

氯丙嗪对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

邬静^{1,2}, 袁慧¹, 彭双清^{1*}

(1. 湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2. 军事医学科学院 疾病预防控制所, 北京 100071)

摘 要: 为研究大鼠卵巢颗粒细胞(GC)的分泌功能, 用氯丙嗪染毒体外培养的大鼠 GC, 采用 MTT 法检测细胞相对活力, ELISA 法检测收集培养液中孕酮(P)和雌二醇(E₂)的含量, 半定量 RT-PCR 检测激素分泌相关调控基因 *FSHR*、*StAR*、*P450scc* 和 *P450arom* mRNA 的表达, 免疫细胞化学染色法检测细胞中特异卵泡刺激素受体的表达。结果表明: 经 0.1、1.0 和 10.0 μmol/L 氯丙嗪染毒 24 h 后, 与对照组相比, 细胞相对活力分别为 87.95%、83.96% 和 74.48%, E₂ 的分泌量和 *StAR* mRNA 相对表达水平分别从对照组的 6.16 pg/μg、2.014 显著下降到 3.70 pg/μg、0.311, 呈现明显的剂量-效应关系, 表明转运蛋白 *StAR* 可能是氯丙嗪影响颗粒细胞激素分泌的关键位点之一。

关 键 词: 大鼠; 氯丙嗪; 卵巢颗粒细胞; 激素分泌; 细胞活力

中图分类号: S859.79 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)05-0517-04

Effect of chlorpromazine on the steroidogenesis of rat ovarian granulosa cells *in vitro*

WU Jing^{1,2}, YUAN Hui¹, PENG Shuang-qing^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: To study the toxic effects and explore the possible mechanism of chlorpromazine exposure to rat ovarian granulosa cell steroidogenesis *in vitro*, immature ovarian granulosa cells of wistar rat was primary cultured. After exposure to chlorpromazine for 24 h, cell viability was detected by MTT assay, content of progesterone (P) and estradiol (E₂) collected from medium were detected by ELISA assay; *FSHR*, *StAR*, *P450scc* and *P450arom* mRNA expression were detected by semi-quantitative RT-PCR, and expression of follicle stimulating hormone receptor-specific receptor(*FSHR*) in granulosa cells was detected by immunocytochemical staining assay. The results showed that chlorpromazine could significantly decrease the viability of rat ovarian granulosa cells, thus affect steroidogenesis and *StAR* maybe one of the key factors to affect the steroidogenesis of granulosa cells.

Key words: rat; chlorpromazine; granulosa cells; steroidogenesis; cell viability

氯丙嗪是吩噻嗪类药物, 主要用来治疗人类的精神疾病, 在兽医上主要用于镇静、抗应激等。相关研究^[1]显示, 氯丙嗪有抑制性周期、延迟排卵等作用。在动物试验中, 当给予氯丙嗪后, 发现动物出现卵巢和子宫质量减少、卵泡成熟受到抑制、子宫内膜萎缩等现象, 提示氯丙嗪可通过引起动物和人

类内分泌系统的不良反应而导致性功能障碍, 也可引起卵巢功能降低^[2-4], 对家畜繁殖及家禽产蛋产生不利影响。关于氯丙嗪细胞毒性的研究^[5-7]主要集中在对癌细胞抑制作用方面, 有关其对卵巢细胞功能影响的阈值与方式至今尚未明确, 尤其对卵巢颗粒细胞影响的研究至今鲜有报道。颗粒细胞(granulosa

收稿日期: 2011-06-12

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09501-034); 湖南农业大学青年基金(08QN07)

