

分类号_____

论文编号_____

密 级_____

海军军医大学

硕士学位论文

Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应及 机制研究

The Radioprotection and Mechanism of Zymosan-A on Ovarian Injury

研究生姓名： 余意可 学号： 20201234

指导教师： 蔡圣芸 副教授 海军军医大学第一附属医院

学科、专业： 妇产科学

学位类型： 专业学位

答辩日期： 2023年6月

二〇二三年十二月

密级_____

海军军医大学

硕士学位论文

Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应及 机制研究

The Radioprotection and Mechanism of Zymosan-A on Ovarian Injury

研究生姓名：余意可 学号：20201234

指导老师：蔡圣芸 副教授 海军军医大学第一附属医院妇产科

学科专业：妇产科学

学位类型：专业学位

答辩委员会主席：卢建 教授 海军军医大学基础部

委员：刘聪 教授 海军军医大学海军医学系

汪晨 副教授 上海交通大学附属瑞金医院

张志刚 教授 上海市肿瘤研究所

蔡全才 教授 海军军医大学

答辩日期：2023年06月01日

2023年12月01日

目 录

缩略词表.....	15
前言.....	18
参考文献.....	23
第一部分: 放射性卵巢损伤模型的构建及 ZYMOSAN-A 药物安全性研究.....	28
一、前言.....	28
二、材料和方法.....	29
三、实验结果.....	37
四、小结.....	44
五、讨论.....	44
参考文献.....	46
第二部分: ZYMOSAN-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究.....	49
一、前言.....	49
二、材料和方法.....	49
三、实验结果.....	62
四、小结.....	72
五、讨论.....	72
参考文献.....	76
第三部分: ZYMOSAN-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨.....	78
一、前言.....	78
二、材料和方法.....	78
三、实验结果.....	86
四、小结.....	93
五、讨论.....	94
参考文献.....	95
全文总结.....	97
综述 放射治疗对卵巢功能影响的机制及防护研究进展.....	100
参考文献.....	106

摘要

一、研究背景

包括放疗在内的肿瘤综合诊疗措施的不断发展,使得肿瘤患者的生存率得到了极大的提高,也对肿瘤幸存者的生活质量提出了更高的要求。卵巢作为维持女性正常生理功能的重要器官,对放射线十分敏感,较低剂量的放射线照射就会造成严重的不良结局,包括性腺功能减退以及随之而来的生育力降低甚至丧失。

越来越多的肿瘤科医生及肿瘤患者的随访人员开始致力于肿瘤患者生育力保留的宣传和研究,“Oncofertility”在此境况下应运而生,并逐渐发展成新兴热门话题。目前在肿瘤患者生育力保留实践过程中的具体措施主要包含以下三类,分别是物理防护、生物防护、药物防护。物理防护因其作用有限,且不能有效避免类似于头颅放疗等影响下丘脑-垂体-性腺轴,进而影响卵巢功能,效果不甚理想。生物防护措施包括胚胎冷冻保存和移植、卵母细胞冻存和移植、卵巢组织冻存和移植及卵巢移植等,受限于技术开展的范围、技术操作的难度以及肿瘤治疗与卵巢刺激的时间冲突,乃至经济原因等,现阶段难以大范围开展。药物防护因其操作便利,时间及经济花费较少,逐渐得到了学者们的关注,并取得一定进展。

在药物防护方面,目前国际上效果最佳的药物为美国制备的 WR-2721,但毒性较大,副反应较多,在一定程度上限制了其的使用。国内目前的辐射损伤防治药物包括雌激素类和茜草提取物等,在实践过程中均被证实疗效不佳。正处于研究阶段的多数辐射损伤防治药物存在效应不明确、机制不清晰、毒性反应大等缺点。因此,亟需开发高效低毒的、针对电离辐射作用新靶点的药物。

近 15 年以来,有多项研究证实了 TLRs 受体及其配体在抗辐射损伤中发挥着重要作用,TLRs 受体家族在抗辐射损伤研究领域得到了极大关注,逐渐成为该领域研究的新热点。

前期,我们对 TLRs 通路相关配体进行了预实验筛选及后续的实验验证,最终得到一种靶向 TLR2 受体的化合物 Zymosan-A, Zymosan-A 中文全称酵母多糖-A,是一类通过 β -1,3 糖苷键连接的葡聚糖。我们的相关研究结果已经证实了其可以对肠道消化系统、骨髓造血系统发挥抗辐射损伤作用,并对其毒性进行了初步探索,未

发现明显急性毒性的相关报道。关于其是否可以对卵巢发挥抗辐射损伤作用，目前国内外尚未见报道。基于此，我们将首先通过对该化合物的毒性进一步研究来验证其在动物体内的安全性，在构建出较合适的卵巢放射性损伤模型的情况下，通过一系列体内外实验来探讨 Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究，最后通过 RNA seq 筛选出 Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的潜在机制并初步验证，为卵巢的抗辐射损伤研究提供新的研究思路和干预途径。

二、研究目的

1. 构建一个放射性卵巢损伤动物模型。
2. 系统性研究 Zymosan-A 对放疗致卵巢损伤的防护效应。
3. 对 Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的机制进行初步探索，筛选出潜在的放射性卵巢损伤防护作用通路。
4. 通过对卵巢辐射损伤防治药物研究，为育龄期女性肿瘤患者的生育力保存提供新的理论和实践支持。

三、研究内容和方法

1. 放射性卵巢损伤模型的构建及 Zymosan-A 药物安全性研究

(1) 放射性卵巢损伤的模型构建：模拟临床盆腔放疗过程，通过给予小鼠不同剂量和/或不同次数的 γ 射线盆腔局部照射，一方面运用 ELISA 方法检测盆腔照射结束后小鼠的卵巢性激素水平，从卵巢内分泌功能层面筛选出一个较为合适的放射性卵巢损伤模型的照射剂量及照射次数。另一方面，将辐照雌鼠经促排卵后与性成熟期雄鼠合笼，通过在计数妊娠小鼠的胎儿数量从卵巢生殖功能层面筛选出一个较为合适的放射性卵巢损伤模型的照射剂量及照射次数。结合上述两方面结果，综合评估，筛选出一个合适的照射剂量及照射次数，构建一个放射性卵巢损伤动物模型。

(2) Zymosan-A 药物安全性研究：查阅文献了解既往相关研究所用的药物浓度，腹腔注射同等剂量的该药物，通过 ELISA 方法检测给药后小鼠的血清丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶水平来评估该药物的肝脏毒性，通过检测小鼠血清肌酐值来评估该药物的肾毒性，并在小鼠卵巢内分泌及生殖功能层面开展相关研究来评估其生殖毒性。

2. Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究

(1) Zymosan-A 对辐照后小鼠卵巢组织重量及卵巢器官系数的影响：辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，在辐照后某一时间点称量各组小鼠的卵巢湿重及小鼠体重。

(2) Zymosan-A 对辐照后小鼠动情周期的影响：辐照前给予小鼠 Zymosan-A 预处理，在辐照后对各组小鼠进行阴道脱落细胞学检查。

(3) Zymosan-A 对辐照后小鼠卵巢激素水平的影响：在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，通过 ELISA 方法检测辐照后各组小鼠的卵巢性激素水平变化。

(4) Zymosan-A 对辐照后小鼠卵巢卵泡成熟的影响：辐照前给予小鼠 Zymosan-A 预处理，在辐照后某一时间点通过解剖得到小鼠卵巢组织，通过对小鼠卵巢组织 HE 切片上各级卵泡数量计数，并统计总卵泡数量。

(5) Zymosan-A 对辐照后小鼠卵巢生殖功能的影响：辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，辐照结束后将雌鼠经促排卵后与性成熟期雄鼠合笼，在妊娠后某一时间点解剖小鼠子宫，计数各组小鼠子宫内胚胎数量。

(6) Zymosan-A 对辐照后小鼠子代体重的影响：在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，在辐照后将雌鼠经促排卵后与性成熟期雄鼠合笼，在出生后多个时间点称量各组小鼠后代的体重。

(7) Zymosan-A 对辐照后小鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响：在照射前给予细胞 Zymosan-A 预处理，在辐照后运用 CCK-8 检测小鼠卵巢颗粒细胞的增殖情况。

(8) Zymosan-A 对辐射后小鼠卵巢颗粒细胞存活率的影响：在照射前给予细胞 Zymosan-A 预处理，在辐照后某一时间点统计细胞克隆形成数量。

(9) Zymosan-A 对辐射后小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响：在照射前给予细胞 Zymosan-A 预处理，在辐照后某一时间点通过流式细胞术来统计各组细胞凋亡情况。

3. Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨

(1) Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的差异基因筛选：辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，在辐照后某一时间点解剖得到小鼠卵巢组织，并进行高通量测序。

(2) 通过构建 TLR2 KO (Knockout) 小鼠，并在 TLR2 KO 小鼠体内开展研究

验证 TLR2 受体在放射性卵巢损伤防护中的作用。

(3) 差异表达基因的 KEGG 功能富集分析：通过在公共数据分析平台按照操作指南对前述差异基因进行 KEGG 分析。

(4) 卵巢组织测序结果相关差异表达基因的定量 PCR 验证：在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，辐照后某一时间点解剖得到小鼠卵巢组织并进行 RNA 抽提，按照 RT-PCR 操作指南完成相关筛选出来的差异基因表达量的验证。

(5) 靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路相关蛋白表达量验证：在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，辐照后某一时间点解剖得到小鼠卵巢组织并进行蛋白提取，运用 Western-blot 方法评估相应蛋白表达量。

四、研究结果

1. 放射性卵巢损伤模型的构建及 Zymosan-A 药物安全性研究

(1) 通过在小鼠卵巢内分泌功能层面及生殖功能层面开展研究，并对两部分结果综合分析，初步证实了小鼠卵巢放射性损伤模型适当的造模条件为 2Gy 单次盆腔局部照射。

(2) 前期相关辐射损伤防护研究开展过程中所用的 Zymosan-A 给药条件：小鼠 (50mg/kg)、细胞 (40ug/mL) 均较为适宜。

2. Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究

(1) 与单纯辐照组相比，Zymosan-A 照射前给药会增加小鼠卵巢组织重量及卵巢器官系数，且两组间存在统计学差异。

(2) Zymosan-A 的单纯给药不会引起小鼠的动情周期紊乱，在照射前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，其动情周期总体紊乱率显著低于单纯辐照组。

(3) 在照射前通过腹腔注射给予小鼠 Zymosan-A，在辐照后该组小鼠的卵巢雌激素 (E2) 及抗缪勒管激素 (AMH) 水平较单纯辐照组显著升高，且卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 水平显著降低。

(4) 辐照诱发小鼠卵巢卵泡成熟障碍，与单纯辐照组相比，照射前应用 Zymosan-A 可降低闭锁卵泡数量，增加原始卵泡、初级卵泡、窦前卵泡和窦卵泡、总卵泡数量。

(5) 在小鼠生殖功能评估上，与单纯辐照组相比，Zymosan-A 的预处理会增

加小鼠的妊娠率；同时，对妊娠后小鼠的胚胎计数结果显示，Zymosan-A 的照前使用会使其数量明显增加。

(6) 辐照前应用 Zymosan-A 的母代，其子代出生后第 3 天、第 5 天、第 7 天体重均较单纯辐照组后代体重明显升高，且该趋势在出生后第 42 天体重统计上也一致。

(7) Zymosan-A 会增加辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖率，与单纯辐射组相比，二者间存在统计学差异。

(8) Zymosan-A 会增加辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的存活率，在各个剂量的辐照组中，Zymosan-A 预处理组克隆形成率较单纯辐照组均明显升高。

(9) Zymosan-A 会降低辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率，辐照给药组小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率约为单纯辐照组的一半。

3. Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨

(1) Zymosan-A 给药组小鼠卵巢组织测序与单纯辐照组共筛选出差异基因 268 个，其中有 156 个基因上调，有 112 个基因下调。

(2) 上调差异基因最显著的是 *Tlr2*。

(3) 相较于单纯辐照组小鼠，TLR2 KO 辐照组小鼠卵巢性激素紊乱程度及生殖功能障碍更重，且 TLR2 KO 能逆转 Zymosan-A 对辐照小鼠卵巢性激素水平紊乱的改善作用及生殖障碍的改善作用。

(4) Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤发挥防护效应可能主要是通过靶向 Toll-like receptor signaling pathway 及 NF-kappa B signaling pathway 产生作用。

(5) 与单纯辐照组相比，靶向 Toll-like receptor signaling pathway 及 NF-kappa B signaling pathway 中部分表达差异基因，包括 *Tlr2*、*Ccl5*、*Ccl3*、*Akt1*、*Myd88* 及 *Ikkbb* 的基因表达量均上调，且存在统计学差异。

(6) 进一步关于靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路相关蛋白的表达量的验证结果显示，辐照给药组较单纯辐照组相关蛋白表达量均明显升高。

五、研究结论

本研究前期通过文献调研及配体筛选，从大量 TLRs 配体中筛选出一种高效低毒的抗辐射药物 Zymosan-A，初步的毒性研究提示其动物实验毒性较低。目前国内

外在放射性卵巢损伤研究中使用的动物模型及造模条件差异性较大，故本研究的开始通过在小鼠卵巢内分泌功能层面及生殖功能层面开展研究，构建一个操作性较稳定的放射性卵巢损伤动物模型，为后续的研究开展提供了支持。在开展具体的卵巢辐射损伤防护效应研究之前，我们首先对其毒性进行了更为具体的相关验证。在明确了其安全性之后，通过在小鼠及小鼠卵巢颗粒细胞中开展研究，证实了 Zymosan-A 可以对放射性卵巢损伤发挥防护效应。最后通过对单纯辐照组及辐照给药组小鼠卵巢组织进行 RNA 测序分析，筛选出两条潜在的卵巢辐射损伤防护作用通路，并通过 RT-PCR 及 Western-blot 实验进行了初步验证。通过该研究的开展，为放疗性卵巢损伤构建了一个相对动物模型，同时为放疗性卵巢损伤防护找寻到了一种潜在的防护剂及潜在的作用通路。

关键词：Zymosan-A，放射治疗，卵巢辐射损伤，生育力保留，辐射损伤防护

Abstract

Background:

The continuous development of comprehensive diagnosis and treatment measures including radiotherapy has greatly improved the survival rate of cancer patients, and also put forward higher requirements for the quality of life of cancer survivors. As an important organ to maintain normal physiological function of women, ovary is very sensitive to radiation. Low dose radiation exposure will cause serious adverse outcomes, including hypogonadism and subsequent fertility reduction or even loss.

