

康梦娇,张伟,赵林华. 围绝经期综合征细胞模型的建立及评价方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 139-146.

Kang MJ, Zhang W, Zhao LH. Research progress in establishment and evaluation of cell models for perimenopausal syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 139-146.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.019

围绝经期综合征细胞模型的建立及评价方法研究进展

康梦娇¹, 张伟^{1,2}, 赵林华^{2*}

(1.甘肃中医药大学,兰州 730000;2.中国中医科学院广安门医院代谢病研究所,北京 100053)

【摘要】 围绝经期综合征(perimenopausal syndrome,PMS)是由雌激素和孕酮等类固醇激素水平下降引起的一系列以自主神经系统功能紊乱,伴有神经心理症状的一组症候群,严重影响女性的身心健康和生活质量。体外构建细胞模型是研究 PMS 的有效方法之一。通过分析研究该疾病的细胞模型,为疾病的治疗提供方向。本文通过检索 PubMed、EMbase、Web of science 数据库中近年来涉及细胞模型应用于 PMS 的相关文献,通过总结并系统分析 PMS 细胞模型建立方法、评价指标及模型特点,对该细胞模型应用于 PMS 的研究进展进行了综述,以期对 PMS 细胞模型合理构建及深入研究提供借鉴与思路。

【关键词】 围绝经期综合征;细胞模型;评价方法;模型特点;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 08-0139-08

Research progress in establishment and evaluation of cell models for perimenopausal syndrome

KANG Mengjiao¹, ZHANG Wei^{1,2}, ZHAO Linhua^{2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

2. Institute of Metabolic Diseases, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053)

【Abstract】 Perimenopausal syndrome is a series of autonomic nervous system dysfunctions caused by decreased levels of steroid hormones such as estrogen and progesterone, which is accompanied by neuropsychological symptoms of a group of syndromes NS seriously affecting women's physical and mental health as well as quality of life. Establishing a cell model *in vitro* is an effective method to study PMS. Analyzing and studying a cell model of this disease may provide treatment guidance. In this review, the related literature involving the application of cell models of PMS in recent years in PubMed, Embase and Web of Science databases were searched, and the establishment method, evaluation indicators, and model characteristics of cell models for PMS are summarized and systematically analyzed. The research progress of cell models of PMS was reviewed to provide a reference and ideas for the reasonable establishment and in-depth study of cell models for PMS.

【Keywords】 PMS; cell model; evaluation method; model features; research progress

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

围绝经期综合征(perimenopausal syndrome, PMS)是指妇女绝经过渡期开始至绝经后所发生的激素水平的变化,由于下丘脑-垂体-卵巢组成的生殖功能调节轴(hypothalamic-pituitary-ovarian axis,

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A01605);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202001)。

【作者简介】 康梦娇(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:方证的规范化及方剂临床应用。E-mail:kkkkmj1212@163.com

【通信作者】 赵林华(1979—),女,研究员,博士生导师,研究方向:内分泌代谢类疾病的中医临床与基础。E-mail:melonzhao@163.com

HPOA)功能衰退,卵巢停止排卵,垂体分泌的卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone,FSH)增高,雌激素缺乏,导致机体神经、精神、心理、内分泌、代谢等各个系统失衡。临床常表现为月经周期改变、血管舒缩(潮热、多汗)、神经精神失调(焦虑、抑郁、记忆力减退、烦躁易怒等)、自主神经功能紊乱(心悸、眩晕、头痛、耳鸣等)、泌尿生殖道萎缩等相关症状,甚至并发骨质疏松、动脉硬化、阿尔茨海默症等疾病^[1]。根据联合国世界卫生组织估计,到2030年,我国的围绝经期女性患者将超过2.1亿,约占总人口的14.29%,严重威胁女性身心健康,因而PMS的防治已成为当前社会应引起广泛关注的医学、经济及社会问题。

目前,研究PMS的方法主要包括动物模型和细胞模型。动物模型能模拟动物体内环境,真实地反

映PMS的病理特征,但存在实验周期长及个体差异大的问题。而细胞模型能克服动物个体差异的影响,通过相对简便而高效的方式模拟体外环境,在微观层面开展高通量的药物筛选,研究PMS的作用机制。随着新型治疗PMS药物的临床需求日益增多,二者结合用于研究该病将会对探索其生理病理机制,以及药物与天然活性成分的筛选、新药研发、临床治疗等有着重要的参考价值。因此,笔者认为在进一步深入研究中应优化现有PMS细胞模型建模方法,系统地引入多维度、多致病因素复合的PMS细胞模型构建方法,以期为模型标准化评价及基于细胞靶向治疗PMS提供有效的思路与借鉴。现将PMS的不同细胞模型的类型及用途进行介绍(表1),并按照其生长特点和培养方法进行详细地说明(表2)。