作者简介: 邬静(1979—), 男, 江苏南京人, 博士研究生, 讲师, 主要从事动物非传染性群发病研究, wu23jing@yahoo.com.cn; *通信作者, pengsq@hotmail.com

cell, GC)是卵巢内的最大细胞群,也是主要的功能细胞。卵泡发育的显著标志之一是GC迅速生长及增殖,并可通过GC凋亡引起成年动物的卵泡闭锁。此外,GC与卵泡膜细胞共同完成卵巢激素的合成,维持着有利于卵母细胞生长和成熟的微环境,由此可见,GC的增值、凋亡及激素分泌与卵泡的发育、卵母细胞的成熟密切相关^[8-9]。为此,笔者以体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞为研究模型,通过氯丙嗪染毒,研究其对卵巢颗粒细胞雌、孕激素分泌的影响,并从分子水平上探讨其可能的作用机制,旨在为氯丙嗪在兽医临床上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

25~29日龄未成熟雌性wistar大鼠,体重(80±20)g,清洁级,由军事医学科学院疾病预防控制中心实验动物房提供。

DMEM培养基购自INVITROGEN公司;胎牛血清购自四季青;孕马血清(PMSG)购自北京海德生物技术公司;卵泡雌激素(FSH)、雄烯二酮、MTT、二甲亚砜(DMSO)购自Sigma公司;盐酸氯丙嗪由军事医学科学院疾病预防控制中心毒理学评价中心提供;大鼠雌二醇、孕酮ELISA检测试剂盒购自RapidBio. Lab; RT-PCR试剂盒购自Fermentas;引物合成由INVITROGEN公司完成;FSHR免疫组化检测试剂盒购自武汉博士德;BCA蛋白定量试剂盒为普利莱公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 大鼠卵巢颗粒细胞的分离、培养和染毒

将每只大鼠一次性腹腔注射PMSG 40 IU, 48 h后颈椎脱臼处死。打开大鼠腹腔,在无菌条件下迅速取出其双侧卵巢,在40倍解剖显微镜下用眼科剪剪破有腔卵泡,轻轻挤压,使卵母细胞及周围的卵丘细胞、颗粒细胞同时逸出,反复轻轻吹打,使卵母细胞与卵丘细胞分离,使颗粒细胞释放到预冷的DMEM培养基中。用孔径0.074 mm的不锈钢细胞筛过滤,于1 000 r/min、10 min离心后,在含10% FBS(胎牛血清)的DMEM培养基中重悬并计数。用台盼蓝染色法检测细胞活力,当细胞活力>95%时进行下一步试验。调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。以每孔 10^4

个细胞的密度接种于96孔细胞培养板;以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于24孔细胞培养板;以 5×10^5 个细胞的密度接种于25 cm²细胞培养瓶。置于37℃、体积分数为5%的CO₂饱和湿度细胞培养箱中培养。培养96 h后更换为无血清培养基(含 1×10^{-8} mol/L的雄烯二酮和10 ng/mL的FSH),分别加入经后续试验确定的相应浓度的氯丙嗪,继续培养24 h,进行试验。

1.2.2 半抑制浓度和细胞活力的测定

用MTT法测定氯丙嗪对大鼠颗粒细胞的半抑制浓度(IC₅₀)。将接种有颗粒细胞的96孔板中的培养液更换为含有氯丙嗪的培养液,氯丙嗪的浓度为 $1 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-5}$ mol/L,每个浓度设4个复孔,每孔的液体总量为100 μL,同时设空白对照。染毒24 h后,加入MTT 10 μL,37℃培养4 h后取出,弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL,在570 nm波长自动酶标仪上进行比色、读数,测出每孔光密度值(OD)。药物对颗粒细胞的抑制率=1 - (药物孔平均OD值/对照孔平均OD值)。将所得结果进行曲线拟合,计算出氯丙嗪的IC₅₀值。据所得的IC₅₀值,设置高、中、低3个浓度梯度的氯丙嗪染毒组和阴性对照组,于96孔板内染毒24 h后用MTT法进行检测,具体方法同上,并按如下公式计算细胞活力:相对细胞活力=染毒组OD值/对照组OD值。

1.2.3 细胞激素分泌情况的测定

留置各培养瓶中的培养液,采用竞争性酶联免疫法检测雌二醇(E₂)和孕酮(P),严格按照试剂盒说明书操作,每一剂量作3个平行样。收集每瓶中的细胞,用BCA法测定样品的蛋白浓度,测定的激素值都以该法检测的蛋白量来进行校正。