More and more oncologists and follow-up personnel of tumor patients began to devote themselves to the promotion and research of fertility preservation of tumor patients. "Oncofertility" came into being under this situation and gradually developed into a new hot topic. At present, the specific measures in the practice of fertility preservation for cancer patients mainly include the following three categories: physical protection, biological protection and drug protection. Physical protection has limited effect and can not effectively avoid the influence of hypothalamic-pituitary-gonadal axis similar to skull radiotherapy, thus affecting ovarian function, and the effect is not ideal. Biological protection measures include embryo cryopreservation and transplantation, oocyte cryopreservation and transplantation, ovarian tissue cryopreservation and transplantation and ovarian transplantation, etc., which are limited by the scope of technical development, the difficulty of technical operation, the time conflict between tumor treatment and ovarian stimulation, and even economic reasons, so it is difficult to carry out large-scale development at present. Because of its convenient operation, less time and economy, drug protection has gradually attracted the attention of scholars and made some progress.

In the aspect of drug protection, WR-2721 prepared in the United States is the most effective drug in the world at present, but its toxicity and side effects limit its use to a certain extent. At present, the prevention and treatment of radiation injury drugs, including estrogen and madder extract, have been proved to be ineffective in practice. Most of the radiation-induced injury prevention and treatment drugs in the research stage have some shortcomings,

such as unclear effect, unclear mechanism and severe toxicity. Therefore, it is urgent to develop drugs with high efficiency and low toxicity, which aim at new targets of ionizing radiation.

In the past 15 years, many studies have confirmed that TLRs and their ligands play an important role in the protection against radiation injury.

In the early stage, we carried out pre-experimental screening and subsequent experimental verification on TLRs pathway-related ligands, and finally obtained a compound Zymosan-A targeting TLR2 receptor. Zymosan-A is a kind of glucan connected by β -1,3 glycosidic bond. Our relevant research results have confirmed that it can play an anti-radiation injury role in intestinal digestive system and bone marrow hematopoietic system, and its toxicity has been preliminarily explored, and no obvious toxicity report has been found. There is no report about whether it can protect ovary from radiation damage. Based on this, we will first verify the safety of the compound in animals through further research on the toxicity of the compound, and explore the protective effect of Zymosan-A on radiation-induced ovarian injury through a series of in vitro and in vivo experiments under the condition of constructing a more appropriate ovarian radiation injury model, and finally screen out the potential mechanism of Zymosan-A to play the protective effect of radiation-induced ovarian injury through RNA-seq and preliminarily verify it. It provides a new research idea and intervention approach for the study of anti-radiation injury of the ovary.

Objectives:

1. To establish a radiation-induced ovarian injury animal model.
2. To systematically research the protective effect of Zymosan-A on ovarian injury induced by radiotherapy.
3. To explore the protective mechanism of Zymosan-A against radiation-induced ovarian injury, and screen out the potential protective pathway of radiation-induced ovarian injury.
4. the study on that protective drug for ovarian radiation injury provides new theoretical and practical support for the fertility preservation of female tumor patient of childbearing

age.

Contents and Methods:

1. Establishment of Radiation-induced Ovarian Injury Model and Research of the Safety of Zymosan-A

(1) Model construction of radiation-induced ovarian injury: in order to screen out a more suitable radiation dose and radiation times of a radiation-induced ovarian injury model from that ovarian endocrine function level, the mouse pelvic cavity was locally irradiated with different doses and/or different times of gamma ray by simulate the clinical pelvic cavity radiotherapy process, and the ovarian sex hormone level of the mouse after the pelvic cavity irradiation was detected by an ELISA method. On the other hand, the irradiated female mice were co-housed with the sexually mature male mice after ovulation induction, and a more suitable irradiation dose and irradiation times of the radiation-induced ovarian injury model were screened from the ovarian reproductive function level by counting the number of fetuses of pregnant mice. Combined with the above two results, a suitable irradiation dose and irradiation times were selected to construct an animal model of radiation-induced ovarian injury.

(2) Research of Zymosan-A safety: The literature was consulted to understand the drug concentration used in previous relevant studies. The same dose of the drug was injected intraperitoneally. The liver toxicity of the drug was evaluated by detecting the serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels in mice at a certain time point after injection by ELISA method. The renal toxicity of the drug was evaluated by detecting the serum creatinine value in mice. Relevant studies were carried out at the ovarian endocrine and reproductive function levels in mice to evaluate its reproductive toxicity.

2. The protective effect of Zymosan-A on radiation-induced ovarian injury.

(1) Effect of Zymosan-A on the weight of ovarian tissue and the coefficient of ovarian organ in irradiated mice: The mice were injected intraperitoneally with Zymosan-A before irradiation. The weight of ovary and body weight of mice were measured at a certain time point after irradiation.

(2) Effect of Zymosan-A on estrous cycle of irradiated mice: The mice were pretreated with Zymosan-A before irradiation, and vaginal cytology was performed after irradiation.

(3) Effects of Zymosan-A on ovarian hormone levels in irradiated mice: Before irradiation, mice were injected intraperitoneally with Zymosan-A, and the changes of ovarian sex hormone levels were detected by ELISA.

(4) Effect of Zymosan-A on the maturation of ovarian follicles in irradiated mice: The mice were pretreated with Zymosan-A before irradiation, and the mouse ovarian tissues were obtained by dissection at a certain time point after irradiation. The number of follicles at all levels on the HE section of the mouse ovarian tissues was counted, and the total number of follicles was counted.

(5) Effect of Zymosan-A on reproductive function of irradiated mouse ovaries: Before irradiation, mice were injected intraperitoneally with Zymosan-A. After irradiation, female mice were co-housed with male mice at sexual maturity after ovulation induction. At a certain time point after pregnancy, mouse uterus was dissected and the number of embryos in uterus of mice in each group was counted.

(6) Effect of Zymosan-A on the body weight of offspring of irradiated mice: The mice were intraperitoneally injected with Zymosan-A before irradiation, and the female mice were cohabited with the male mice at sexual maturity after ovulation induction. The weight of the offspring of each group was measured at several time points after birth.

(7) Effect of Zymosan-A on the proliferation of irradiated mouse ovarian granulosa cells: The cells were pretreated with Zymosan-A before irradiation, and the proliferation of granulosa cells was detected by CCK-8 after irradiation.

(8) Effect of Zymosan-A on survival rate of mouse ovarian granulosa cells: Cells were pretreated with Zymosan-A before irradiation, and the number of colonies formed was counted at a certain time point after irradiation.

(9) Effect of Zymosan-A on apoptosis rate of mouse ovarian granulosa cells :The cells were pretreated with Zymosan-A before irradiation, and the apoptosis rate of each group was counted by flow cytometry at a certain time point after irradiation.

3. Preliminary Study on the Protective Effect of Zymosan-A on Radiation-induced Ovarian Injury.

(1) Differential gene screening of protective effect of Zymosan-A on radiation-induced ovarian injury: Mice were injected intraperitoneally with Zymosan-A before irradiation, and mouse ovarian tissues were dissected at a certain time point after irradiation and subjected to high-throughput sequencing.

(2) To verify the role of TLR2 receptor in the protection against radiation-induced ovarian injury, TLR 2 KO (Knockout) mice were constructed and studied in vivo.

(3) KEGG function enrichment analysis of differentially expressed genes: KEGG analysis was performed on the aforementioned differential genes on a public data analysis platform according to the operating instructions.

(4) Quantitative PCR verification of differentially expressed genes related to ovarian tissue sequencing results: Before irradiation, the mice were injected with Zymosan-A intraperitoneally. At a certain time point after irradiation, the ovarian tissues were dissected and RNA was extracted. The differential gene expression levels were verified according to RT-PCR operation guidelines.

(5) Verification of the expression of proteins related to TLRs pathway and NF- κ B pathway: The mice were injected intraperitoneally with Zymosan-A before irradiation. At some time point after irradiation, the ovarian tissues were dissected and the protein was extracted. The expression of the corresponding protein was evaluated by Western-blot.

Results

1. Establishment of Radiation-induced Ovarian Injury Model and Study on the Safety of Zymosan-A

(1) Through the study on the ovarian endocrine function and reproductive function of mice, and the comprehensive analysis of the results of the two parts, it was preliminarily confirmed that the appropriate modeling condition of the mouse ovarian radiation injury model was 2Gy single pelvic local irradiation .

(2) Administration conditions of Zymosan-A used in the previous study on protection

against radiation damage: Mice (50mg/kg) and cells (40ug/mL) are suitable.

2. The protective effect of Zymosan-A on radiation-induced ovarian injury.

(1) Compared with the irradiation group, Zymosan-A administered before irradiation could increase the weight of ovarian tissue and the coefficient of ovarian organ, which was significantly different between the two groups.

(2) Injected intraperitoneally with Zymosan-A did not cause estrous cycle disturbance in mice. The total rate of estrous cycle disturbance in mice injected intraperitoneally with Zymosan-A before irradiation was significantly lower than that in the irradiated group.

(3) After Zymosan-A was injected intraperitoneally of mice before irradiation, the levels of ovarian estrogen (E2) and anti-Mullerian hormone (AMH) in the irradiated group were higher than those in the irradiated group, and the levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) declined significantly in comparison to the irradiated group.

(4) Irradiation induced follicular maturation disorder in mice. Compared with irradiation group, the number of atretic follicles was decreased and the number of primordial follicles, primary follicles, preantral follicles, antral follicles and total follicles were increased in injection plus irradiation group.

(5) In the evaluation of reproductive function, Zymosan-A pretreatment can increase the pregnancy rate of mice compared with the irradiation group. At the same time, the counting results of mouse embryos after pregnancy showed that the pre-irradiation treatment of Zymosan-A could significantly increase their number.

(6) The body weight of the offspring of the mothers treated with Zymosan-A before irradiation was significantly higher than that of the offspring of the mothers not treated with Zymosan-A before irradiation on the 3rd, 5th and 7th day after birth, and the trend was also consistent on the 42nd day after birth.

(7) Zymosan-A could increase the proliferation rate of irradiated mouse ovarian granulosa cells, which was significantly higher in the treated group than the untreated group.

(8) Zymosan-A could increase the survival rate of irradiated mouse ovarian granulosa

cells. The colony formation rate of Zymosan-A pretreatment group was significantly higher than that of irradiation group.

(9) Zymosan-A can reduce the apoptosis rate of irradiated mouse ovarian granulosa cells, and the apoptosis rate of ovarian granulosa cells in injection plus irradiated mice is about half of that in irradiated mice.

3. Preliminary study on the protective mechanism of Zymosan-A against radiation-induced ovarian injury.

(1) There were 268 differentially expressed genes in ovarian tissues of Zymosan-A-treated mice compared with radiation group, of which 156 genes were up-regulated and 112 genes were down-regulated.

(2) The most significant up-regulated gene was *Tlr2*.

(3) Compared with irradiated mice, TLR2 KO irradiated mice had more severe ovarian sex hormone disorder and reproductive dysfunction, and TLR2 KO could completely reverse the improvement of Zymosan-A on ovarian sex hormone disorder and reproductive dysfunction.

(4) The protective effect of Zymosan-A on radiation-induced ovarian injury may be mainly through targeting Toll-like receptor signaling pathway and NF-kappa B signaling pathway.

(5) Compared with radiation group, the expression of some differentially expressed genes in Toll-like receptor signaling pathway and NF-kappa B signaling pathway, including *Tlr2*, *Ccl5*, *Ccl3*, *Akt1*, *Myd88* and *Ikkbb*, were up-regulated, and there were statistical differences.

(6) Further verification results on the expression of proteins related to the targeted TLRs pathway and NF- κ B pathway showed that the expression of proteins related to the irradiation group was significantly higher than that of the simple irradiation group.

Conclusion

In the early stage of this study, Zymosan-A, a highly effective and low-toxic anti-radiation compound, was screened from a large number of TLRs ligands through literature

review and ligand screening. The preliminary toxicity studies suggested that its toxicity in animal experiments was relatively low. At present, the animal models and modeling conditions used in the study of radiation-induced ovarian injury at home and abroad are quite different. Therefore, this study began to carry out research on the endocrine function and reproductive function of mouse ovary to construct a stable radiation-induced ovarian injury animal model, which provided support for the subsequent research. Before conducting specific studies on the protective effects of ovarian radiation injury, we further verified its toxicity. After its safety was confirmed, Zymosan-A was confirmed to have protective effect on radiation-induced ovarian injury by conducting studies in mice and mouse ovarian granulosa cells. Finally, two potential protective pathways of ovarian radiation injury were screened out by RNA sequencing analysis of ovarian tissues of mice in simple irradiation group and irradiation group, and were preliminarily verified by RT-PCR and Western-blot experiments. The study provides a reference for the animal model of radiation-induced ovarian injury, and provides a potential protective agent and a potential action pathway for the protection of radiation-induced ovarian injury.