表1 围绝经期综合征细胞模型的类型及用途
Table 1 Types and uses of cell models for PMS

模型类型 Cell type	来源 Source	细胞形态 Cell morphology	用途 Use
KGN 细胞(人卵巢颗粒细胞)(转移性肿瘤) KGN cells (human ovarian granulosa cells) (metastatic tumors)	女性卵巢及腹膜 Female ovary and peritoneum	低细胞密度状态呈纺锤体形态;高细胞密度状态呈上皮细胞样 Low cell density state in spindle morphology, high cell density state is epithelioid	细胞凋亡、氧化应激、衰老等发病机制研究;药物筛选 Studies on the pathogenesis of apoptosis, oxidative stress, aging, etc; drug screening
SVOG 细胞(非致癌性永生化人卵巢颗粒细胞系) SVOG cells (non-carcinogenic immortalized human ovarian granulosa cell line)	女性卵巢 Female ovary	成纤维细胞样,呈长梭形或多边形,形态不规则 Fibroblast-like, long spindle or polygon with irregular shape	人卵巢功能退化、衰老等状态及卵泡功能研究;激素调节 Studies on human ovarian function degeneration, senescence and follicle function; hormonal regulation
COV434 细胞(人卵巢颗粒肿瘤细胞)(恶性上皮性) COV434 cells (human ovarian granulosa tumor cells) (malignant epithelial)	女性卵巢 Female ovary	上皮细胞样,颗粒状外观,表面光滑,呈现为细长的神经突样结构 Epithelioid, granular appearance, smooth surface, presenting as slender neurite-like structures	卵泡发育的基础研究 Basic research on follicular development
hGL 细胞(人卵巢黄素化颗粒细胞) hGL cells (human ovarian luteinized granulosa cells)	女性卵巢 Female ovary	呈多突形或梭形 Polysyndactyl or fusiform	调节卵巢类固醇生成、促进卵泡发育和颗粒细胞增殖与分化 Regulates ovarian steroidogenesis, promotes follicular development, granulosa cell proliferation and differentiation
A2780 细胞(卵巢子宫内膜腺癌细胞) A2780 cells (ovarian endometrial adenocarcinoma cells)	女性卵巢 Female ovary	上皮细胞样、短梭形纤维样,扁平椭圆 Epithelioid, short fusiform fiber like, flat flat ellipse	调节卵巢功能如抗炎、抗肿瘤、诱导氧化应激等;改善卵巢状态 Regulate ovarian function such as anti-inflammatory, anti-tumor, induction of oxidative stress, etc; improve ovarian status
SKOV3 细胞(卵巢上皮腺癌细胞) SKOV3 cells (ovarian epithelial adenocarcinoma cells)	腹腔积液 Seroperitoneum	上皮细胞样 Epithelioid	卵巢肿瘤疾病机制研究;细胞增殖和分化 Study on disease mechanism of ovarian tumor, cell proliferation and differentiation
干细胞 Stem cells	人体子宫内膜、脂肪、脐带间充质等 Human endometrium, fat, umbilical cord mesenchyme, etc	成纤维细胞样 Fibroblast-like	改善衰老状态及调节卵巢功能 Improve aging state and regulate ovarian function

表 2 不同类型细胞模型的生长特点和培养方法
Table 2 Growth characteristics and culture methods of different types of cell models

模型类型 Cell type	生长特点 Growth characteristic	培养方法 Culture method	造模试剂 Modeling reagent
KGN 细胞 KGN cells	单层贴壁生长 Adherent monoculture	1 : 2 至 1 : 4 传代, 培养基: DMEM/F12 Passage 1 : 2 to 1 : 4, Culture medium: DMEM/F12	H ₂ O ₂ 、D-半乳糖 H ₂ O ₂ , D-galactose
SVOG 细胞 SVOG cells	贴壁生长 Adherent	1 : 2 至 1 : 4 传代, 培养基: DMEM/F12 或 RPMI 1640 Passage 1 : 2 to 1 : 4, Culture medium: DMEM/F12 or RPMI 1640	H ₂ O ₂ 、棕榈酸 H ₂ O ₂ , PA
COV434 细胞 COV434 cells	贴壁生长 Adherent	1 : 2 至 1 : 3 传代, 培养基: RPMI 1640 Passage 1 : 2 to 1 : 3, Culture medium: RPMI 1640	H ₂ O ₂ 、血红素加氧酶 1 H ₂ O ₂ , HO-1
hGL 细胞 hGL cells	贴壁生长、悬浮生长、半贴壁半悬浮 Adherent, suspended, half adherent and half suspended	1 : 2 至 1 : 3 传代, 培养基: DMEM/F12 Passage 1 : 2 to 1 : 3, Culture medium: DMEM/F12	H ₂ O ₂ 、TGF-β 家族 H ₂ O ₂ , TGF-β family
A2780 细胞 A2780 cells	单层生长,并悬浮在旋转培养器中 Monoculture, and suspended in a rotary incubator	1 : 3 至 1 : 6 传代, 培养基: RPMI 1640 Passage 1 : 3 to 1 : 6, Culture medium: RPMI 1640	二氢丹参酮 1、铂剂 DHT, platinum
SKOV3 细胞 SKOV3 cells	贴壁生长、悬浮生长、半贴壁半悬浮 Adherent, suspended, half adherent and half suspended	1 : 2 至 1 : 6 传代, 培养基: 高葡萄糖 DMEM Passage 1 : 2 to 1 : 6, Culture medium: high glucose DMEM	植物衍生物、芳香酸 衍生物、SNAI2 基因等 Plant derivative, aromatic acid derivative, SNAI2 gene, etc

