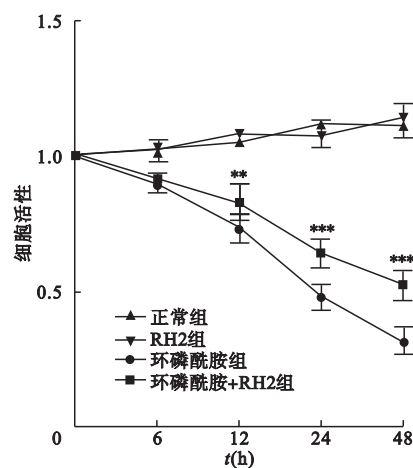


图2 人参皂苷 RH2 逆转由环磷酰胺导致的 KGN 细胞活性降低  
注:与环磷酰胺组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

**2.1.2 人参皂苷 RH2 逆转由环磷酰胺导致的 KGN 细胞凋亡** 为了进一步探究人参皂苷 RH2 对于环磷酰胺导致的颗粒细胞活性的作用,通过 AO/EB 染色检测人参皂苷 RH2 对于环磷酰胺导致的 KGN 细胞凋亡的影响。结果显示,环磷酰胺组中的 KGN 细胞的凋亡率明显高于正常组,而 RH2 (40  $\mu\text{M}$ , 24 h) 能够明显抑制由环磷酰胺导致的 KGN 细胞凋亡 (图 3)。

**2.2 BCL2L1 是人参皂苷 RH2 保护 POI 的潜在靶点** 通过网络药理学方法,将人参皂苷 RH2 治疗疾病的潜在靶基因导入 String 数据库构建 PPI



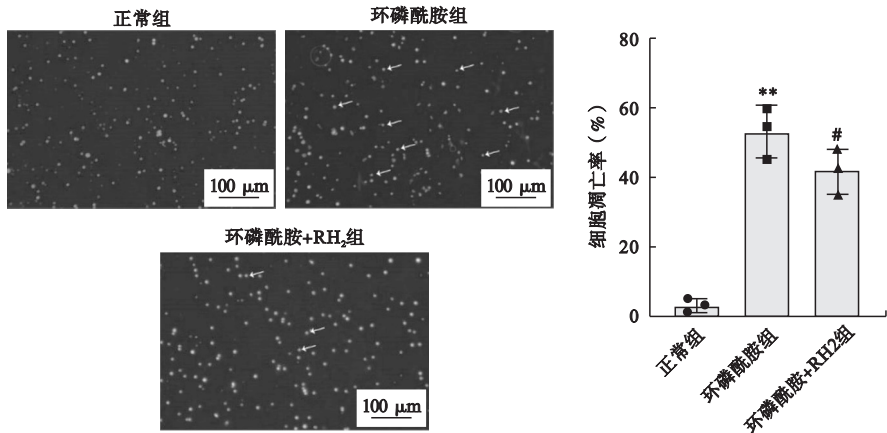


图 3 人参皂苷 RH2 逆转由环磷酰胺诱导的 KGN 细胞凋亡

注:柱状图统计了 3 次独立实验的结果,用  $\bar{x} \pm s$  表示。\* 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; # 与环磷酰胺组比较,  $P < 0.05$

网络(图 4A),共有 17 个节点,144 条边。其中节点代表了人参皂苷 RH2 抗 POI 的潜在靶点基因,边代表靶点基因间的相互作用情况。经过网络拓扑属性分析,该网络的连接度平均值为 16.94,平均介数为 4.06,全局聚类系数为 0.77,平均紧密度为 0.043,边的平均介数为 1.42。按照假设度排名前 5 的基因可作为人参皂苷 RH2 治疗 POI 的潜在高置信靶点基因:即 STAT3、BCL2L1、HSP90AA1、