KEY WORDS:

Zymosan-A, Radiation Therapy, Ovarian Radiation Injury, Fertility Preservation,
Radiation Injury Protection

缩略词表

缩写	英文全称	中文名称
Akt1	Protein Kinase B α	蛋白激酶 B α
ALT	Alanine Aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AMH	Anti-Mullerian Hormone	抗缪勒管激素
AST	Aspartate Aminotransferase	天门冬氨酸氨基转移酶
BAX	BCL2-Associated X	BCL2-Associated X 的 蛋白质
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴瘤-2
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数分析套件
Ccl3	CC-Chemokine ligand 3	趋化因子配体 3
Ccl5	CC-Chemokine ligand 5	趋化因子配体 5
Con	Control	对照组
Cr	Creatinine	肌酐
DAMPs	Damage-associated molecular patterns	损伤相关分子模式
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
E2	Estrogen	雌激素
ECL	Enhanced Chemiluminescence	增强化学发光液
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
FC	Fold Change	差异改变倍数
FSH	Follicle-stimulating Hormone	卵泡刺激素
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
Gy	Grays	戈瑞
Hcg	Human Chorionic Gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HE	Hematoxylin and Eosin Stain	苏木素伊红染色

缩写	英文全称	中文名称
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Ikkkb	Nuclear factor κ B kinase subunit β inhibitory factor	核因子 κ B 激酶亚基 β 抑制因子
IKK α/β	Nuclear factor κ B kinase subunit α/β inhibitory factor	核因子 κ B 激酶亚基 α/β 抑制因子
IR	Ionizing radiation	电离辐射
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科 全书
KO	Knockout	基因敲除
LGG	Lactobacillus Rhamnosus GG	鼠李糖乳杆菌 GG
LH	Luteinizing hormone	黄体生成素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
Myd88	Myeloid differentiation factor88	髓样分化因子
NS	Normal Saline	生理盐水
N.S.	No Statistical Difference	无统计学差异
OD	Optical Density	吸光度
P65/NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells	活化 B 细胞的核因子 κ 轻链增强子
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	增殖细胞核抗原
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin	孕马血清促性腺激素
PRR	Pattern Recognition Receptor	模式识别受体
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RNA-Seq	RNA sequencing	转录组测序技术
TLR2	Toll-like receptor 2	Toll 样受体 2
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll 样受体 4
TLR9	Toll-like receptor 9	Toll 样受体 9

缩写	英文全称	中文名称
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体家族
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
WB	Western-blot	蛋白印迹实验
WT	Wild type	野生型
Zym	Zymosan-A	酵母多糖 A

前言

一项最新的统计数据显示,全世界每年约有 120 万例恶性肿瘤新发病例在 15 至 39 岁的年轻患者中得到诊断^[1],该年龄段新发人数约占全年所有癌症诊断人数的 6% 左右^[2]。以放化疗为主的肿瘤综合治疗措施的不断发展,使得肿瘤患者的生存率不断提高^[3]。得以幸存的肿瘤患者,在很长一段时间内均需面临肿瘤综合治疗副作用的影响。对于年轻女性肿瘤患者,包括放疗在内的肿瘤治疗手段往往会对卵巢功能产生影响,出现卵巢功能紊乱,严重时可能发生卵巢早衰。在儿童肿瘤幸存者中,有研究提示她们的卵巢早衰的发生率约为 8%,与之相对应的是,她们的姐妹发生卵巢早衰的比例小于 1%^[4]。尽管肿瘤治疗的益处包括缓解和治愈,但卵巢功能过早丧失的后遗症无疑会对女性产生不良影响。除了丧失生育能力外,卵巢功能下降还可能导致更年期提前,这与潮热、骨密度降低和心血管不良事件相关^[5-7]。卵巢功能减退或卵巢功能衰竭的总体效应还包括可能导致生活质量下降,甚至过早死亡^[6,8]。

卵巢组织对放射线十分敏感,Wallace 及其团队通过模型预测可引起人类育龄期女性卵巢组织中 50%卵泡闭锁的射线剂量约为 2 Gy,并将其定义为人类卵巢组织的 LD50^[9]。较大剂量的放射线照射可直接导致女性卵巢功能丧失,该剂量随着年龄增加不断降低,出生时约为 20.3Gy,10 岁时约为 18.4 Gy,20 岁时 16.5 Gy,30 岁时 14.3 Gy^[10]。

现阶段,仅有少数年轻肿瘤患者在治疗前或治疗过程中接受了遗传咨询,生育力保留已经成为此类人群继生存之后第二大需要考虑的问题。“Oncofertility”在此情况下逐渐发展起来,并逐渐成为近些年来相对热门的话题,吸引了越来越多的临床肿瘤医生及生育专家们的注意,使越来越多的学者致力于肿瘤患者的生育力保留措施的相关研究^[11-13]。

在“Oncofertility”具体实践过程中主要包含以下三方面措施,物理防护、生物防护、药物防护。物理防护主要是通过屏障作用来减少放射线引起的损伤,但不能有效避免类似于头颅放疗,通过影响下丘脑-垂体-性腺轴,进而导致卵巢功能障碍,效果不甚理想^[14]。近些年来,卵巢移位术的开展为需要接受盆腔放疗的育龄期女性肿瘤患者卵巢功能的保留提供了一个新的选择,但同样面临着一些条件的限制,例

如卵巢储备能力差、有卵巢转移的高风险、只单纯进行化疗等^[14, 15]。包括胚胎冷冻保存和移植、卵母细胞冻存和移植、卵巢组织冻存和移植及卵巢移植等在内的生物防护是现阶段育龄期女性肿瘤患者生育力保留实践过程中开展最多的项目^[16-20]。但该类防护手段同样面临着诸多的挑战和限制,例如,该类项目在具体实践过程中技术操作的难度较大、开展此类技术的医疗机构较少、社会家庭经济因素以及相关医疗禁忌症等。药物防护手段因其操作过程相对简便,与肿瘤的治疗极少产生冲突,得到了众多学者的关注,并取得一定进展。

在药物防护方面,目前国际上效果最佳的药物为 FDA 批准的 WR-2721,但其在实践过程中被证实毒性较大,副反应较多,一定程度上限制了其的使用^[21]。国内目前配备的辐射损伤防治药物包括雌激素类和茜草提取物等,在实践过程中均被证实疗效不佳^[21]。近些年来,我国学者在中医药领域开展了多项基础研究结果提示多种中药或汤剂可以减轻辐射诱导的卵巢组织损伤^[22-24],为减轻卵巢的辐射损伤防护带来了新希望,但均面临着效应不明确、具体机制不清晰、毒副反应较大等多重挑战。因此,亟需开发高效低毒、针对电离辐射作用新靶点的药物。

2008年,美国学者 Burdelya LG 及其团队在《Science》杂志上首次报道了 TLR5 受体改良型激动剂 CBLB502 可以通过靶向 NF- κ B 通路对辐射损伤发挥极强的防护效应^[25]。这一研究成果的发表在短时间内就得到了众多辐射损伤防护领域研究者的关注,关于 TLRs 受体家族及其配体在辐射损伤防护领域的研究逐渐成为该领域研究的新热点。

近些年来,TLRs (Toll-like receptors, Toll 样受体家族)及其通路在天然免疫中的重要作用逐渐被证实,其是参与机体天然免疫过程的一类关键模式识别受体 (Pattern Recognition Receptor, PRR) (图 1)^[26-28],在 1995 年由美国的 Hashimoto 研究团队在果蝇中首次发现和报道^[29, 30]。后续 Hoffmann JA 博士团队的进一步研究发现 Toll 蛋白在果蝇天然免疫中发挥重要作用,此项研究成果的发表让 Hoffmann JA 博士在 2011 年获得了诺贝尔生理学或医学奖^[31, 32]。最新的研究表明在人类体内有 10 种 TLRs,分别被命名为 TLR1-10,而在小鼠体内发现了 12 种 TLRs,因不含 TLR12,故按照顺序将其命名为 TLR1-13^[26]。

TLRs 在进化上高度保守,不同 TLRs 受体间结构较为相似,都属于 I 型跨膜蛋白,

结构上的相似使其在功能上也有相通之处，主要表现在信号转导通路和相应的生物活性等方面。不同 TLRs 识别的 DAMPs (damage-associated molecular patterns ,损伤相关分子模式) (图 2) 存在一些差异，例如：TLR1、2、4 和 6 通常识别病原体的脂类部分；TLR5、11 和 12 通常识别病原体的蛋白质结构；TLR3、7、8、9 和 13 通常识别病原体的核酸结构^[26]。相关 TLRs 识别不同的配体结构后，开始启动特异性的下游信号通路和免疫反应^[26, 32]。大量的研究结果证实，多数的 TLR 受体靶向 TLRs 信号通路的下游均可依赖 MyD88 通路激活 NF- κ B，从而发挥抑制细胞凋亡，促进细胞增殖，清除自由基的作用^[33-37]。NF- κ B 分子位于 TLRs 下游信号通路的枢纽位置，TLRs 及其配体（除 TLR3 外）以 MyD88/TIRAP 依赖方式使 NF- κ B 磷酸化、泛素化，解除其对 NF- κ B 核定位的控制，从而激活核内 NF- κ B^[37, 38]。NF- κ B 被激活后，一方面参与细胞增殖和分化，抑制细胞凋亡，从而增强细胞及组织的适应性。另一方面可启动下游多种靶基因转录表达，合成蛋白，如细胞生长因子（IL-6、TNF- α 、G-CSF、M-CSF、GM-CSF 等），细胞粘附因子（ICAM-1、VCAM-1、MMP-9 等）^[26, 32]。

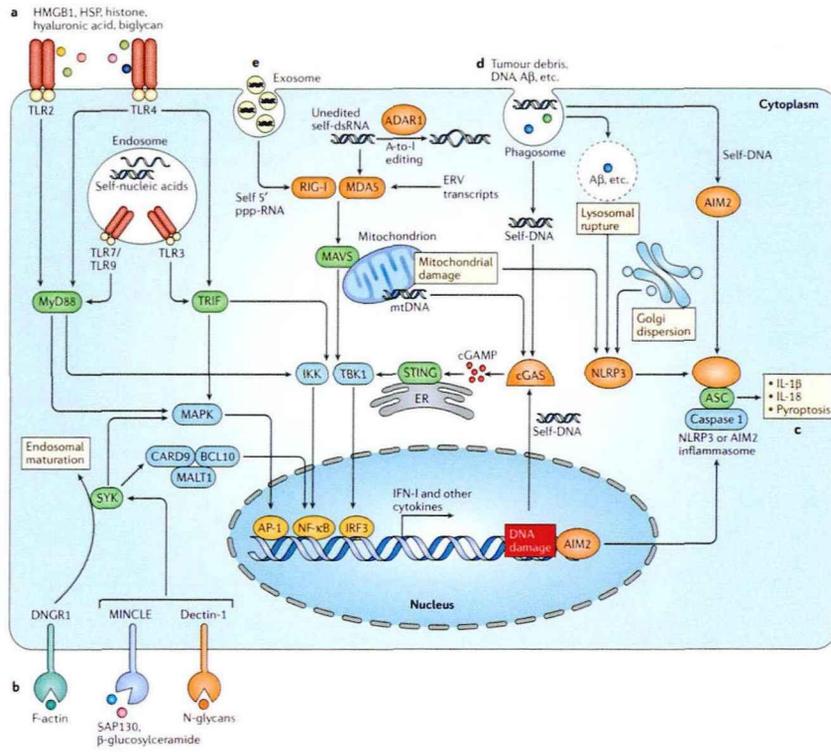


图 1.模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 信号转导通路及其调控。(摘自 Nat Rev Immunol. 2020 Feb;20(2):95-112^[39].)