1 细胞模型的建立及评价指标

1.1 KGN 细胞

KGN 细胞来源于女性卵巢及腹膜,是一种类固醇致人颗粒状肿瘤细胞系,能够分泌孕烯酮和黄体酮,为贴壁单层生长,培养的细胞在低细胞密度状态下表现为纺锤体形状,在高细胞密度状态下则转变为上皮细胞样形状^[2]。多因卵巢过度刺激导致颗粒细胞发生癌变,并与卵母细胞的发育密切相关。而卵母细胞影响颗粒细胞功能的途径主要是旁分泌^[3],以旁分泌的方式影响卵丘颗粒细胞(cumulus cells,CCs)增殖,作用于维持卵泡内环境的稳定,调节卵泡发育,影响颗粒细胞的基因表达和功能状态。实验证明 circASPH 的过表达促进了 KGN 细胞的增殖并抑制了 KGN 细胞凋亡^[4]。通过 RT-qPCR 法测定 DLEU1 在卵巢组织中的表达,验证了该基因可在卵巢衰老性疾病中以过表达的方式促进 KGN 细胞凋亡^[5]。有研究发现美洲大蠊(*Periplaneta americana*(L.))的小肽能改善过氧化氢(H₂O₂)诱导的 KGN 细胞凋亡^[6]。越来越多的证

据表明,卵巢颗粒细胞功能障碍是卵巢相关疾病的重要致病因素,在围绝经期相关症状的改善方面能够发挥积极作用。故研究常选用该细胞系建立 PMS 模型,造模试剂包括 H₂O₂、D-半乳糖等,其模型主要机制涉及细胞凋亡、氧化应激损伤等方面。此外,该细胞高表达芳香化酶(aromatase,AR),可用于具有雌激素样作用的化合物和中药的筛选。

1.2 SVOG 细胞

SVOG 细胞为非致癌永生化人颗粒细胞系,来源于女性卵巢,呈贴壁样生长,该细胞先前通过用 SV40 大 T 抗原转染人颗粒细胞(从接受体外受精的患者获得)作为细胞模型而产生的^[7]。SVOG 细胞保留类固醇生成活性,然而细胞中促卵泡激素受体(follide-stimulating hormone receptor,FSHR)受体和 AR 的表达水平相对较低^[8]。SVOG 细胞已被用于研究人卵巢状态和人粒状细胞的生物学功能和分子机制。通过运用 PI3Ks 非选择性抑制剂进行处理,获取 SVOG 细胞进行 RNA 和蛋白质提取,可证明生长反应蛋白 1(EGR1)可上调激素水平,刺激卵巢颗粒细胞的调节^[9]。应用棕榈酸(palmitic acid,

PA) 诱导 SVOG 细胞模型证明了内源性激素—褪黑激素对女性生殖系统,尤其是卵巢功能可发挥积极作用^[10]。有研究发现骨形态发生蛋白-6 (bone morphogenetic protein 6, BMP-6) 通过上调 SVOG 细胞中的结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 水平来增加分化簇 68 (cluster of differentiation 68, CD68) 的表达,而 BMP6 和 CTGF 是正常卵泡发育和黄体功能所需的关键生长因子,CD68 是巨噬细胞的卵巢内标志物,可调节黄体的生理性退化,对卵巢功能的调节起重要作用^[11]。因此,SVOG 细胞在围绝经期及卵巢功能退化、衰老等状态的研究中能够发挥显著作用。故研究可选用该细胞系建立 PMS 模型,造模试剂仍在探索中,如可用 PA 等,其模型主要机制涉及激素调节、生殖状态等方面。