DNMT1 和 FGF2 为人参皂苷 RH2 治疗 POI 潜在靶点。通过查阅相关文献,发现 BCL2L1 可能是人参皂苷 RH2 抗 POI 的潜在靶点。通过 Western blot 检测人参皂苷 RH2 保护环磷酰胺诱导 KGN 细胞中 BCL2L1 蛋白的表达,结果显示,环磷酰胺能够使 KGN 细胞中 BCL2L1 蛋白的表达降低,而人参皂苷 RH2 能够使 BCL2L1 蛋白表达升高(图 4B)。

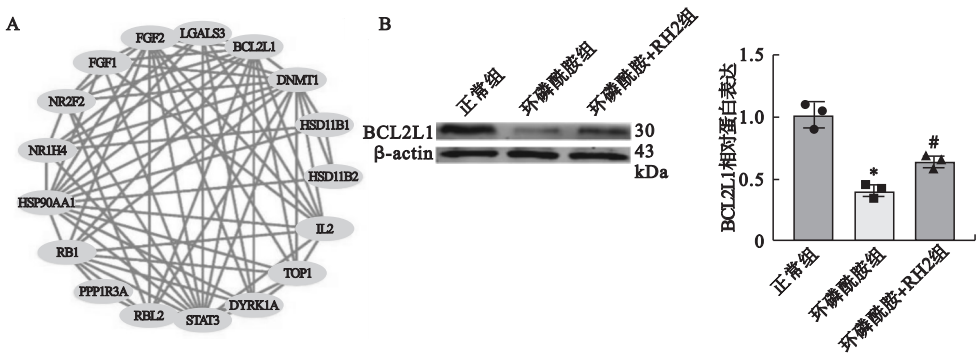


图 4 BCL2L1 是人参皂苷 RH2 保护 POI 的潜在靶点

注:A. 人参皂苷 RH2 抗 POI 的潜在靶点;B. 不同处理组中 BCL2L1 蛋白的表达。柱状图统计了 3 次独立实验的结果,用  $\bar{x} \pm s$  表示。\* 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; # 与环磷酰胺组比较,  $P < 0.05$

2.3 不同表达水平 BCL2L1 在人参皂苷 RH2 保护环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤中的作用 为了进一步确定 BCL2L1 是否是人参皂苷 RH2 保护环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的潜在靶点,采用细胞转染技术过表达或低表达 KGN 细胞中的 BCL2L1, Western blot 方法检测 KGN 细胞中 BCL2L1 的蛋白变化。结果显示,低表达 BCL2L1 能够使 KGN 细胞中 BCL2L1 蛋白表达降低,而过表达 BCL2L1 能够使 KGN 细胞中 BCL2L1 蛋白表达上调(图 5A)。通过 CCK-8 试剂盒检测不同

表达的 BCL2L1 对人参皂苷 RH2 保护环磷酰胺刺激后 KGN 细胞活性的影响。结果显示,相对于人参皂苷 RH2 组,低表达 BCL2L1 能够明显逆转人参皂苷 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的保护作用,而过表达 BCL2L1 能够促进人参皂苷 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的保护作用(图 5B)。通过 AO/EB 检测细胞的凋亡情况,结果与 CCK-8 所示结果相符,相对于人参皂苷 RH2 组,低表达 BCL2L1 能够明显逆转人参皂苷 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞凋亡的抑制作用,而过表达

BCL2L1 能够促进人参皂苷 RH2 对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞凋亡的保护作用(图 5C)。