在辐射损伤防护领域，继 2008 年 TLR5 受体及其配体被证实可以在辐射损伤防护中发挥作用之后，围绕 TLR 家族其他受体及其配体的研究在不断深入，相应的效应也被逐一证实^[40-50]。本课题组前期深耕于辐射损伤防护机理的探讨，聚焦于 TLRs 通路相关研究，证实了 TLR2 和 TLR4 受体是电离辐射损伤防治的重要新靶点^[51,52]。相关配体在辐射损伤防护领域的作用也在随后被证实，但目前所报道的 TLR2 及 TLR4 的配体不能同时兼具高效和低毒的特征，例如 TLR4 配体 LPS 效价高但其毒性也高，进行各种修饰改进后出现减毒减效的情况，而 TLR2 配体 Pam2、Pam3 虽然毒副作用低但是本身防护效价较低，限制了其深入研究的价值^[43, 46, 47, 49, 53]。尽管目前关于 TLR2 和 TLR4 在辐射损伤防护领域的研究和报道给辐射损伤防护研究带来了相对光明的前景，但是迄今为止仍未完全解决上述难题。

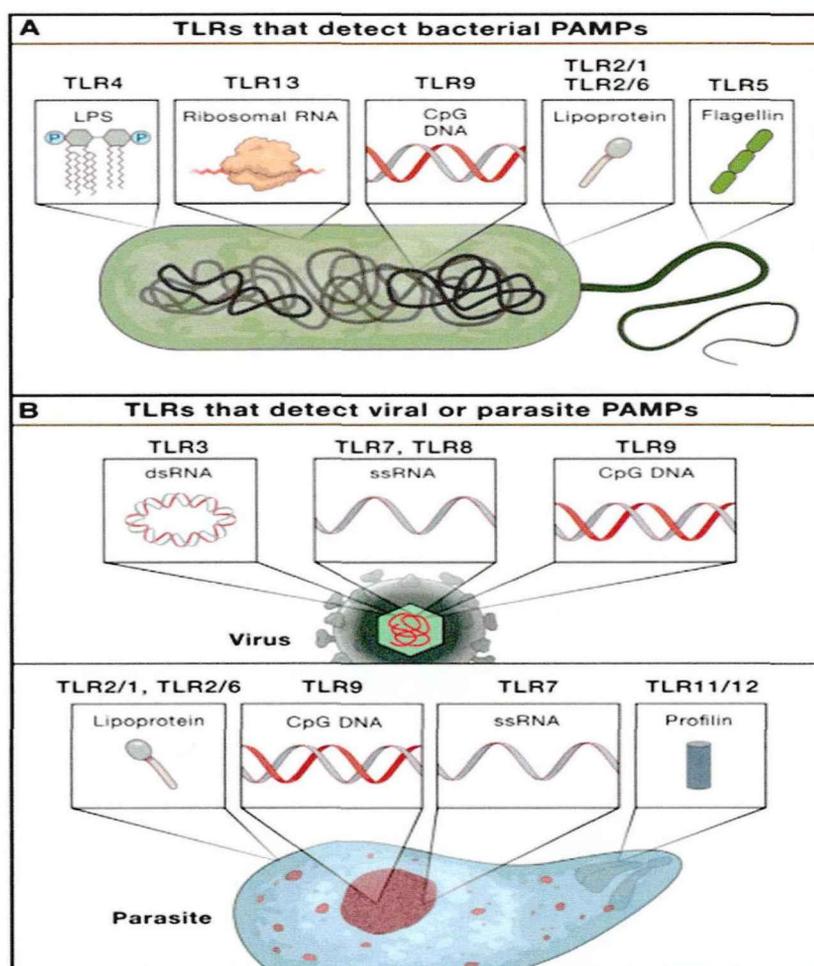


图 2 不同的 TLRs 及其识别的 DAMPs。(摘自 Cell. 2020 Mar 19;180(6):1044-1066^[26].)

针对以上瓶颈问题，本课题前期进行了大量的文献检索，并进行理论分析和预实验验证，从 13 种已知 TLR2/4 相关配体中筛选到一种具有较强辐射防治作用的新型 TLR2 靶向配体 Zymosan-A。

Zymosan-A，中文全称酵母多糖-A，主要由啤酒糖酵母真菌壁制备而成，是一类通过 β -1,3 糖苷键连接的葡聚糖，它也是第一个被发现具有免疫活性的葡聚糖，来源广泛、价格便宜，毒副作用低。前期我们研究已经证实 Zymosan-A 对肠道以及血液系统具有显著的辐射防治效果^[42, 54]。在卵巢的辐射防护方面，前期的小样本预实验结果提示，辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，小鼠卵巢组织病理中各级效应卵泡数量均明显多于未给药组，且小鼠性激素水平也有相同提示，这些结果都初步表明 Zymosan-A 对卵巢辐射损伤同样可以发挥防护效应。另一方面，前期实验过程中进行的相关毒性实验提示其毒性显著低于 LPS。以上结果表明，Zymosan-A 可能是一种新型高效低毒的辐射损伤防护剂。

在既往的研究过程中，关于卵巢辐射损伤模型的造模条件和造模方式差异性较大^[22-24, 55, 56]，本研究将首先通过改变照射剂量及照射次数，模拟临床放射治疗过程，建立一个相对稳定的放射性卵巢损伤动物模型，并开展 Zymosan-A 相关毒性实验。在进一步明确了其毒性较低之后，通过在体内外进行多方面实验研究探讨其对卵巢发挥放射性损伤防护的具体效应，最后利用高通量 RNA 测序等技术手段，筛选出其发挥作用的潜在靶分子和靶通路，并通过相关实验加以验证。希望通过本课题的研究，获得一种高效低毒的卵巢辐射损伤防护新制剂，为卵巢辐射损伤防护的研究提供新的途径和新的靶点；同时为今后研制新型、安全、高效的卵巢辐射防护剂提供理论和实验基础。

参考文献

- [1] HUSSON O, REEVE B B, DARLINGTON A S, et al. Next Step for Global Adolescent and Young Adult Oncology: A Core Patient-Centered Outcome Set [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2022, 114(4): 496-502.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2022, 72(1): 7-33.
- [4] SKLAR C A, MERTENS A C, MITBY P, et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2006, 98(13): 890-6.
- [5] ANAGNOSTIS P, SIOLOS P, GKEKAS N K, et al. Association between age at menopause and fracture risk: a systematic review and meta-analysis [J]. Endocrine, 2019, 63(2): 213-24.
- [6] GANZ P A, GREENDALE G A, PETERSEN L, et al. Breast cancer in younger women: reproductive and late health effects of treatment [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2003, 21(22): 4184-93.
- [7] STEVENSON J C, COLLINS P, HAMODA H, et al. Cardiometabolic health in premature ovarian insufficiency [J]. Climacteric : the journal of the International Menopause Society, 2021, 24(5): 474-80.
- [8] BLÜMEL J E, MEZONES-HOLGUÍN E, CHEDRAUI P, et al. Is premature ovarian insufficiency associated with mortality? A three-decade follow-up cohort [J]. Maturitas, 2022, 163(82-7).
- [9] WALLACE W H, THOMSON A B, KELSEY T W. The radiosensitivity of the human oocyte [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2003, 18(1): 117-21.
- [10] WALLACE W H, THOMSON A B, SARAN F, et al. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries [J]. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2005, 62(3): 738-44.
- [11] KIM S Y, KIM S K, LEE J R, et al. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women [J]. Journal of gynecologic oncology, 2016, 27(2): e22.

- [12] VO K C T, KAWAMURA K. Female Oncofertility: Current Understandings, Therapeutic Approaches, Controversies, and Future Perspectives [J]. *Journal of clinical medicine*, 2021, 10(23):
- [13] REYNOLDS A C, MCKENZIE L J. Cancer Treatment-Related Ovarian Dysfunction in Women of Childbearing Potential: Management and Fertility Preservation Options [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2023, Jco2201885.
- [14] MCCLAM M, XIAO S. Preserving Oocytes in Oncofertility† [J]. *Biology of reproduction*, 2022, 106(2): 328-37.
- [15] RIVES N, COURBIÈRE B, ALMONT T, et al. What should be done in terms of fertility preservation for patients with cancer? The French 2021 guidelines [J]. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2022, 173(146-66).
- [16] DONNEZ J, DOLMANS M M. Fertility Preservation in Women [J]. *The New England journal of medicine*, 2017, 377(17): 1657-65.
- [17] COBO A, GARCIA-VELASCO J A, DOMINGO J, et al. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? [J]. *Fertility and sterility*, 2013, 99(6): 1485-95.
- [18] LEE S, RYU K J, KIM B, et al. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation [J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(13):
- [19] DONNEZ J, DOLMANS M M, PELLICER A, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation [J]. *Fertility and sterility*, 2013, 99(6): 1503-13.
- [20] PARMEGIANI L, COGNIGNI G E, BERNARDI S, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes [J]. *Reproductive biomedicine online*, 2011, 23(4): 505-12.
- [21] OBRADOR E, SALVADOR R, VILLAESCUSA J I, et al. Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(11):
- [22] 赵粉琴, 安明霞, 丁晓南, et al. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨左归丸对 ~(60)Co-γ 射线损伤大鼠卵泡凋亡调控作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(18): 12-9.
- [23] 陈桂莲, 黄惠娟, 田黎明. 橄榄苦甙对卵巢辐射损伤的防治效果 [J]. *东南国防医药*, 2017, 19(06): 576-80.

- [24] 匡振坤, 杨云霜, 赵雪, et al. 补肾解毒方对核辐射致雌鼠生殖系统损伤的防护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(07): 2816-9.
- [25] BURDELYA L G, KRIVOKRYSENKO V I, TALLANT T C, et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models [J]. Science (New York, NY), 2008, 320(5873): 226-30.
- [26] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity [J]. Cell, 2020, 180(6): 1044-66.
- [27] WICHERSKA-PAWŁOWSKA K, WRÓBEL T, RYBKA J. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases [J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(24):
- [28] LI D, WU M. Pattern recognition receptors in health and diseases [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2021, 6(1): 291.
- [29] HALFON M S, HASHIMOTO C, KESHISHIAN H. The Drosophila toll gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development [J]. Developmental biology, 1995, 169(1): 151-67.
- [30] WINANS K A, HASHIMOTO C. Ventralization of the Drosophila embryo by deletion of extracellular leucine-rich repeats in the Toll protein [J]. Molecular biology of the cell, 1995, 6(5): 587-96.
- [31] JOOSTEN L A, ABDOLLAHI-ROODSAZ S, DINARELLO C A, et al. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments [J]. Nature reviews Rheumatology, 2016, 12(6): 344-57.
- [32] VANPOUILLE-BOX C, HOFFMANN J A, GALLUZZI L. Pharmacological modulation of nucleic acid sensors - therapeutic potential and persisting obstacles [J]. Nature reviews Drug discovery, 2019, 18(11): 845-67.
- [33] ZHANG Q, WANG L, WANG S, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2022, 7(1): 78.
- [34] KOUSHKI K, SHAHBAZ S K, MASHAYEKHI K, et al. Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways [J]. Clinical reviews in allergy & immunology, 2021, 60(2): 175-99.
- [35] LI H, GAO C, LIU C, et al. A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen [J]. Biomedicine &

- pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2021, 137(111332).
- [36] DUTTA D, JANA M, MAJUMDER M, et al. Selective targeting of the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway reduces α -synuclein spreading in vitro and in vivo [J]. Nature communications, 2021, 12(1): 5382.
- [37] ZHAO H, WU L, YAN G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2021, 6(1): 263.
- [38] CHEN Y, ZHOU P, DENG Y, et al. ALKBH5-mediated m(6) A demethylation of TIRAP mRNA promotes radiation-induced liver fibrosis and decreases radiosensitivity of hepatocellular carcinoma [J]. Clinical and translational medicine, 2023, 13(2): e1198.
- [39] GONG T, LIU L, JIANG W, et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases [J]. Nature reviews Immunology, 2020, 20(2): 95-112.
- [40] LIU D, DONG S, LIU C, et al. CRX-527 induced differentiation of HSCs protecting the intestinal epithelium from radiation damage [J]. Frontiers in immunology, 2022, 13(927213).
- [41] DU J, FANG L, ZHAO J, et al. Zymosan-A promotes the regeneration of intestinal stem cells by upregulating ASCL2 [J]. Cell death & disease, 2022, 13(10): 884.
- [42] DU J, ZHANG P, ZHAO H, et al. The mechanism for the radioprotective effects of zymosan-A in mice [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2018, 22(4): 2413-21.
- [43] CHENG Y, DU J, LIU R, et al. Novel chimeric TLR2/NOD2 agonist CL429 exhibited significant radioprotective effects in mice [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2021, 25(8): 3785-92.
- [44] CIORBA M A, RIEHL T E, RAO M S, et al. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner [J]. Gut, 2012, 61(6): 829-38.
- [45] RIEHL T E, ALVARADO D, EE X, et al. Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells [J]. Gut, 2019, 68(6): 1003-13.
- [46] LIU Z, CAO K, LIAO Z, et al. Monophosphoryl lipid A alleviated radiation-induced testicular injury through TLR4-dependent exosomes [J]. Journal of cellular and

- molecular medicine, 2020, 24(7): 3917-30.
- [47] ZHENG L, ZHU Q, XU C, et al. Glycyrrhizin mitigates radiation-induced acute lung injury by inhibiting the HMGB1/TLR4 signalling pathway [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2020, 24(1): 214-26.
- [48] CHEN Y, CAO K, LIU H, et al. Heat Killed Salmonella typhimurium Protects Intestine Against Radiation Injury Through Wnt Signaling Pathway [J]. Journal of oncology, 2021, 2021(5550956).
- [49] GUO J, LIU Z, ZHANG D, et al. TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Alleviated Radiation-Induced Intestinal Injury [J]. Journal of immunology research, 2019, 2019(2121095).
- [50] FENG Z, XU Q, HE X, et al. FG-4592 protects the intestine from irradiation-induced injury by targeting the TLR4 signaling pathway [J]. Stem cell research & therapy, 2022, 13(1): 271.
- [51] GAO F, ZHANG C, ZHOU C, et al. A critical role of toll-like receptor 2 (TLR2) and its' in vivo ligands in radio-resistance [J]. Sci Rep, 2015, 5(13004).
- [52] LIU C, ZHANG C, MITCHEL R E, et al. A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its' in vivo ligands in basal radio-resistance [J]. Cell death & disease, 2013, 4(e649).
- [53] OBRADOR E, SALVADOR-PALMER R, PELLICER B, et al. Combination of natural polyphenols with a precursor of NAD(+) and a TLR2/6 ligand lipopeptide protects mice against lethal γ radiation [J]. Journal of advanced research, 2023, 45(73-86).
- [54] DU J, CHENG Y, DONG S, et al. Zymosan-a Protects the Hematopoietic System from Radiation-Induced Damage by Targeting TLR2 Signaling Pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(2): 457-64.
- [55] AKTAS C, KANTER M, KOCAK Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation [J]. Toxicology and industrial health, 2012, 28(9): 852-63.
- [56] SIMSEK Y, GUROCAK S, TURKOZ Y, et al. Ameliorative effects of resveratrol on acute ovarian toxicity induced by total body irradiation in young adult rats [J]. Journal of pediatric and adolescent gynecology, 2012, 25(4): 262-6.