1.3 COV434 细胞

COV434 细胞来源于女性卵巢,是从原发性人类颗粒细胞肿瘤中建立,其形态为颗粒状外观,表面光滑,呈现为细长的神经突样结构,细胞核深染,核仁小^[12],常用于卵泡发育的基础研究。将咖啡酸与三苯基膦 (TPP),4-吡啶鎓或异喹啉进行结合而形成的 3 种新的化合物 (Mito6_TPP, Mito6_picol 和 Mito6_isoq) 于 COV434 细胞上进行测试,结果证明了这些化合物可选择性诱导肿瘤细胞活力降低,诱导细胞凋亡,且具有抗氧化的特性^[13]。BBOX1-AS1 可通过海绵 miR-146b 增加 COV434 颗粒细胞的凋亡,从而抑制卵巢功能,造成卵巢衰老^[14]。蛋白激酶 TOPK 通过调节 p53/sirtuin 1 (SIRT1) 轴来抑制 H₂O₂ 诱导的 COV434 细胞凋亡,并证明了 TOPK 可能是一种用于改善卵泡发育或卵母细胞成熟的新靶分子^[15]。铜纳米颗粒 (CuNP) 以剂量和时间依赖性的方式对 COV434 细胞具有细胞毒性作用,而血红素加氧酶 1 (HO-1) 是一种适应性蛋白,在维持氧化还原稳态和防止细胞凋亡方面起着重要作用,可以通过减少氧化应激来防止 CuNP 诱导的细胞毒性,并证实 HO-1 的上调有助于预防和治疗纳米颗粒引起的卵巢功能障碍^[16]。通过对 COV434 体外生物学功能的研究分析,发现 COV434 中的 circDDX10 可以显著上调细胞凋亡相关因子的表达,降低细胞增殖活性,抑制类固醇激素合成相关因子的表达,并抑制雌二醇 (estradiol, E₂) 的合成;相反, circDDX10 的过度表达具有相反的效果^[17]。因此, circDDX10 可能通过影响 COV434 细胞的增

殖和凋亡和类固醇激素的合成来参与卵巢功能的调节。因此, COV434 细胞可应用于围绝经期及卵巢功能障碍等疾病中。故研究可选用该细胞系建立 PMS 模型,造模试剂包括 H₂O₂、HO-1 等,其模型主要机制涉及细胞凋亡、抗氧化等方面。

1.4 hGL 细胞

hGL 细胞来源于女性卵巢,从接受卵母细胞取出的妇女所收集的滤泡抽吸物中通过密度离心纯化而获得,卵泡抽吸后立即从卵泡液中分离卵丘-卵母细胞复合体^[18],该细胞具有分泌特性,对卵母细胞的最终成熟和黄体的有效功能至关重要。有研究发现在 hGL 细胞中,生长分化因子 8 (growth differentiation factor 8, GDF8) 可能在调节细胞对促性腺激素的反应性和调节卵巢类固醇产生方面发挥重要作用,最有可能作为黄体生成抑制剂^[19]。体外研究发现局部产生的 Activin A 通过上调 hGL 细胞中透明质酸合酶 2 (hyaluronan synthase 2, HAS2) 的表达来增加透明质酸的产生,并且还促进了透明质酸结合蛋白 versican 的表达,从而改善卵泡发育,调节卵巢功能^[20]。在原代人 hGL 细胞中的体外实验发现通过刺激 hGL 细胞中 AR 的表达和 E₂ 的产生,证明了 GDF-8 可以以自分泌和/或旁分泌的方式在卵巢中表达并调节各种卵巢功能^[21]。原代人 hGL 细胞培养证明了在 hGL 细胞和人卵泡液中生长分化因子 11 (growth differentiation factor 11, GDF11) 对 StAR 表达的抑制作用由 ALK5 及其下游介质 SMAD3 所介导,说明了 hGL 细胞在人卵巢功能和卵巢类固醇发生的调节中可发挥重要作用^[22]。而早有研究已证明 TGF- β 家族不同成员在调节颗粒细胞生长与分化、类固醇生成、卵丘细胞扩增、卵泡发生和卵母细胞发育及成熟中具有广泛的作用,因此对人卵巢功能的调节至关重要。此外,经研究发现骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 可通过上调 hGL 细胞中 FSHR 和 E₂ 水平的表达来促进卵泡生长,还能够下调类固醇急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR) 表达并抑制促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 受体和黄体酮 (progesterone, P₄) 的产生,此外,还揭示了骨形态发生蛋白-9 (bone morphogenetic protein 9, BMP-9) 在调节卵巢类固醇生成、卵泡发育和黄体功能方面起着重要的作用^[23]。因此, hGL 细胞可应用于围绝经期及卵巢衰老等疾病中。故研究可选用该细胞系建立 PMS 模型,其主要机制涉及调节卵