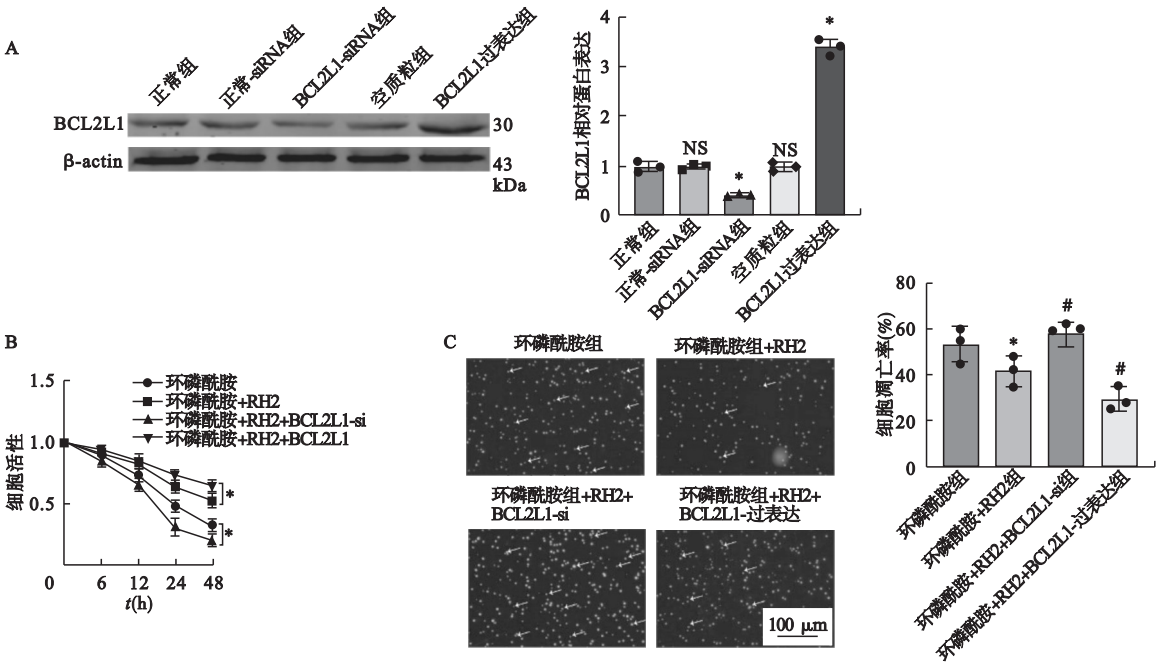


图 5 不同表达水平 BCL2L1 参与 RH2 保护环磷酰胺对于 KGN 细胞活性的影响

注:A. 不同表达 BCL2L1 质粒转染后 KGN 细胞中 BCL2L1 的表达( \* 与正常组比较,  $P < 0.05$  );B. 不同表达 BCL2L1 对于 KGN 细胞活性的影响( \*  $P < 0.05$  );C. 不同表达 BCL2L1 对于 RH2 保护环磷酰胺对于 KGN 细胞凋亡的影响(柱状图统计了 3 次独立实验的结果,用  $\bar{x} \pm s$  表示。 \* 与环磷酰胺组比较,  $P < 0.05$  ;#与环磷酰胺 + RH2 组比较,  $P < 0.05$  )

2.4 分子对接结果 将人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 进行分子对接。结合能越低说明两者的结合可能性越大且越稳定,分值  $\leq -5.0$  代表具有潜在活性,分值  $\leq -7.0$  代表成分间具有强的稳定性及活性。人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 对接结果显示,人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 的分值为:  $-7.28 \text{ kcal/mol}$ ,说明人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 具有较强的结合能力(图 6)。

等(图 7A-B)。随后,通过 Western blot 的方法检测 RH2 对 PI3K/AKT 信号通路中磷酸化的 PI3K/AKT 蛋白的影响。结果显示,环磷酰胺能够使 p-PI3K/PI3K 以及 p-AKT/AKT 比值上调,而人参皂苷 RH2 能够逆转这一现象(图 7C)。结果表明,人参皂苷 RH2 通过调控 PI3K-Akt 信号通路从而发挥对环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤的保护作用。

3 讨论

POI 是一种具有多种病理机制的疾病。研究表明,某些化疗药物可导致不可逆的卵巢损伤,因此,对于需要抗癌治疗的育龄期和青春女性,生育能力保存极其重要<sup>[14]</sup>。然而,美国生殖医学协会推荐的生育能力保存方法是保存夫妇的胚胎和女性卵母细胞。虽然激素替代疗法可以长期用于缓解症状,但其不能阻止疾病发生和进展。此外,卵巢组织移植和干细胞移植也不能治愈 POI,且预后差,长期结果不可控<sup>[15-16]</sup>。因此,迫切需要为 POI 患者找到新的临床治疗策略以及潜在的治疗药物。迄今为止,越来越多的证据表明,中药或者中药单体具有很好的治疗 POI 作用,尤其是针对于化疗药物导致的卵巢颗粒细胞的损伤尤有成效。