第一部分：放射性卵巢损伤模型的构建及 Zymosan-A 药物安全性研究

一、前言

随着肿瘤综合治疗的不断发展，肿瘤患者的生存率得到了极大提高，提高了肿瘤患者生存率的同时，如何提高肿瘤幸存者生活质量的得到了越来越多研究者的关注^[1]。女性卵巢组织对放疗极度敏感，较低剂量的放射线就会引起卵巢功能紊乱，严重者会出现卵巢早衰。近些年来围绕女性卵巢辐射损伤防护的研究在不断开展，但相关研究的结果提示其效果较差^[2-6]。另一方面，不同团队的研究在在造模过程中采用的照射剂量差异较大，从 3Gy 到 8Gy 不等，且均采用全身照射，严重偏离临床放疗的操作过程。

2008 年，相关学者在《Science》杂志上首次报道 TLR5 受体激动剂 CBLB502 在小鼠体内具有明显的辐射损伤防护效应。随后，多国学者将目光聚焦于 TLR 受体及 TLRs 通路，使其在辐射损伤防护研究领域的关注度越来越高，逐渐成为辐射损伤防护研究领域新的热门方向^[7-10]。本课题组紧扣热点，前期通过在基因敲除小鼠中开展实验，证实了 TLR2 和 TLR4 在辐射辐射损伤防护中发挥着关键作用^[11, 12]。在此基础上，我们更深一步的进行了文献阅读、综合分析，并开展了大量的预实验，从而成功筛选出一种新型 TLR 配体 Zymosan-A。并在肠道系统及血液系统对其辐射损伤防护效果开展了具体研究，验证了其有效性^[13, 14]。Zymosan-A 作为 β-葡聚糖的一员，此前已有多篇文献报道其可通过靶向激活 TLR2 刺激机体免疫，发挥机体免疫调节的作用^[15-18]。我们在预实验中发现 Zymosan-A 对卵巢具有明显的辐射损伤防护作用，且并未发现其在卵巢辐射损伤防护领域的报道。

鉴于在以往相关研究过程中存在的照射方式不同、辐照剂量差异较大等问题，在研究的开始，我们通过模拟临床放疗过程，采用盆腔局部放疗、分割照射的方式进行造模，试图构建一个较为稳定的放疗性卵巢损伤动物模型，为后续的研究打好良好的基础。新型卵巢辐射防护剂的筛选既需满足生存安全要求，同时更应该关注生育安全。因此本部分内容还包括 Zymosan-A 药物安全性的进一步验证。我们在 C57BL/6 雌性小鼠和小鼠卵巢颗粒细胞中开展研究。通过盆腔局部放疗，设置不同

照射剂量、不同照射次数，在照射后检测小鼠卵巢性激素水平，并计数胚胎数量，综合两者结果筛选出一个相对合适的辐照条件。Zymosan-A 的毒性研究包括体内和体外试验，通过检测 Zymosan-A 刺激后小鼠肝酶、肌酐及相关血液学指标变化来评估其生存毒性，给药后小鼠的卵巢性激素水平变化及胚胎数量来评估其生殖毒性，并通过检测小鼠卵巢颗粒细胞活力水平，系统的探讨 Zymosan-A 的毒性。

二、材料和方法

(1) 实验材料

1. 实验动物：

本实验所选用的小鼠遗传背景为：C57BL/6J，购置于上海吉辉实验动物饲养有限公司，周龄为 6-8 周，严格遵循我校动物伦理及管理指南进行。

2. 实验细胞

本实验所用到的小鼠卵巢颗粒细胞（CP-M050）购置于武汉普诺赛生命科技有限公司。

3. 主要实验试剂及耗材

Zymosan-A: Sigma-Aldrich ()

0.9%生理盐水：华仁药业股份有限公司

小鼠雌激素(E2)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)及抗缪勒管激素(AMH)
ELISA 检测试剂：上海茁彩生物科技有限公司

小鼠丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)ELISA 试剂盒：上海茁彩生物科技有限公司

小鼠肌酐 (Cr) 检测试剂盒：上海茁彩生物科技有限公司

细胞培养基：武汉普诺赛生命科技有限公司

EDTA-胰酶：上海雅酶生物医药科技有限公司

PBS（不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ）：美国 Hyclone 公司

CCK-8 检测试剂盒：日本同仁化学研究所

PMSG：宁波第二激素厂

Hcg: 杭州动物药品厂

兽用即用型麻醉剂: 南京爱贝生物科技有限公司

96孔板: 杭州博日科技有限公司

25 cm² 培养瓶、75cm² 培养瓶: 美国 Costar 公司

60×15 培养皿、100×20 培养皿: 美国 Costar 公司

15mL 离心管: 美国 Corning 公司

2mL 细胞冻存管: 美国 Corning 公司

细胞冻存液: 苏州新赛美生物科技有限公司

含肝素的 1.5mL EP 管: 江苏宇杰医疗器械有限公司

不含肝素的 1.5mL、200uL EP 管: 美国 Corning 公司

高精度移液器: 德国 Eppendorf 公司

枪头 (0.5-10uL、2-20uL、20-200uL、200-1000uL): 湖南比克曼生物科技有限公司

4. 主要实验仪器

小动物麻醉手术专用附属升温台: 江苏易核科学仪器有限公司

全自动模块式动物血液体液分析仪: 希森美康医用电子(上海)有限公司

生物安全柜: 上海瑞仰净化装备有限公司

细胞培养箱: 美国 Thermo Fisher 公司

-80°C超低温冰箱: 美国 Thermo Fisher 公司

Nano Drop 分光光度计: 美国 Thermo Fisher 公司

涡旋混合器: 美国 Scilogex 公司

4°C离心机: 美国 Scilogex 公司

可变温度水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司

自动细胞计数仪: 上海百翱杰生物科技有限公司

15mL 管水平离心机: 湖南湘仪实验仪器有限公司

倒置生物显微镜: 日本 Olympus 公司

可调式恒温孵箱: 上海跃进医疗器械厂

纯水机: 美国 Millipore 公司

制冰机：日本 SANYO 公司

高精度电子天平：青岛精诚仪器仪表有限公司

(二) 实验方法：

1. γ 射线造模

本研究造模所采用的照射源为我校辐照中心 ^{60}Co 照射源，辐照时温度为室温。照射前所有小鼠均接受腹腔注射麻醉，并以特定体位固定于特定装置中，以降低在辐照进行中由于小鼠体位改变造成的差异（图 1-1 A）。在实验进行中，所有的细胞在照射前均以封口膜封口，并置于避光保温的装置中（图 1-1 B）。根据实验条件的不同，小鼠或细胞接受不同剂量的辐照，辐射剂量率经换算后为 $1\text{Gy}/\text{min}$ 。照射结束后，立即将小鼠从固定装置中取下，快速置于升温台上，在保温条件下使其缓慢苏醒，待小鼠完全苏醒后，将小鼠转运至实验动物饲养间继续饲养。细胞在辐照结束后，去除封口膜，经 75% 的乙醇溶液表面消毒后，继续放置细胞培养箱中培养。

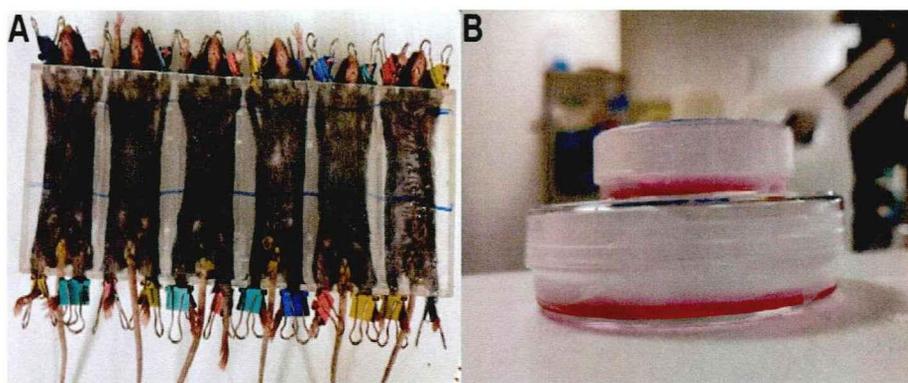


图 1-1 辐照过程中小鼠及细胞的固定或封口方式。（A）辐照过程中小鼠的固定方式；

（B）辐照过程中细胞培养皿的封口方式。

2. Zymosan-A 的配置

小鼠注射用 Zymosan-A 在无菌条件下使用微量电子天平称量，在无菌操作台中将其倒进 15mL 离心管中，加入适量无菌生理盐水，置于震荡器上震荡混匀，最终配制成母液浓度为 $50\text{mg}/\text{mL}$ ，在注射前采用倍比稀释法将其稀释成工作浓度为 $5\text{mg}/\text{mL}$ 。

细胞实验过程中所有的 Zymosan-A 配置操作与动物实验基本类似，使用微量电子天平称量，在无菌操作台中将其倒进 1.5mL EP 管中，加入适量无菌 PBS，置于震

荡器上震荡混匀，最终配制成工作液浓度为 10mg/mL。

3. 实验分组与相关检测样本收集

3.1 实验动物分组

(1) 辐照实验分组：从上海吉辉实验动物饲养有限公司购入实验小鼠后，随机将雌性小鼠分为对照组和辐照组，辐照组又按照不同的辐射剂量分为：0.5Gy 1 次组 (0.5Gy*1)、0.5Gy 2 次组 (0.5Gy*2)、1Gy 1 次组 (1Gy*1)、1Gy 2 次组 (1Gy*2)、2Gy 1 次组 (2Gy*1) 及 2Gy2 次组 (2Gy*2)，每组 8 只小鼠，在实验开始前均先适应性饲养于我校动物中心 1-3 周。

(2) 毒性实验分组：从上海吉辉实验动物饲养有限公司购入实验小鼠后，随机将雌性小鼠分为对照组和给药组，每组 8 只小鼠，在实验开始前均先适应性饲养于我校动物中心 1-3 周。

3.2 实验动物的处理

(1) 在辐照实验中，按照前述伽马射线造模方法进行。

(2) 在毒性验证实验中，根据既往研究^[13, 14]，按照给药浓度为 50mg/kg，间隔 10 小时，分别两次采用腹腔注射的方法在小鼠的左下腹注射 0.2mL Zymosan-A，对照组在相同部位腹腔注射同等体积的无菌生理盐水。

3.3 实验样本收集

(1) ELISA 样本收集与制备：辐照或给药刺激结束后 1 周，对小鼠进行腹腔注射麻醉，待麻醉药物起效后，按照眼球取血法将小鼠的血液收集于不含肝素的 1.5mL 无菌 EP 管中，每只小鼠血液样本收集完成后均需尽快将 EP 管放置于含有碎冰的容器内，操作过程中尽量避免溶血现象。待所有血液样本收集完成后，将其放置于 4℃冰箱中过夜，第二天将样本以 3000rpm、4℃、15min 离心取上清，并将上清用移液枪收集于不含内毒素的 200ul 无菌 EP 管中，放置于-20℃冰箱保存。

(2) 血常规样本收集：辐照或给药刺激结束后 1 周，对小鼠进行腹腔注射麻醉，待麻醉药物起效后，按照眼球取血法用含肝素的 1.5mL 无菌 EP 管收集约 300uL 血液，每只小鼠血液样本收集完成后均需尽快将 EP 管放置于含有碎冰的容器内，操作过程中尽量避免溶血现象，并尽快完成检测。

4. 细胞培养

小鼠卵巢颗粒细胞以 37°C、5%CO₂ 的条件培养于标准培养箱中，采用专用培养基培养（含 DMEM 培养基）。在实验过程中，根据细胞倍增时间，每 2-3 天换液一次，并在细胞长满整个培养皿的 70%-80% 时按照 1:2 的比例进行细胞传代。

5. 小鼠胎儿数量

辐照或药物刺激结束后 3 天，在雌性小鼠的右下腹通过腹腔注射方法给予注射 PMSG 8 IU，48 小时后采用同样的方法于雌鼠右下腹注射 Hcg 10 IU，在 Hcg 注射当天按照雌鼠：雄鼠=2:1 的比例进行合笼，并在合笼后第 1 天通过检查是否有阴道粘液栓的情况确定有无怀孕，有阴道粘液栓的雌鼠从原有鼠笼中取出单独饲养，并将单独饲养当天记为 D1，后于 D7 给予孕鼠腹腔注射麻醉，待麻醉起效后经颈椎脱臼法处死小鼠，在实验动物解剖台上解剖得到小鼠子宫，计数胎儿数量。

6. 细胞的药物毒性试验检测

本实验采用 CCK-8 法进行细胞毒性的检测。CCK-8 试剂主要包含水溶性四唑盐—WST[®]-8 和电子载体(1-Methoxy PMS)。WST[®]-8 具有高水溶性，它存在于细胞外而不渗透活细胞膜，可通过 1-Methoxy PMS 接受细胞线粒体内乳酸脱氢酶的辅酶 NADH 的电子而被还原，生成水溶性 WST[®]-8 甲臜产物，甲臜产物同样具有高度水溶性。之后用酶标仪测定甲臜产物在 450nm 波长处的 OD 值，OD 值大小与药物毒性情况成反比。

具体操作步骤为：

(1) 铺板：

(a) 消化：实验开始前，取处于对数生长期的小鼠卵巢颗粒细胞，用移液枪吸净培养皿内的培养基，加入 2mL 无菌 PBS 缓慢润洗后用移液枪吸净，紧接着往培养皿中加入 1mL 含 EDTA-胰酶，并轻轻晃动，保证胰酶分布于培养皿底部的所有表面，常温消化 3min，加入 3mL 专用培养基终止消化，用移液枪轻轻吹打保证细胞从培养皿上消化下来；