巢类固醇生成、促进卵泡发育和颗粒细胞增殖与分化等方面。

1.5 A2780 细胞

A2780 细胞来源于女性卵巢,从未经治疗的卵巢子宫内腺癌患者的肿瘤组织中建立的,呈单层贴壁生长,细胞形态为上皮样、短梭形纤维样,扁平椭圆^[24]。二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I, DHT) 作为丹参中的一种生物活性化合物,可通过泛素化介导的 Nrf2 抑制细胞活力,诱导细胞凋亡,增加细胞中 ROS 的积累,降低线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 并激活氧化应激,从而表现出抗卵巢肿瘤作用,在调节卵巢状态中发挥作用^[25]。从海参 (*Thelenota ananas*) 中分离出来的三萜糖苷 (stichoposide C, STC), 具有抗增殖活性、诱导细胞周期停滞和促进细胞凋亡作用,可通过抑制卵巢癌细胞中的 AKT / mTOR 信号通路诱导自噬,发挥抗癌作用^[26]。与非甾体抗炎药 (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) 偶联的抗肿瘤铂 (II) 剂合成的新型复合物可表现出比其母体铂剂更强的抗肿瘤活性、抗炎和耐药性。如合成物 IA-1 能够表现出最佳的细胞毒性和比顺铂更强的抗肿瘤活性,更为显著地诱导 DNA 损伤和 ROS 生成,导致 A2780 细胞凋亡^[27]。因此, A2780 细胞多用于卵巢肿瘤等疾病中,因其在调节卵巢功能中具有抗炎、抗肿瘤、诱导氧化应激等功能,故研究也可选用该细胞系建立 PMS 模型,发挥该细胞在改善卵巢状态上的积极作用。

1.6 SKOV3 细胞

SKOV3 细胞,从卵巢上皮性癌患者的腹腔积液分离可得到,呈贴壁生长,细胞形态表现为上皮样^[28]。该细胞对肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和细胞毒性药物 (包括白喉毒素、顺铂和阿霉素等) 均耐受。SNAI2 通过诱导铁死亡 (ferroptosis) 来抑制 SKOV3 细胞活力、迁移、侵袭和促进细胞凋亡,从而抑制卵巢癌体内的肿瘤生长^[29]。天然植物衍生物 α -山竹素 (α -Mangostin) 与顺铂联合治疗 A2780、SKOV3 细胞可以降低顺铂浓度,同时保持相同的细胞毒性作用,达到更为优化的治疗效果^[30]。经设计合成的新型人参皂苷脂肪酸和芳香酸衍生物,均能够通过 ROS 依赖性线粒体通路诱导 SKOV3 细胞凋亡,发挥细胞毒性作用,可作为治疗卵巢癌的抗癌剂^[31]。因此, SKOV3 细胞由于在卵巢肿瘤疾病中具有抗肿瘤、促进凋亡等作

用,故研究也可选用该细胞系建立 PMS 模型,减少卵巢功能损伤。

1.7 干细胞

有研究证明将人体子宫内膜干细胞注入小鼠体内后,发现干细胞在小鼠卵巢中至少能存活 14 d,镜下观察卵泡数目增加,且血清中抑制素 B (Inhibin-B, INH B)、抑制素 α/β 的表达增高,卵巢功能有所改善^[32]。用脂肪干细胞治疗卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 模型小鼠后,发现卵巢内卵泡数目增加,而且颗粒细胞凋亡减少^[33]。人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 衍生的外泌体携带的 miR-21 可下调肿瘤抑制因子 1 (large tumor suppressor gene 1, LATS1), 从而减少磷酸化的赖氨酰氧化酶样 2 (lysyl oxidase-like 2, LOXL2) 和 Yes 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP), 最终促进卵巢颗粒细胞中雌激素的分泌^[34]。因此,干细胞在围绝经期相关疾病中可发挥改善衰老状态及调节卵巢功能的积极作用。

2 研究模型应用

2.1 细胞炎症

KGN 细胞经油酸刺激后可上调白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-8 (IL-8) 的转录水平,诱导 ROS 产生和炎症小体活化,而当处于围绝经期时状态时代谢紊乱,引起脂肪酸水平的升高,在转录水平和翻译后处理中则会诱导卵巢炎症^[35]。而该细胞内炎症被代谢内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激激活后,则会破坏线粒体结构和功能,从而诱导氧化应激,反过来影响细胞代谢^[36]。COV434 人颗粒细胞系表达 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLR) 并构成性分泌 IL-8,并在转录水平上对病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 产生炎症反应^[37]。人脐带间充质干细胞移植可以通过旁分泌机制的抗凋亡和抗炎作用来减少卵巢损伤并改善化疗诱导的体外凋亡和炎症^[38]。注射人类内皮祖细胞 (hEPCs) 可减轻炎症细胞因子和不良凋亡因子的水平,降低卵巢中的内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激^[39]。因此应用干细胞疗法来恢复受伤组织的功能和结构,从而调节炎症、细胞凋亡和 ER 应激可为未来减轻生殖衰老和功能障碍是一种有效方法。