人参皂苷 RH2 是人参提取物中具有显著抗癌、抗氧化以及抗凋亡作用的关键分子<sup>[17]</sup>。如:人

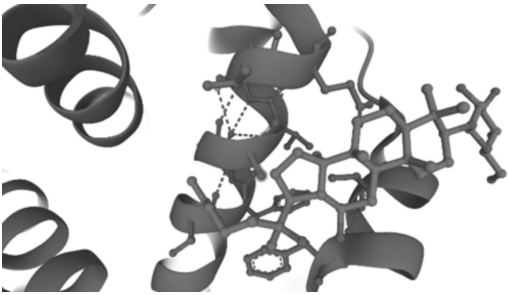


图 6 人参皂苷 RH2 与 BCL2L1 的分子对接图

2.5 人参皂苷 RH2 通过 PI3K/AKT 信号通路保护环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤 通过网络药理学对于人参皂苷 RH2 治疗 POI 的潜在相关通路进行分析,结果显示,人参皂苷 RH2 以及 BCL2L1 涉及的潜在通路: PI3K-Akt signaling pathway、JAK-STAT signaling pathway 及 Pancreatic cancer

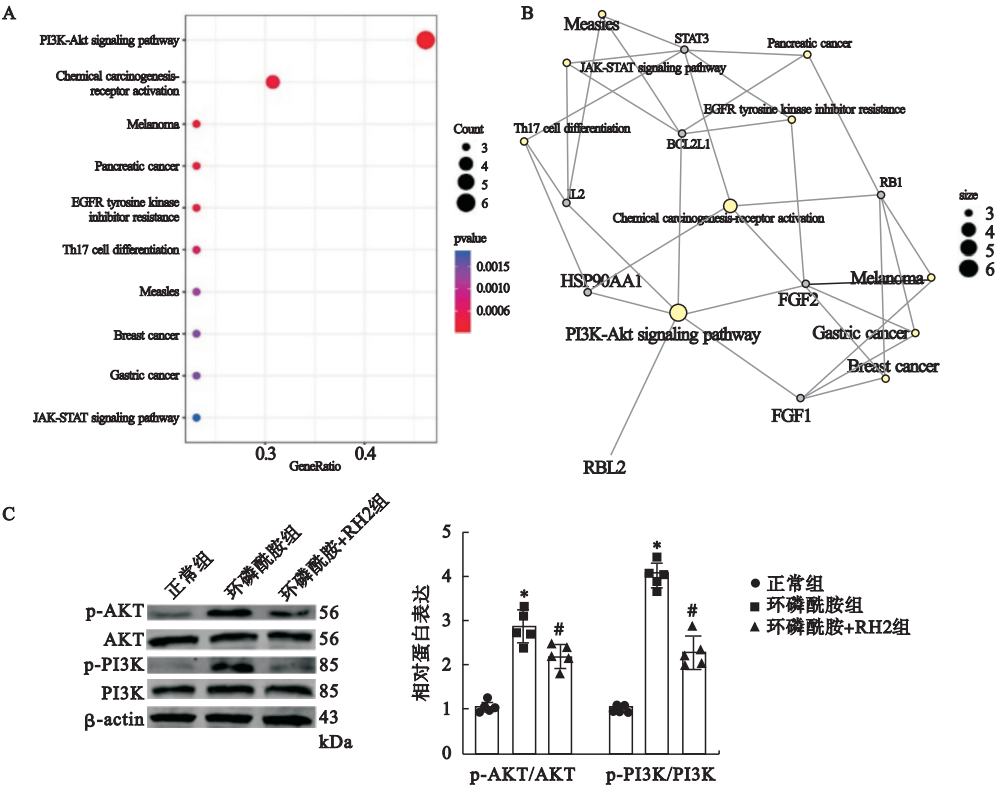


图 7 人参皂苷 RH2 通过调控 PI3K/AKT 信号通路保护环磷酰胺诱导的 KGN 细胞损伤

注:A-B. 网络药理学分析人参皂苷 RH2 抗 POI 的潜在相关通路;C. Western blot 对 PI3K/AKT 信号通路中磷酸化的 PI3K 以及 AKT 进行定量分析。柱状图统计了 5 次独立实验的结果,用  $\bar{x} \pm s$  表示; \* 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; # 与环磷酰胺组比较,  $P < 0.05$