(b) 离心：微量移液枪将上述所有消化后混合液体全部转移至 15mL 无菌离心管内，离心机在常温环境下以 1000rpm 的速度离心 3min；

(c) 重悬：倾倒掉上层含胰酶的无细胞培养基，加入 3mL 专用培养基重悬；

(d) 计数：移液枪吸出 20uL 加至细胞计数板，用细胞计数机器进行细胞计数，总共计数 5 个视野，最终取平均数即为该细胞浓度；

(e) 调整浓度：根据前述细胞浓度，吸取一定体积的细胞混悬液至另一新的 15mL 离心管，加入适量专用培养基调整其最终浓度为 2.5×10^4 个/mL；

(f) 铺板：按照 5000 个/孔在 96 孔板每个孔内各加入 200uL 细胞悬液，铺板结束后轻轻拍打 96 孔板顶部及四周，使细胞在板内分布更加均匀。将 96 孔板水平放置于标准细胞培养箱中培养。在实验进行的过程中，实验样本外围的 96 孔板内按照 200uL/孔加入无菌 PBS，以防止在实验过程中因水分蒸发影响细胞生长状态而带来的误差。

(2) 药物处理：在铺板后一段时间，观察细胞贴壁情况及细胞形态无异常，根据既往研究，按照 40ug/mL 的给药浓度间隔 10 小时给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 共刺激 2 次，对照组给予同等体积的无菌 PBS 处理。每组设置复孔 6 个，每次药物处理完成后均需轻轻拍打 96 孔板使药物分布均匀。继续水平放置于标准细胞培养箱中培养。

(3) CCK-8 检测：在第二次药物刺激结束后 48 小时，自培养箱中取出待检测 96 孔板，移液枪吸去上清，每个孔内加入 200uL 无菌 PBS 洗涤三遍，尽可能清除每个孔内残留培养基。将 DMEM 培养基与 CCK-8 试剂原液按 9: 1 比例配制检测工作液，随后往每孔添加工作液 100 uL，细胞培养箱内避光孵育 2 小时后取出，使用酶标仪检测（吸收波长 450 nm）每孔吸光度（OD 值），并以 OD 值为检测指标作图。

7. 辐照后细胞活力检测

本实验采用 CCK-8 法进行细胞活力的检测。具体的实验原理如前所述，最终在 450nm 处检测到的 OD 值大小与细胞活性呈现正相关。

具体的操作步骤跟前述相比基本类似：

(1) 铺板。

(2) 辐照：在铺板后 36 小时，按照剂量梯度设置辐照剂量，小鼠卵巢颗粒细胞分别接受 3Gy、6Gy、9Gy、12Gy 及 15Gy 的 γ 射线辐照，每组设置复孔 6 个，在辐照结束后将 96 孔板继续水平放置于标准细胞培养箱中培养。

(3) CCK-8 检测：在辐照结束后 48 小时，自培养箱中取出待检测 96 孔板，移液枪吸去上清，每个孔内加入 200uL 无菌 PBS 洗涤三遍，尽可能清除每个孔内残留培养基。将 DMEM 培养基与 CCK-8 试剂原液按 9: 1 比例配制检测工作液，随后往每孔添加工作液 100 uL，细胞培养箱内避光孵育 2 小时后取出，使用酶标仪检测（吸收波长 450 nm）每孔吸光度（OD 值），并以 OD 值为检测指标作图。

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{各处理孔OD值} - \text{各空白孔OD值}}{\text{对照孔OD值} - \text{空白孔OD值}} \times 100\%$$

8. 酶联免疫吸附试验（ELISA 实验）

实验原理：本实验采用夹心法进行检测，简而言之，向已包被有目标抗体的工作微板中加入标准品或标本，以及可与目标抗体特异性结合的辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗体，在反应结束后将未结合的特异性抗体彻底洗净，并加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）底物。HRP 中含有的过氧化物酶可催化 TMB 生成蓝色的反应底物，并在反应体系中各种酸的催化下生成最终的黄色反应底物。反应结束后颜色的深浅和样品中的含量呈现正相关。通过酶标仪在测量 450nm 波长下的吸光度（OD 值），通过计算可得出具体的样品浓度。

具体操作步骤为：

(1) 实验前准备：在实验开始前，从冰箱中取出待测血清样本及 ELISA 试剂盒，在室温条件下（18-25℃）缓慢平衡 30min，并在室温条件下以 1000rpm 对血清进行离心 3min，保证血清都沉于 EP 管下半部分，注意血清不可反复冻融；

(2) 样本稀释：按照样本：样本稀释液=1:7 的比例将小鼠血清稀释，稀释过程中保证混匀充分，操作轻柔，避免产生气泡；

(3) 分组及加样：按照实验要求设置标准品孔及样品孔，每个样本设置 3 个复孔，在每个标准品孔中各加入 50uL 标准品，实验样品孔中各加入 50uL 实验样本，空白孔中不加；

(4) HRP 标记：除空白孔之外，在标准品孔和样本孔中每孔各加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的特异性检测抗体 100uL；

(5) 孵育：吸水纸吸净反应板表面的液体后，用封板膜封住各反应孔，在 37℃ 避光恒温箱中孵育 60min；

(5) 洗板：避光孵育结束后，从恒温孵箱中取出反应孔板，微量移液器去除反

应孔内的液体，将反应板反扣在吸水纸上轻轻拍打底部，接着往每孔加入 300uL 洗涤液，静置 75s，微量移液器吸净洗涤液，在吸水纸上拍干，如此重复洗板 3 次；

(6) TMB 显色：往每孔加入含有 TMB 的底物 A 和底物 B 各 50uL，在 37°C 避光恒温箱孵育 20min；

(7) 终止反应：避光孵育结束后，往每个孔中各加入反应终止液 50uL，并将反应板置入避光容器中；

(8) OD 值检测：用酶标仪检测各孔在 450nm 波长处的 OD 值，并绘制标准曲线，根据已知的标准品浓度计算各检测样本的具体浓度。

9. 小鼠血清肌酐水平检测

实验原理：小鼠血清中的肌酐可以在碱性环境中与苦味酸盐发生 Jaffe 反应，生成一种橘红色的苦味酸肌酐复合物，反应结束后的颜色深浅与肌酐的浓度成正比，运用酶标仪检测在 510nm 处吸光度（OD 值），通过计算可得出具体的样品浓度。

具体操作步骤为：

(1) 实验前准备：在实验开始前，从冰箱中取出待测血清样本，在室温条件下（18-25°C）缓慢解冻，解冻完成后，微量移液器轻轻混匀血清并吸取 0.05mL 至一新的 1.5mL 无菌 EP 管中，往该 EP 管中加入蛋白沉淀液 0.45mL，充分混匀，在 4°C 条件下以 3500×g 的速度离心 10min，离心结束后，吸取适量上清液加入新的 1.5 mL EP 管中，继续下一步操作；

(2) 标准品反应液的配制：未稀释的肌酐标准品浓度为 10mmol/L，在血清肌酐浓度检测之前，根据说明书的指示，用标准品稀释液将其稀释 100 倍至终浓度为 100 umol/L；

(3) 肌酐浓度检测步骤：按照下表分别设置各孔组，其中测定孔组每个样本均需设置 3 个复孔，每种试剂在操作过程中均需按照顺序依次添加，遵照“吸 1 打 2”的原则加入，尽量避免产生气泡；

表 1-1 小鼠 Cr 检测试剂盒各体系具体配置体积

加入物(uL)	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	150	(—)	(—)
肌酐标准品	(—)	150	(—)

血清无蛋白上清液	(一)	(一)	150
肌酐显色液	50	50	50
肌酐 Assay Buffer	50	50	50

4、OD 值检测：上述各溶液添加完毕后，充分混匀，在室温（18-25℃）中放置 15min，用酶标仪检测各孔在 450nm 波长处的 OD 值，分别为 $X_{标准}$ 、 $X_{测定}$ 。

$$\text{血清肌酐 (umol/L)} = \frac{X_{测定}}{X_{标准}} \times 100$$

10. 统计学分析

本部分涉及检测的实验均重复 3 次以上，所有数据都采用平均值±标准差（Means±SD）来表示。计量资料间的差异性分析采用了不配对的 t 检验进行， $P < 0.05$ 被认为在统计学上具有显著性差异。

三、实验结果

(1) 不同辐照剂量对小鼠生殖功能的影响

为了研究不同辐照剂量对小鼠卵巢生殖功能的具体影响，从而从生殖功能层面筛选出一个小鼠卵巢放射性损伤模型适当的照射剂量，我们将小鼠分成 7 组，分别为：对照组（0Gy）、0.5Gy 1 次组（0.5Gy*1）、0.5Gy 2 次组（0.5Gy*2）、1Gy 1 次组（1Gy*1）、1Gy 2 次组（1Gy*2）、2Gy 1 次组（2Gy*1）及 2Gy2 次组

（2Gy*2），所有辐照均为盆腔局部照射。在辐照结束后，通过促排卵并与性成熟雄鼠按照 2:1 合笼，在怀孕后第 7 天通过解剖小鼠子宫并计数胎儿数量。结果如图 1-2 所示，随着辐照总剂量的增加，怀孕小鼠的胎儿数量在逐渐较少，与对照相比，所有辐照组均有统计学差异，且在 2Gy*2 组，所有小鼠胎儿数量均为 0。

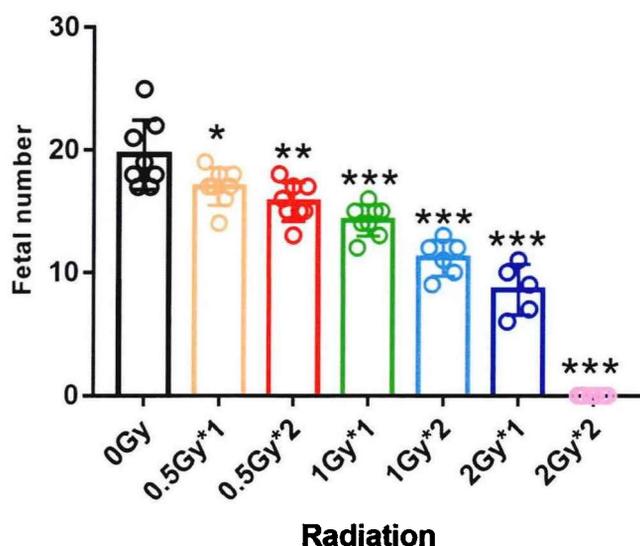


图 1-2 不同辐照剂量对小鼠生殖功能的影响 (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)

(2) 不同辐照剂量对小鼠卵巢激素水平的影响

更进一步，为了在小鼠卵巢激素水平层面筛选出一个小鼠卵巢放射性损伤模型适当的照射剂量，我们对小鼠的盆腔给予不同辐照次数及不同辐照剂量的局部照射。在辐照结束后一周，通过小鼠眼球取血制得血清，并利用 ELISA 方法检测小鼠血清中卵巢抗缪勒管激素 (AMH)，雌激素 (E_2)，卵泡刺激素 (FSH) 及黄体生成素 (LH) 水平。结果如图 1-3 所示，随着辐照总剂量的增加，辐照组小鼠卵巢的抗缪勒管激素 (AMH) 水平不断降低，除 0.5Gy*1 组之外的其他辐照组与对照组相比均有统计学差异 (图 1-3A)。在雌激素水平统计上，随着辐照总剂量的增加，辐照组小鼠卵巢的雌激素 (E_2) 水平不断降低，除 0.5Gy*1 组及 0.5Gy*2 组之外的其他辐照组与对照组相比均有统计学差异 (图 1-3B)。在小鼠的卵巢卵泡刺激素 (FSH) 及黄体生成素 (LH) 的统计上，结果显示，随着辐照总剂量的增加，辐照组小鼠卵巢的卵泡刺激素 (FSH) 及黄体生成素水平 (LH) 不断升高，所有辐照组与对照组相比均有统计学差异 (图 1-3C/D)。结合 1-1 小鼠生殖功能与 1-2 小鼠卵巢性激素水平的结果，我们初步选定 2Gy*1 为小鼠卵巢放射性损伤模型适当的造模条件，并在后续实验造模过程中以此为基础。