2.2 细胞增殖与发育

己糖激酶 (hexokinase-2, HK2) 是 miR-143-3p 和

miR-155-5p 在滤泡液 (FF) 衍生的外泌体介导的 KGN 细胞糖酵解调节中的重要介质,糖酵解过程中的腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 产生减少,加速了 KGN 细胞的凋亡,导致卵泡发育的能量供应不足,从而介导了滤泡发育不良^[40]。养精种玉汤可通过抑制由 H_2O_2 诱导的 KGN 细胞内 ROS 和 Ca^{2+} 来增强线粒体活性,并增加 MMP 和 ATP 含量来促进 E_2 生物合成和能量代谢,结果表明养精种玉汤在保护卵巢颗粒细胞和细胞增殖方面发挥有益作用^[41]。另有研究发现,CTGF 的上调对由 GDF8 诱导的 SVOG 细胞增殖有抑制作用^[42]。用 FSH 刺激 AR 后, E_2 的合成和分泌增加,后在补充 FCS 的培养基中加入 FSH 则刺激了 COV434 颗粒细胞的增殖,研究证明了永生化的颗粒细胞系 COV434 可能有助于卵泡发育。FSHR 结合抑制剂 FRBI-8 充当 FSH 拮抗剂,并影响 FSH 介导的 COV434 细胞信号传导和增殖^[43]。TGF β 1 通过 TGF β 1 型受体依赖性抑制半胱天冬酶 (caspase) 活性和抑制聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARPs) 裂解来提高 COV434 细胞活力,从而促进细胞增殖^[44]。

2.3 细胞衰老与凋亡

花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 可通过改变细胞线粒体分布和钙离子浓度,显著降低抗氧化酶的总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 和活性,增加丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、ROS 和超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 在 KGN 细胞中的水平,从而损害 KGN 细胞的分泌和线粒体功能并诱导其凋亡^[45]。甘草苷也可在 KGN 细胞中发挥抗增殖和细胞凋亡的诱导作用^[46]。甲状腺激素 (thyroid hormones, THs) 通过抑制 Bax 基因表达和 Caspase-3 的细胞凋亡信号通路,同时保持 PI3K/AKT 通路的活性,来实现在 hGL 细胞中成为有效的抗凋亡剂^[47]。应用 H_2O_2 处理 COV434 细胞,证明了 H_2O_2 可通过剂量和时间依赖性的方式诱导颗粒细胞凋亡^[48]。miR-23a 可通过调节细胞周期来影响 COV434 细胞的增殖,通过靶向 FGD4 表达来调节 CDC42/PAK-1 信号通路,诱导细胞周期停滞,最终影响 COV434 细胞的凋亡^[49]。KGN 和 COV434 细胞中的 miR-29a 过表达抑制了细胞增殖,阻止了细胞周期进展。miR-99a 可以通过靶向 IGF-1R 来减弱增殖并促进 COV434 细胞凋亡。miR-431 可减弱 AKT 活化,损害 FSH 诱导的 COV434 细胞增殖和滤

泡生长,从而调节颗粒细胞功能^[50]。

3 展望与小结

综上,PMS 细胞模型是目前研究围绝经期及卵巢相关疾病的重要方法,具有来源丰富、干扰因素小、实验条件易控制且评价机制灵活等特点。PMS 细胞模型可供选择的造模试剂和细胞株种类较多,其造模试剂依据诱导机制不同可应用 PA、D-半乳糖、 $HO-1$ 、 H_2O_2 等;细胞主要包括 KGN、SVOG、COV434、hGL 等。该类细胞模型主要研究以下机制:炎症反应,检测细胞炎症因子,如 TNF- α ;细胞氧化应激损伤,检测细胞 ROS、MDA、SOD、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 以及其他氧化指标;细胞凋亡,检测其凋亡蛋白、凋亡率等。

笔者认为,学者可根据研究基础和目的,选择适宜的细胞株和造模试剂建立 PMS 细胞模型。此外,根据围绝经期相关疾病,如围绝经期骨质疏松、围绝经期肥胖、围绝经期潮热等,可以在选用特定原代细胞和细胞系的基础上,制备低雌激素环境进行研究探索。低雌激素环境的模拟可以选择雌激素阴性血清、雌激素受体抑制剂和双侧卵巢切除术后血清。但细胞模型与人类围绝经期雌激素水平的变化不同,故此细胞模型的研究结果不能替代临床试验,只能在机制层面作一定程度的探索。基于目前针对 PMS 的治疗取得的成果,可采用合适的细胞模型深入研究其作用机制,以期为模型标准化评价及 PMS 治疗的有效途径及策略提供思路。

参考文献:

- [1] 杨慧霞,狄文. 妇产科学 [M]. 北京:人民卫生出版社; 2016.
- [2] Sun L, Tian H, Xue S, et al. Circadian clock genes REV-ERBs inhibits granulosa cells apoptosis by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy in polycystic ovary syndrome [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 658112.
- [3] Eppig JJ. Reproduction: oocytes call, granulosa cells connect [J]. Curr Biol, 2018, 28(8): R354-R356.
- [4] Wu G, Xia J, Yang Z, et al. CircASPH promotes KGN cells proliferation through miR-375/MAP2K6 axis in Polycystic Ovary Syndrome [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(6): 1817-1825.
- [5] Zheng C, Liu S, Qin Z, et al. LncRNA DLEU1 is overexpressed in premature ovarian failure and sponges miR-146b-5p to increase granulosa cell apoptosis [J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 151.
- [6] Wang Q, Fu R, Cheng H, et al. Analysis of the resistance of

- small peptides from *Periplaneta americana* to hydrogen peroxide-induced apoptosis in human ovarian granular cells based on RNA-seq [J]. *Gene*, 2022, 813: 146120.
- [7] Li SJ, Chang HM, Xie J, et al. The interleukin 6 trans-signaling increases prostaglandin E2 production in human granulosa cells [J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(5): 1189–1204.
 - [8] Fang L, Chang HM, Cheng JC, et al. TGF- β 1 downregulates StAR expression and decreases progesterone production through Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11): E2234–E2243.
 - [9] Sun L, Tian H, Xue S, et al. Tie1 contributes to the development of ovarian hyperstimulation syndrome under the regulation of EGR1 in granulosa cells [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(1): 81–90.
 - [10] Guo R, Zheng H, Li Q, et al. Melatonin alleviates insulin resistance through the PI3K/AKT signaling pathway in ovary granulosa cells of polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(1): 100594.
 - [11] Zhang XY, Chang HM, Yi Y, et al. BMP6 increases CD68 expression by up-regulating CTGF expression in human granulosa-lutein cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 536: 111414.
 - [12] Karnezis AN, Chen SY, Chow C, et al. Re-assigning the histologic identities of COV434 and TOV-112D ovarian cancer cell lines [J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 160(2): 568–578.
 - [13] Castêlôa M, Moreira-Pinto B, Benfeito S, et al. *In vitro* effects of mitochondria-targeted antioxidants in a small-cell carcinoma of the ovary of hypercalcemic type and in type 1 and type 2 endometrial cancer [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(4): 800.
 - [14] Yu Y, Zhang Q, Sun K, et al. Long non-coding RNA BBOX1 antisense RNA 1 increases the apoptosis of granulosa cells in premature ovarian failure by sponging miR-146b [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6092–6099.
 - [15] Park JH, Park SA, Lee YJ, et al. TOPK inhibition accelerates oxidative stress-induced granulosa cell apoptosis via the p53/SIRT1 axis [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1923–1937.
 - [16] Zou L, Cheng G, Xu C, et al. Copper nanoparticles induce oxidative stress via the heme oxygenase 1 signaling pathway *in vitro* studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1565–1573.
 - [17] Cai H, Chang T, Li Y, et al. Circular *DDX10* is associated with ovarian function and assisted reproductive technology outcomes through modulating the proliferation and steroidogenesis of granulosa cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 9592–9612.
 - [18] Cheng JC, Fang L, Li Y, et al. Melatonin stimulates aromatase expression and estradiol production in human granulosa-lutein cells: relevance for high serum estradiol levels in patients with ovarian hyperstimulation syndrome [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(8): 1341–1350.
 - [19] Chang HM, Fang L, Cheng JC, et al. Effects of growth differentiation factor 8 on steroidogenesis in human granulosa-lutein cells [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(2): 520–528.
 - [20] Tian S, Zhang H, Chang HM, et al. Activin A promotes hyaluronan production and upregulates versican expression in human granulosa cells [J]. *Biol Reprod*, 2022, 107(2): 458–473.
 - [21] Fang L, Yan Y, Wang S, et al. High ovarian GDF-8 levels contribute to elevated estradiol production in ovarian hyperstimulation syndrome by stimulating aromatase expression [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2338–2347.
 - [22] Jia Q, Liu B, Dang X, et al. Growth differentiation factor-11 downregulates steroidogenic acute regulatory protein expression through ALK5-mediated SMAD3 signaling pathway in human granulosa-lutein cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 34.
 - [23] Luo X, Chang HM, Yi Y, et al. Bone morphogenetic protein 2 inhibits growth differentiation factor 8-induced cell signaling via upregulation of gremlin2 expression in human granulosa-lutein cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 173.
 - [24] 刘娟, 刘星辰, 魏宝宝, 等. 稳定过表达 XAF1 基因对 A2780 卵巢癌细胞生物学功能的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2021(5): 760–766.
 - [25] Sun C, Han B, Zhai Y, et al. Dihydropyranone I inhibits ovarian tumor growth by activating oxidative stress through Keap1-mediated Nrf2 ubiquitination degradation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 220–235.
 - [26] Liu F, Tang L, Tao M, et al. Stichopside C exerts anticancer effects on ovarian cancer by inducing autophagy via inhibiting AKT/mTOR pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2022, 15: 87–101.
 - [27] Zang J, Zhang B, Wang Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of antitumor platinum(II) agents conjugated with non-steroidal anti-inflammatory drug species [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 120: 105633.
 - [28] Peng P, Yan Y, Keng S. Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(3): 749–762.
 - [29] Jin Y, Chen L, Li L, et al. SNAI2 promotes the development of ovarian cancer through regulating ferroptosis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6451–6463.
 - [30] Borzdziłowska P, Bednarek I. The effect of α -mangostin and cisplatin on ovarian cancer cells and the microenvironment [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1116.
 - [31] Han L, Liu J, Yang Y, et al. Pseudo-sapogenin DQ 3-maleate derivative induces ovarian carcinoma cell apoptosis via mitochondrial pathway [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2022, 70(6): 427–434.
 - [32] Wang S, Yu L, Sun M, et al. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 690491.
 - [33] Sun M, Wang S, Li Y, et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(4): 80.
 - [34] Cai JH, Sun YT, Bao S. HucMSCs-exosomes containing miR-21 promoted estrogen production in ovarian granulosa cells via