参皂苷 RH2 与白桦脂酸联合可提高 caspase-8 活性,调节 AKT/GSK3 $\beta$  通路,提高 p53 表达,诱导宫颈癌细胞凋亡<sup>[18]</sup>。该研究中,与环磷酰胺组细胞相比,人参皂苷 RH2 能够明显逆转由环磷酰胺导致的卵巢颗粒细胞活性降低以及细胞凋亡。目前,已有研究揭示了 3 种主要的凋亡途径:线粒体途径(固有途径)、死亡受体途径(外部途径)和内质网应激途径,都参与了 POI 的病理生理学过程<sup>[19-20]</sup>。

B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, BCL2) 基因家族调节线粒体依赖性凋亡。该家族包括促凋亡和抗凋亡的成员,它们之间和线粒体膜相互作用,防止或促进线粒体外膜透化(MOMP)<sup>[21-22]</sup>。该家族的促凋亡成员促进 MOMP,释放几种凋亡激活因子到细胞质中。抗凋亡的 BCL2 蛋白(如 BCL2 和 BCL2L1)拮抗促凋亡的 BH3 蛋白(如 BID、BIM 和 NOXA)或直接隔离效应蛋白 BAK 和 BAX<sup>[23-24]</sup>。因此,促凋亡和抗凋亡 BCL2 家族成员的平衡决定了细胞的生存或死亡。颗粒细胞的损伤对于卵母细胞具有保护作用,因此,在颗粒细胞中 BCL2L1 的表达对保护卵母细胞具有重要的作用。本研究结果发现,环磷酰胺诱导的 KGN

细胞中 BCL2L1 的表达明显下调。同时,人参皂苷 RH2 能够通过调控 BCL2L1 的表达,逆转环磷酰胺对 KGN 细胞的损伤作用。在以往的报道中, BCL2L1 与凋亡效应蛋白的相互作用阻止了 BAK 和 BAX 依赖性的 MOMP,从而诱导了卵巢细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

众所周知,PI3K/AKT 信号通路可调节广泛的细胞功能,包括生存、增殖、生长和代谢。也有报道,PI3K/AKT 通路在原始卵泡发育的起始和存活中也起着关键作用,参与卵母细胞生长和颗粒细胞增殖和凋亡<sup>[26]</sup>。既往研究表明,CTX 能够通过上调 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化,导致原始卵泡过度激活,同时,激活 PI3K/AKT/m-TOR 通路可促进原始卵泡过度丢失,导致生长中的卵泡发生凋亡<sup>[27-28]</sup>。本研究结果显示,与环磷酰胺组相比,人参皂苷 RH2 组的 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 显著下调,提示人参皂苷 RH2 可能通过 PI3K/AKT 依赖机制抑制环磷酰胺诱导的颗粒细胞凋亡,从而起到保护卵母细胞的作用。