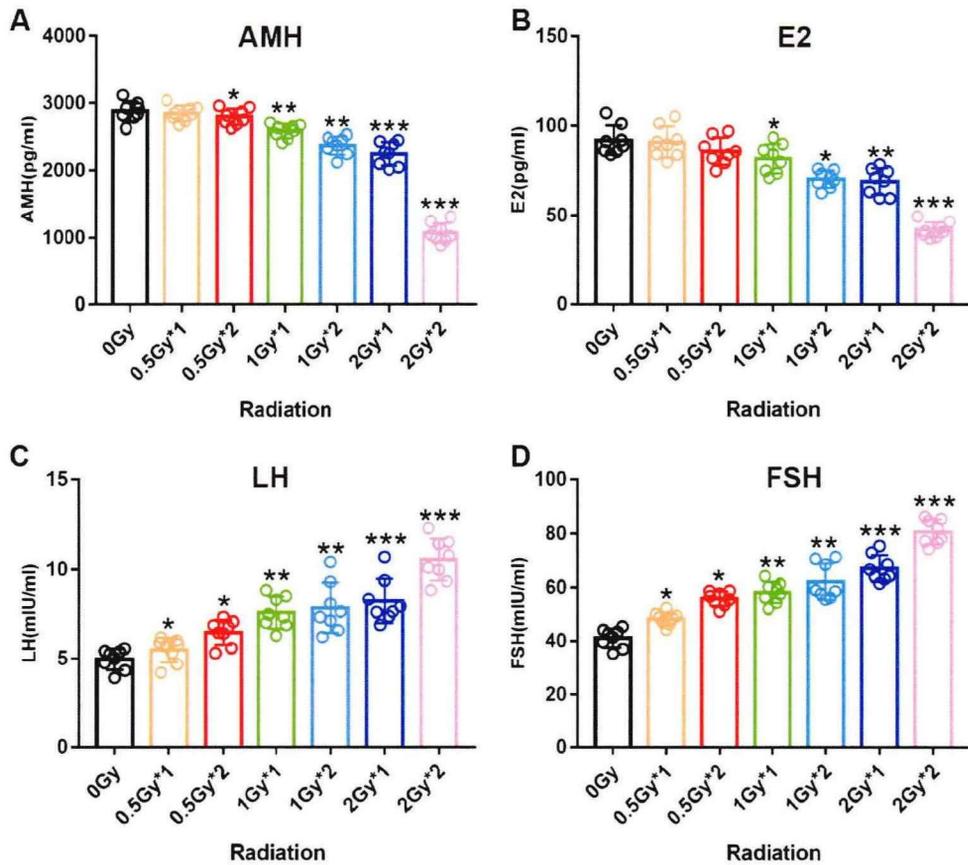


图 1-3 不同辐照剂量对小鼠卵巢激素水平的影响。(A) 不同辐照剂量对小鼠抗缪勒管激素 AMH 水平的影响；(B) 不同辐照剂量对小鼠雌激素 E2 水平的影响；(C) 不同辐照剂量对小鼠黄体生成素 LH 水平的影响；(D) 不同辐照剂量对小鼠卵泡刺激素 FSH 水平的影响。(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

(3) 不同辐照剂量对小鼠卵巢颗粒细胞活力的影响

为探讨不同辐照剂量对小鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响，从何筛选出细胞实验开展过程中合适的辐照剂量范围，我们将细胞分成对照组 (0Gy)、2Gy 辐照组、4Gy 辐照组、6Gy 辐照组、8Gy 辐照组、10Gy 辐照组及 12Gy 辐照组。在辐照结束后 24 小时通过 CCK-8 实验评估细胞的增殖活力，结果如图 1-9 所示，与对照组相比，辐照均会影响小鼠卵巢颗粒细胞的增殖，除 2Gy 组以外，其他组均有统计学差异。

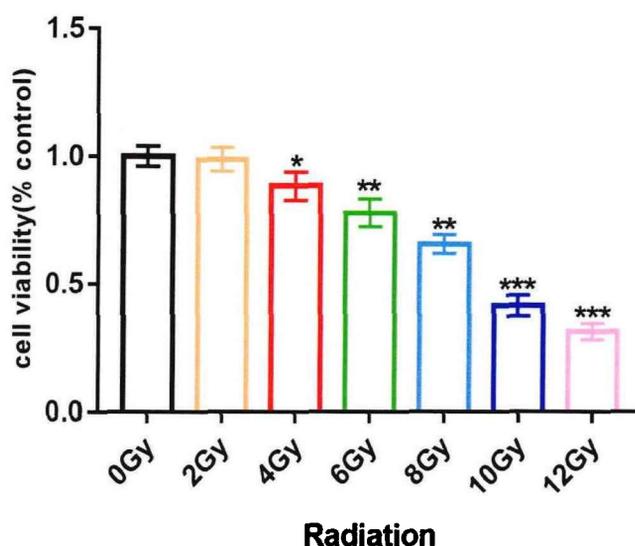


图 1-4 不同辐照剂量对小鼠卵巢颗粒细胞活力的影响 (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

(4) Zymosan-A 用药对小鼠肝肾功能的影响

在既往的关于 Zymosan-A 对小鼠肠道及血液系统辐射损伤防护研究过程中，我们初步证实了小鼠的用药剂量为 50mg/kg，但是在前期的研究过程中关于其肝肾毒性的探讨并未具体开展，在此，我们系统探讨了 Zymosan-A 对小鼠肝肾功能的影响。按照 50mg/kg 的剂量给小鼠腹腔注射 Zymosan-A，在给药结束后 1 周，通过小鼠眼球取血制得血清，并利用 ELISA 方法检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 及天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平，同时检测小鼠血清肌酐水平评估该药物对小鼠肾功能的影响。结果如图 1-3 所示，与对照组相比，给药组丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的水平未见明显统计学差异 (图 1-4 A/B)。在肌酐水平上，给药组与对照组相比也未见明显统计学差异 (图 1-4 C)。

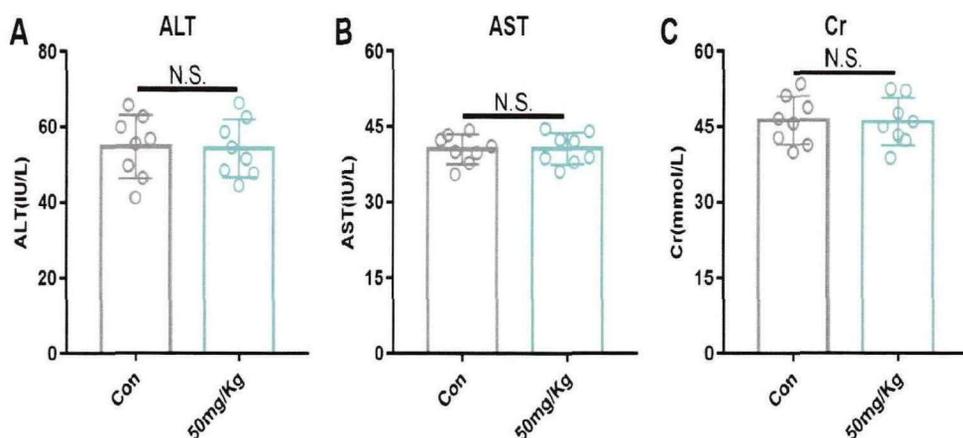


图 1-5 Zymosan-A 用药对小鼠肝肾功能的影响。(A) Zymosan-A 用药对小鼠丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的影响; (B) Zymosan-A 用药对小鼠天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的影响; (C) Zymosan-A 用药对小鼠肌酐 (Cr) 的影响。(N.S.: 无统计学意义)

(5) Zymosan-A 用药对小鼠血液学指标的影响

药物的慢性损伤除了会影响小鼠的肝肾功能以外,可能还会造成血液系统损伤,在此我们也对 Zymosan-A 用药后的血液学相关指标进行了检测,结果如图 1-5 所致,与对照组相比,给药组小鼠血液中白细胞计数、红细胞计数、血小板计数、血红蛋白计数以及中性粒细胞百分比均无明显统计学差异。

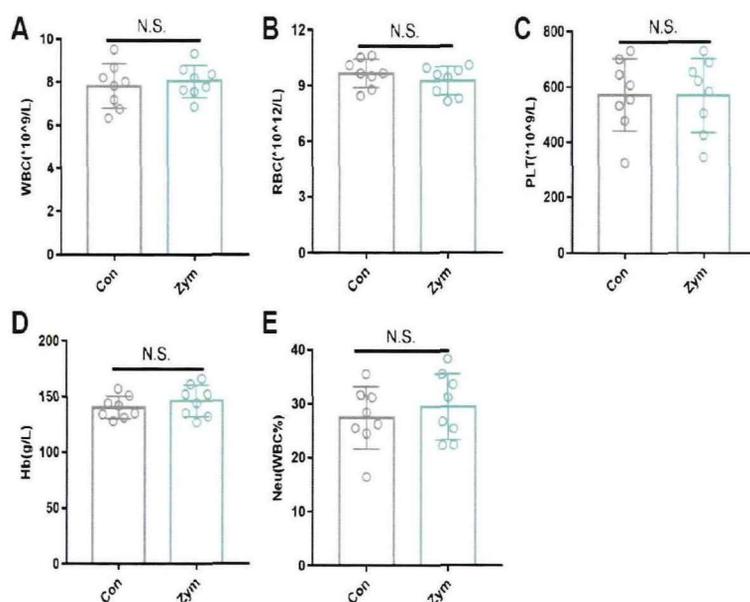


图 1-6 Zymosan-A 用药对小鼠血液学指标的影响。(A) Zymosan-A 用药对小鼠血液白细胞 (WBC) 的影响; (B) Zymosan-A 用药对小鼠血液红细胞 (RBC) 的影响; (C) Zymosan-A

用药对小鼠血液血小板的影响；(D) Zymosan-A 用药对小鼠血液血红蛋白的影响；(E) Zymosan-A 用药对小鼠血液中性粒细胞百分比的影响。(N.S.: 无统计学意义)

(6) Zymosan-A 用药对小鼠卵巢激素水平的影响

通过给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A, 并在给药结束后第七天, 经眼球取血制得血清, 利用 ELISA 方法检测小鼠性激素水平, 包括抗缪勒管激素 (AMH), 雌激素 (E_2), 卵泡刺激素 (FSH) 及黄体生成素 (LH)。结果如图 1-6 所示, 与对照组相比, 给药组卵巢性激素水平包括 AMH (图 1-6 A)、 E_2 (图 1-6 B)、FSH (图 1-6 C) 及 LH (图 1-6 D) 均未见明显统计学差异。

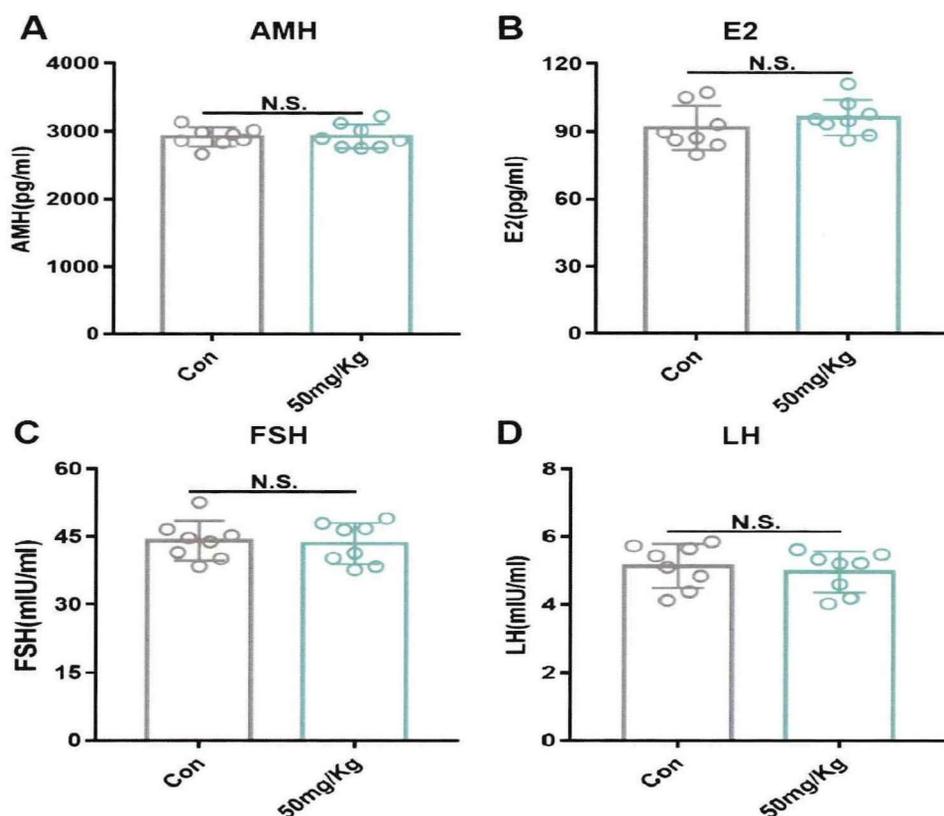


图 1-7 Zymosan-A 用药对小鼠卵巢激素水平的影响。(A) Zymosan-A 用药对小鼠抗缪勒管激素 AMH 水平的影响；(B) Zymosan-A 用药对小鼠雌激素 E_2 水平的影响；(C) Zymosan-A 用药对小鼠黄体生成素 LH 水平的影响；(D) Zymosan-A 用药对小鼠卵泡刺激素 FSH 水平的影响。(N.S.: 无统计学意义)

(7) Zymosan-A 用药对小鼠生殖功能的影响

为了验证 Zymosan-A 给药是否会影响小鼠生殖功能，通过腹腔注射 Zymosan-A，并在给药后给予雌鼠促排卵处理并与性成熟雄鼠按照 2:1 合笼，在怀孕后第 7 天通过解剖小鼠子宫并计数胎儿数量。结果如图 1-7 所示，与对照组相比，给药组小鼠胎儿数量未见明显统计学差异。

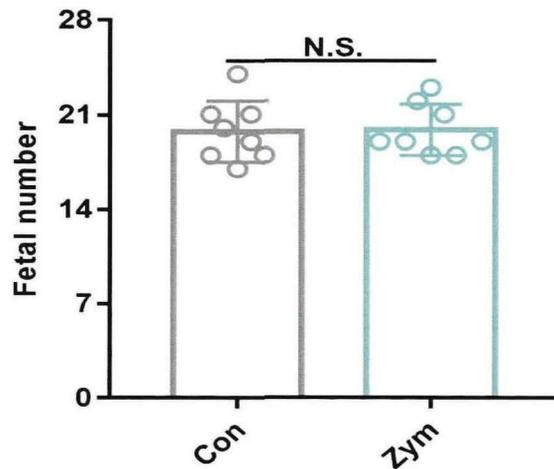


图 1-8 Zymosan-A 用药对小鼠生殖功能的影响。(N.S.: 无统计学意义)