1.2.4 激素分泌相关调控基因mRNA表达的半定量检测

除去上清后,用Trizol试剂盒一步法提取培养颗粒细胞的总RNA,以GADPH作为内参照,用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)2步法检测氯丙嗪对培养细胞凋亡激素分泌相关基因FSHR、StAR、P450scc和P450arom mRNA表达的影响。引物的序列设计见表1。StAR的PCR反应条件为:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30次循环,最后72℃延伸10 min。FSHR、P450scc和P450arom的PCR反应条件为:

94 ℃预变性 3 min ,94 ℃变性 30 s ,57 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s ,共 35 次循环,最后 72 ℃延伸 10 min。将扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶中(含溴化乙锭)电泳,130 V 稳压 20 ~ 30 min ,用凝胶图像分析

仪摄片,并用 Quantity One 4.4 进行光密度(OD)半定量分析,用目的基因与 *GADPH* 的光密度比值代表目的基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 目的基因的引物序列和片段长度
Table 1 Target gene primer sequences and fragment length

目的基因	引物序列		片段长度/bp
<i>GADPH</i>	5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'	5'-A GGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	595
<i>FSHR</i>	5'-ACTGTGCATTCAACGGAA-3'	5'-GCC TCC ATG AGG GTG ACA-3'	240
<i>StAR</i>	5'-TGGGTGGATGGGTCAGGTCC-3'	5'-GCTCAGGCATCTCCCCAAAGT-3'	500
<i>P450scc</i>	5'-AGATCCCTTCCCTGTGTGACAATG-3'	5'-CCAGGCGCTCCCCAAATACAA-3'	509
<i>P450arom</i>	5'-GAGGAGACACTCATCATCA-3'	5'-ATATGATGCCATTCTCGTG-3'	127

1. 2. 5 细胞中 *FSHR* 表达的检测

将1×10⁵/mL的细胞悬液,种植于已预置好小盖玻片的24孔培养板中,放入CO₂培养箱中,在37 ℃、5% CO₂及完全饱和湿度条件下进行培养。当细胞生长至80%融合时用氯丙嗪染毒24 h,取出玻片,用PBS冲洗盖玻片3次,每次5 min。用4%多聚甲醛固定20 min。将固定好的细胞爬片用PBS洗涤3次,每次3 min。于3% H₂O₂室温孵育5 min,消除内源性过氧化物酶活性,用PBS清洗3次,每次5 min。加正常山羊血清封闭无关抗原,于室温下孵化20 min,倾去不洗,滴加一抗*FSHR*兔多克隆抗体(1 : 200),4 ℃过夜,用PBS清洗3次,每次5 min。滴加二抗IgG,37 ℃孵育60 min,用PBS清洗3次,每次5 min。滴加辣根酶标记链霉素工作液50 μL,于37 ℃孵育30 min,用PBS清洗3次,每次5 min。用DAB显色(显微镜下控制显色时间),自来水冲洗3次。用常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每个剂量组各制备3张细胞涂片进行免疫组化染色,于显微镜下观察拍照,并从中随意选取6张图片,应用图像分析软件Image-Pro Plus6.0对颗粒细胞中*FSHR*蛋白的相对表达量进行分析。

2 结果与分析

2. 1 氯丙嗪作用于大鼠颗粒细胞的 *IC*₅₀ 以及对其体外增值能力的影响

氯丙嗪作用于颗粒细胞的*IC*₅₀值为4.36×10⁻⁵ mol/L。根据*IC*₅₀值,设10.0、1.0和0.1 μmol/L氯丙

嗪染毒组,观察其对大鼠卵巢颗粒细胞体外增殖能力的影响。结果显示:10.0、1.0、0.1 μmol/L剂量组的细胞相对活力分别为74.48%、83.96%和87.95%,与对照组比较,各染毒组均能极显著抑制大鼠卵巢颗粒细胞的增殖(*P*<0.01),且存在一定的剂量-效应关系。