综上所述,人参皂苷 RH2 能够通过调控 BCL2L1 的表达,进而激活磷酸化的 PI3K/AKT 的表达,参与人参皂苷 RH2 逆转环磷酰胺诱导的颗

粒细胞损伤。本研究为人参皂苷 RH2 成为一种潜在的 POI 治疗药物提供了实验室依据。

#### 参考文献:

- [1] Ishizuka B. Current understanding of the etiology, symptomatology, and treatment options in premature ovarian insufficiency (POI) [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 626924.
- [2] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5): 926-937.
- [3] Liu M, Zhang D, Zhou X, et al. Cell-free fat extract improves ovarian function and fertility in mice with premature ovarian insufficiency [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 320.
- [4] Sullivan SD, Sarrel PM, Nelson LM. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(7): 1588-1599.
- [5] Xue Q, He N, Wang Z, et al. Functional roles and mechanisms of ginsenosides from *Panax ginseng* in atherosclerosis [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1): 22-31.
- [6] Smith I, Williamson EM, Putnam S, et al. Effects and mechanisms of ginseng and ginsenosides on cognition [J]. *Nutr Rev*, 2014, 72(5): 319-333.
- [7] Lee TXY, Wu J, Jean WH, et al. Reduced stem cell aging in exercised human skeletal muscle is enhanced by ginsenoside Rg1 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(12): 16567-16576.
- [8] Rho T, Jeong HW, Hong YD, et al. Identification of a novel triterpene saponin from *Panax ginseng* seeds, pseudoginsenoside RT8, and its antiinflammatory activity [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1): 145-153.
- [9] Choi S, Jung SY, Lee JH, et al. Effects of ginsenosides, active components of ginseng, on nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 442(1-2): 37-45.
- [10] He L, Wang X, Cheng D, et al. Ginsenoside Rg1 improves pathological damages by activating the p21 p53 STK pathway in ovary and Bax Bcl2 in the uterus in premature ovarian insufficiency mouse models [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 37.
- [11] Cheng Y, Li R, Lin Z, et al. Structure-activity relationship analysis of dammarane-type natural products as muscle-type creatine kinase activators [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(17): 127364.
- [12] Song W, Dai B, Dai Y. Influence of ginsenoside Rh2 on cardiomyocyte pyroptosis in rats with acute myocardial infarction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5194523.
- [13] Hnasko TS, Hnasko RM. The western blot [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1318: 87-96.
- [14] Yding Andersen C, Mamsen LS, Kristensen SG. Fertility Preservation: freezing of ovarian tissue and clinical opportunities [J]. *Reproduction*, 2019, 158(5): F27-F34.
- [15] Li Z, Zhang M, Tian Y, et al. Mesenchymal stem cells in premature ovarian insufficiency: mechanisms and prospects [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 718192.
- [16] Huang B, Qian C, Ding C, et al. Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 362.
- [17] Wan Y, Wang J, Xu JF, et al. *Panax ginseng* and its ginsenosides: potential candidates for the prevention and treatment of chemotherapy-induced side effects [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(6): 617-630.
- [18] Shi X, Yang J, Wei G. Ginsenoside 20(S)-Rh2 exerts anticancer activity through the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway in human cervical cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4811-4816.
- [19] Tiosano D, Mears JA, Buchner DA. Mitochondrial dysfunction in primary ovarian insufficiency [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(10): 2353-2366.
- [20] Wu Y, Ma C, Zhao H, et al. Alleviation of endoplasmic reticulum stress protects against cisplatin-induced ovarian damage [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 85.
- [21] 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.
- [22] Wu H, Xue D, Chen G, et al. The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1712-1725.
- [23] González-Gironès DM, Moncunill-Massaguer C, Iglesias-Serret D, et al. AICAR induces Bax/Bak-dependent apoptosis through upregulation of the BH3-only proteins Bim and Noxa in mouse embryonic fibroblasts [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(8): 1008-1016.
- [24] Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar TR, et al. Novel BCL2 inhibitor, disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 131: 16-28.
- [25] Zheng JH, Viacava Follis A, et al. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis [J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2690-2700.
- [26] Maidarti M, Anderson RA, Telfer EE. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt signalling and DNA damage in the oocyte: implications for primordial follicle activation, oocyte quality and ageing [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 200.
- [27] Chen XY, Xia HX, Guan HY, et al. Follicle loss and apoptosis in cyclophosphamide-treated mice: what's the matter [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 836.
- [28] Zhou L, Xie Y, Li S, et al. Rapamycin prevents cyclophosphamide-induced over-activation of primordial follicle pool through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in vivo [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 56.

(本文编辑:刘立民)