- LATS1-mediated phosphorylation of LOXL2 and YAP [J]. Gen Comp Endocrinol, 2022, 321–322: 114015.
- [35] Lai Y, Ye Z, Mu L, et al. Elevated levels of follicular fatty acids induce ovarian inflammation via ERK1/2 and inflammasome activation in PCOS [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(8): 2307–2317.
- [36] Liu Y, Liu H, Li Z, et al. The release of peripheral immune inflammatory cytokines promote an inflammatory cascade in PCOS patients *via* altering the follicular microenvironment [J]. Front Immunol, 2021, 12: 685724.
- [37] Price JC, Cronin J, Sheldon IM. Toll-like receptor expression and function in the COV434 granulosa cell line [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68(3): 205–217.
- [38] Deng T, He J, Yao Q, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation via a paracrine mechanism [J]. Reprod Sci, 2021, 28(6): 1718–1732.
- [39] Kim GA, Lee Y, Kim HJ, et al. Intravenous human endothelial progenitor cell administration into aged mice enhances embryo development and oocyte quality by reducing inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(12): 1905–1913.
- [40] Cao J, Huo P, Cui K, et al. Follicular fluid-derived exosomal miR-143-3p/miR-155-5p regulate follicular dysplasia by modulating glycolysis in granulosa cells in polycystic ovary syndrome [J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 61.
- [41] Liu J, Shi D, Ma Q, et al. Yangjing Zhongyu decoction facilitates mitochondrial activity, estrogenesis, and energy metabolism in H₂O₂-induced human granulosa cell line KGN [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 295: 115398.
- [42] Chang HM, Fang Y, Liu PP, et al. Connective tissue growth factor mediates growth differentiation factor 8-induced increase of lysyl oxidase activity in human granulosa-lutein cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 434: 186–198.
- [43] Navalakhe RM, Jagtap DD, Nayak SU, et al. Effect of FSH receptor-binding inhibitor-8 on FSH-mediated granulosa cell signaling and proliferation [J]. Chem Biol Drug Des, 2013, 82(2): 178–188.
- [44] Mansouri-Attia N, Tripurani SK, Gokul N, et al. TGFβ signaling promotes juvenile granulosa cell tumorigenesis by suppressing apoptosis [J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(11): 1887–1898.
- [45] Ma Y, Zheng L, Wang Y, et al. Arachidonic acid in follicular fluid of PCOS induces oxidative stress in a human ovarian granulosa tumor cell line (KGN) and upregulates GDF15 expression as a response [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 865748.
- [46] Cui X, Zhou S, Lin Y. Protective effects of liquiritin on polycystic ovary syndrome through modulating ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis via miR-206/PI3K/AKT pathway [J]. Cytotechnology, 2022, 74(3): 385–393.
- [47] Di Paolo V, Mangialardo C, Zacà C, et al. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival [J]. J Endocrinol Invest, 2020, 43(6): 821–831.
- [48] Yang H, Xie Y, Yang D, et al. Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma [J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25310–25322.
- [49] Lin J, Huang H, Lin L, et al. miR-23a induced the activation of CDC42/PAK1 pathway and cell cycle arrest in human cov434 cells by targeting FGD4 [J]. J Ovarian Res, 2020, 13(1): 90.
- [50] Yang L, Lv Q, Liu J, et al. miR-431 regulates granulosa cell function through the IRS2/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Reprod Dev, 2020, 66(3): 231–239.

[收稿日期]2022-08-18