2. 2 氯丙嗪对颗粒细胞激素分泌及相关调控基因 mRNA 表达的影响

雌激素的检测结果显示,氯丙嗪能够抑制颗粒细胞激素E₂的分泌,随染毒剂量的升高,E₂的分泌逐渐减少,与对照组差异显著(*P*<0.05);与对照组比较,0.1 μmol/L氯丙嗪能显著促进P的分泌(*P*<0.05),但高剂量组P的分泌比低剂量组少,说明氯丙嗪低剂量促进、高剂量抑制P的分泌。RT-PCR检测结果(表2,图1)显示,不同浓度的氯丙嗪均能引起*FSHR* mRNA表达水平的升高和*StAR* mRNA表达水平的降低,除低剂量组的*FSHR* mRNA表达与对照组差异不显著外(*P*>0.05),其余各组与对照比较均有统计学意义(*P*<0.01)。此外,氯丙嗪在一定的浓度范围(0.1 ~ 1.0 μmol/L)内还能够促进*P450scc*和*P450arom* mRNA的表达,与对照组比较,除0.1 μmol/L剂量组的*P450scc* mRNA表达无显著变化外(*P*>0.05),其余各组均有统计学意义(*P*<0.05),当氯丙嗪浓度达到10.0 μmol/L时,*P450scc*和*P450arom* mRNA的表达水平虽略有下降,但与1 μmol/L中剂量组的差异不显著(*P*>0.05)。

表2 各剂量组卵巢颗粒细胞分泌激素的质量浓度及其相关调控基因 mRNA 相对表达的参数

Table 2 Parameters of ovarian granulosa cell hormone secretion and mRNA expression of regulatory gene

组别	E ₂ 质量浓度/ (pg·μg ⁻¹)	P质量浓度/ (ng·μg ⁻¹)	目的基因OD值/GADPH OD值			
			<i>FSHR</i>	<i>StAR</i>	<i>P450scc</i>	<i>P450arom</i>
对照组	6.16±0.58	181.90±13.48	0.590±0.037	2.014±0.009	0.521±0.075	0.531±0.045
0.1 μmol/L 剂量组	5.39±0.33	(231.72±11.90)*	0.792±0.077	(0.776±0.129)**	0.904±0.055	(0.808±0.084)*
1.0 μmol/L 剂量组	(4.46±0.10)*	188.56±10.31	(1.142±0.057)**	(0.478±0.113)**	(1.405±0.201)**	(1.450±0.121)**
10.0 μmol/L 剂量组	(3.70±0.26)**	(111.61±8.50)**	(1.661±0.146)**	(0.311±0.009)**	(1.163±0.200)*	(1.230±0.086)**

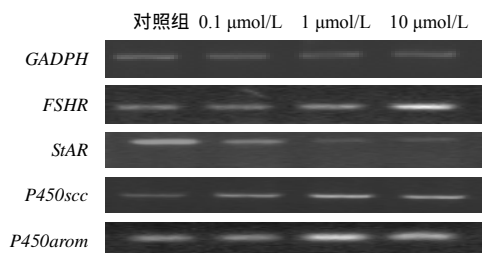


图1 各剂量组相关基因的 RT-PCR 凝胶电泳结果

Fig.1 Gel electrophoresis of RT-PCR products for related genes

2.3 氯丙嗪对颗粒细胞 *FSHR* 表达的影响

*FSHR*免疫细胞化学染色是卵巢内颗粒细胞的特异性染色。由图2(见封三)可见, *FSHR*阳性染色定位于细胞胞浆, 呈黄褐色着染, 通过图像分析发现, 对照组*FSHR*的相对表达量为0.0198, 而10.0、1.0、0.1 μmol/L剂量组的*FSHR*相对表达量分别为0.0425、0.0331和0.0248, 均能够显著促进颗粒细胞*FSHR*的表达($P<0.05$), 呈现一定的剂量-效应关系。

3 结论与讨论

本试验中采用0.1~10 μmol/L氯丙嗪体外染毒大鼠卵巢颗粒细胞, 其对颗粒细胞的 IC_{50} 为 4.36×10^{-5} mol/L, 可显著抑制细胞活力, 且具有一定的剂量-效应关系, 表明卵巢颗粒细胞对氯丙嗪较为敏感。氯丙嗪能显著抑制大鼠卵巢颗粒细胞甾体激素的分泌, 对细胞分泌E₂有显著的影响, 对P分泌的影响则是低剂量促进, 高剂量抑制。

大部分情况下, 卵巢甾体激素的生成可以由Falck提出的两细胞、两促性腺激素学说加以解释, 体外单独培养的颗粒细胞若没有雄激素作底物, 则仅能停留在合成P的阶段, E₂的分泌量极少^[10], 因此, 本研究中, 在直接给药的卵巢颗粒细胞原代培养体系中均加入雄烯二酮作为合成E₂的底物。*FSHR*作为G蛋白偶联受体家族的成员之一, 其在卵巢甾体激素的合成过程中也有重要作用: *FSH*与受体结合后方可激活颗粒细胞内的芳香化酶(*P450arom*), 因此, 雌激素的生成受卵泡内*FSHR*含量的限制^[11]。本试验的RT-PCR检测结果显示, 氯丙嗪能够上调卵

巢颗粒细胞*P450scc*和*P450arom* mRNA的表达, 可能与其在动物体内主要是通过肝细胞色素P450代谢有非常密切的关系^[12]。不论是基因水平还是蛋白水平的检测, 均显示氯丙嗪可促进卵巢颗粒细胞*FSHR*的表达, 虽然其具体机制尚不明了, 但可以推测*FSHR* mRNA的表达升高与*P450scc*和*P450arom* mRNA的表达上升有一定的相关性。*StAR* mRNA表达水平随氯丙嗪染毒剂量的升高而显著降低, 提示*StAR*可能是氯丙嗪影响颗粒细胞激素分泌的靶位点。

参考文献:

- [1] 冀贞阳. 雌性畜禽应慎用或禁用的抗热应激饲料添加剂[J]. 农业科技与信息, 2004(3): 34.
- [2] 马丽莉, 王建平. 抗精神病药物导致女性闭经240例临床观察[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(4): 436-437.
- [3] 李颖, 高靖捷. 抗精神病药物对女性患者内分泌系统的影响[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(8): 762-763.
- [4] 黄炎坤, 刘健, 王长安, 等. 药物氯丙嗪对麻羽肉种鸡产蛋性能的影响[J]. 家畜生态学报, 2009, 30(2): 33-35.
- [5] 孙丽君, 张梅, 郑英. 氯丙嗪对体外培养人宫颈癌Hela细胞株的生长抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(2): 344-345.
- [6] 李月红, 易建平. 氯丙嗪单独及与顺铂联合对人宫颈癌Hela细胞生长影响的研究[J]. 中华临床医学研究杂志, 2007, 13(4): 435-436.
- [7] Wiklund E D, Catts V S, Catts S V, et al. Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target[J]. Int J Cancer, 2010, 126(1): 28-40.
- [8] 贺军宇, 袁慧, 李芳. F-2毒素对体外培养猪卵巢颗粒细胞的毒害及V-E的解毒效果[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(6): 655-657.
- [9] 吴际, 李潭. 性激素对人卵巢颗粒细胞凋亡的作用[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(3): 41-43.
- [10] Erickson G F. Physiologic basis of ovulation induction[J]. Seminars Reprod Endocrinol, 1996, 14: 287.
- [11] 楼航英, 黄荷凤, 金帆. 超排卵时卵巢对促性腺激素的反应与颗粒细胞促卵泡激素受体的表达[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2002, 31(3): 151-154.
- [12] 张少平, 汪作为, 陈银娣. 影响氯丙嗪与氯氮平血药浓度的相关因素分析[J]. 四川精神卫生, 2006, 19(2): 68-70.

责任编辑: 王赛群