(8) Zymosan-A 对小鼠卵巢颗粒细胞活力的影响

前期，我们在小鼠肠道辐射损伤防护中证实了 Zymosan-A 在细胞水平发挥辐射损伤防护的最佳用药剂量为 40ug/mL。卵巢作为维持女性正常生理功能的重要器官，其药物敏感性相对于肠道器官更敏感，所以，我们开展了 Zymosan-A 对小鼠卵巢颗粒细胞毒性的研究。按照 40ug/mL 的给药浓度间隔 10 小时两次给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 刺激，并在刺激结束后 24 小时利用 CCK-8 实验对细胞活力进行检测。结果如图 1-8 所示，与对照组相比，给药组细胞增殖率增加，且存在统计学差异，说明该浓度的 Zymosan-A 对小鼠卵巢颗粒细胞的增殖不仅没有明显危害，反而会有益处。

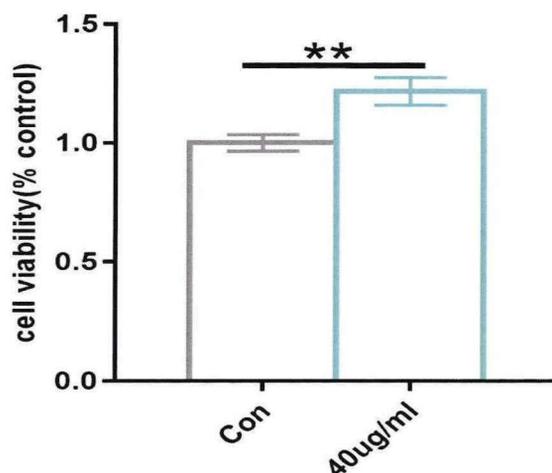


图 1-9 Zymosan-A 对小鼠卵巢颗粒细胞活力的影响。 (**: $P < 0.01$)

四、小结

通过本部分的研究，我们可以得出以下几方面结论：

(1) 辐照会引起小鼠继发性卵巢功能不全，具体表现为可引起小鼠卵巢抗缪勒管激素及雌激素水平降低，卵泡刺激素和黄体生成素水平升高，并可导致辐照后妊娠小鼠的胎儿数量降低；

(2) 通过在小鼠卵巢激素水平层面及生殖功能层面开展研究，初步筛选出小鼠卵巢放射性损伤模型适当的造模条件为 2Gy 单次盆腔局部照射；

(3) 前期研究开展过程中所用的 Zymosan-A 给药剂量：即小鼠 (50mg/kg)、细胞 (40ug/mL)，在小鼠体内未出现明显肝肾毒性及生殖毒性，且在细胞中不影响其增殖；

(4) 辐照会造成小鼠卵巢颗粒细胞的增殖率降低，且在 8Gy 以上，细胞的增殖率下降到 50% 以下，提示在后期细胞实验开展过程中，4Gy 至 8Gy 之间的辐照剂量是相对更合适的实验条件。

五、讨论

近些年来，“Oncofertility”概念的深入人心，使得国内外学者在卵巢辐射损伤防护的药物研究上取得了一定进展，但在既往研究报告中，存在着照射方式不统一，照射剂量差异大等缺点^[19-22]。本研究通过查阅文献，从实际实验条件出发，尽可能的模拟临床盆腔放疗过程，选择对小鼠进行盆腔局部放疗，按照分割照射原则，通

过设置辐射剂量梯度及次数差异, 综合小鼠卵巢性激素水平变化结果及小鼠胎儿数量差异的结果, 最终筛选出 2Gy 单次盆腔局部照射作为后续研究的造模条件。

Zymosan-A 又称酵母多糖, 现阶段主要由啤酒糖酵母真菌壁制备, 其化学性质是一类 β -葡聚糖, 结构中含有 50-57% 的 1-3 糖苷键^[23]。 β -葡聚糖因其结构特殊, 通常具有天然免疫活性, 有报告指出其可作为免疫调节剂发挥抗肿瘤、心血管保护及缓解胰岛素抵抗等多重作用^[24-26]。此外, β -葡聚糖在血脂调节方面也发挥着重要作用, 英美等国均在近些年强烈推荐其作为降血脂食品或药品的重要添加剂之一^[27]。

β -葡聚糖发挥具体效应不仅与其来源相关, 更与特异性的分子结构密切相关^[28]。为了更好地研究 Zymosan-A 卵巢辐射损伤防护作用, 我们在既往急性毒性实验结果的基础上, 进一步通过小鼠体内肝肾毒性和血液毒性以及体外细胞学实验来对 Zymosan-A 的慢性毒性进行相关论证, 为其作为卵巢潜在辐射损伤防护剂的假设提供理论支持。体内慢性动物毒性实验证实给予小鼠发挥有效辐射防护作用的药物浓度即 50 mg/kg 时, 其肝脏丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶浓度未见明显升高, 肌酐水平也未见明显差异。此外, 在血液学相关指标的评估上, 也未见明显统计学差异。生殖毒性实验的结果证实了给予小鼠腹腔注射 50mg/kg 的 Zymosan-A 不会影响其卵巢功能。在体外细胞毒性实验中我们选用小鼠卵巢颗粒细胞, 发现给予小鼠卵巢颗粒细胞发挥有效辐射防护作用的药物浓度即 40 ug/ml 时, 其细胞增殖率未见降低。

综上所述, 本部分的研究内容基本证实了 Zymosan-A 在小鼠体内和体外毒性较弱, 具备成为卵巢辐射损伤防护剂的可能性。在下一部分, 我们将通过一系列体内外实验具体研究其对小鼠及小鼠卵巢颗粒细胞的辐射防护效应。

参考文献

- [1] MELAN K, AMANT F, VERONIQUE-BAUDIN J, et al. Fertility preservation healthcare circuit and networks in cancer patients worldwide: what are the issues? [J]. *BMC cancer*, 2018, 18(1): 192.
- [2] 陈桂莲, 黄惠娟, 田黎明. 橄榄苦甙对卵巢辐射损伤的防治效果 [J]. *东南国防医药*, 2017, 19(06): 576-80.
- [3] 匡振坤, 杨云霜, 赵雪, et al. 补肾解毒方对核辐射致雌鼠生殖系统损伤的防护作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(07): 2816-9.
- [4] SIMSEK Y, GUROCAK S, TURKOZ Y, et al. Ameliorative effects of resveratrol on acute ovarian toxicity induced by total body irradiation in young adult rats [J]. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*, 2012, 25(4): 262-6.
- [5] AKTAS C, KANTER M, KOCAK Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation [J]. *Toxicology and industrial health*, 2012, 28(9): 852-63.
- [6] GAO W, LIANG J X, MA C, et al. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Ionizing Radiation Induced Ovarian Failure and Loss of Ovarian Reserve in Female Mouse [J]. *BioMed research international*, 2017, 2017(4176170).
- [7] LIU D, DONG S, LIU C, et al. CRX-527 induced differentiation of HSCs protecting the intestinal epithelium from radiation damage [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13(927213).
- [8] FENG Z, XU Q, HE X, et al. FG-4592 protects the intestine from irradiation-induced injury by targeting the TLR4 signaling pathway [J]. *Stem cell research & therapy*, 2022, 13(1): 271.
- [9] CHEN Y, CAO K, LIU H, et al. Heat Killed Salmonella typhimurium Protects Intestine Against Radiation Injury Through Wnt Signaling Pathway [J]. *Journal of oncology*, 2021, 2021(5550956).
- [10] RIEHL T E, ALVARADO D, EE X, et al. Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1003-13.
- [11] LIU C, ZHANG C, MITCHEL R E, et al. A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its' in vivo ligands in basal radio-resistance [J]. *Cell death & disease*, 2013, 4(e649).

- [12] GAO F, ZHANG C, ZHOU C, et al. A critical role of toll-like receptor 2 (TLR2) and its' in vivo ligands in radio-resistance [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(13004).
- [13] DU J, CHENG Y, DONG S, et al. Zymosan-a Protects the Hematopoietic System from Radiation-Induced Damage by Targeting TLR2 Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 457-64.
- [14] DU J, ZHANG P, ZHAO H, et al. The mechanism for the radioprotective effects of zymosan-A in mice [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2018, 22(4): 2413-21.
- [15] SAS A R, CARBAJAL K S, JEROME A D, et al. A new neutrophil subset promotes CNS neuron survival and axon regeneration [J]. *Nature immunology*, 2020, 21(12): 1496-505.
- [16] KOREN T, YIFA R, AMER M, et al. Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses [J]. *Cell*, 2021, 184(24): 5902-15.e17.
- [17] DE GRAAFF P, BERREVOETS C, RÖSCH C, et al. Curdlan, zymosan and a yeast-derived β -glucan reshape tumor-associated macrophages into producers of inflammatory chemo-attractants [J]. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 2021, 70(2): 547-61.
- [18] SILVA G S, SILVA D A, GUILHELMELLI F, et al. Zymosan enhances in vitro phagocyte function and the immune response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* [J]. *Medical mycology*, 2021, 59(8): 749-62.
- [19] 李孝鹏, 王章桂, 魏南. 表没食子儿茶素没食子酸脂联合阿米福汀对小鼠卵巢的辐射保护作用 [J]. *安徽医学*, 2020, 41(08): 867-71.
- [20] 刘云肖, 马惠荣, 陈景伟, et al. 滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(04): 470-3.
- [21] 赵粉琴, 安明霞, 丁晓南, et al. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨左归丸对 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线损伤大鼠卵泡凋亡调控作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(18): 12-9.
- [22] WU D, HAN R, DENG S, et al. Protective Effects of Flagellin A N/C Against Radiation-Induced NLR Pysin Domain Containing 3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis in Intestinal Cells [J]. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2018, 101(1): 107-17.
- [23] GANTNER B N, SIMMONS R M, CANAVERA S J, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2 [J]. *The Journal of*

- experimental medicine, 2003, 197(9): 1107-17.
- [24] WU L, ZHAO J, ZHANG X, et al. Antitumor effect of soluble β -glucan as an immune stimulant [J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 179(116-24.
- [25] WOUK J, DEKKER R F H, QUEIROZ E, et al. β -Glucans as a panacea for a healthy heart? Their roles in preventing and treating cardiovascular diseases [J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 177(176-203.
- [26] MO X, SUN Y, LIANG X, et al. Insoluble yeast β -glucan attenuates high-fat diet-induced obesity by regulating gut microbiota and its metabolites [J]. Carbohydrate polymers, 2022, 281(119046.
- [27] OTHMAN R A, MOGHADASIAN M H, JONES P J. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan [J]. Nutrition reviews, 2011, 69(6): 299-309.
- [28] DU B, MEENU M, LIU H, et al. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan [J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(16):

第二部分：Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究

一、前言

卵巢作为维持女性正常生理功能的重要器官，对放射线极其敏感，较低剂量的辐照就可以影响卵巢功能，导致出现继发性卵巢功能不全^[1,2]。卵巢功能不全又称卵巢早衰，是指女性在 40 岁之前就出现卵巢功能衰竭进而出现闭经的现象^[3,4]。卵巢早衰的特点是卵巢性激素水平紊乱和卵巢卵泡储备减少，这两者共同导致卵巢功能的下降和绝经期提前^[4]。卵巢功能不全患者体内雌激素水平较低，较低的雌激素水平会使患者出现月经不规律和妊娠失败，以及生育能力低下或不孕^[4]。雌激素分泌的减少也会导致多种更年期症状，如潮热、盗汗和失眠等^[3,4]。另外，卵巢功能过早丧失的远期影响还包括增加骨质疏松、心血管意外和神经认知障碍的终生风险^[4,5]。

放射性卵巢损伤除表现在卵巢组织本身之外，还可以通过卵巢效应器官的功能障碍表现出来。有研究提示，曾接受过放疗的育龄期女性，其在之后的妊娠结局上出现早期流产、早产、低出生体重儿等风险显著增加^[6,7]。

在本部分的研究中，我们以前一部分构建的卵巢放射性损伤动物模型为基础开展实验。通过比较不同组别间小鼠卵巢性激素水平、卵巢重量和器官系数、小鼠动情周期、妊娠率和妊娠后胚胎数量以及子代小鼠体重指标等差异来评价 Zymosan-A 对小鼠放射性卵巢损伤防护效应。此外，通过在小鼠卵巢颗粒细胞层面开展体外细胞学实验，评价 Zymosan-A 对卵巢细胞的抗辐射损伤效应。

二、材料和方法

(一) 实验材料

1. 实验动物

本实验所选用的小鼠遗传背景为：C57BL/6J，购置于上海吉辉实验动物饲养有限公司，周龄为 6-8 周，严格遵循我校动物伦理及管理指南进行。

2. 实验细胞

本实验所用到的小鼠卵巢颗粒细胞（CP-M050）购置于武汉普诺赛生命科技有限公司。

3. 主要实验试剂及耗材

Zymosan-A: Sigma-Aldrich 公司

0.9%生理盐水: 华仁药业股份有限公司

小鼠雌激素(E2)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)及抗缪勒管激素(AMH)

ELISA 检测试剂: 上海茁彩生物科技有限公司

细胞培养基: 武汉普诺赛生命科技有限公司

CCK-8 检测试剂盒: 日本同仁化学研究所

PMSG: 宁波第二激素厂

Hcg: 杭州动物药品厂

兽用即用型麻醉剂: 南京爱贝生物科技有限公司

结晶紫染料: 国药集团化学试剂有限公司

石蜡: 武汉谷歌生物科技有限公司

苏木素染料: 珠海贝索生物技术有限公司

吉姆萨染料: 珠海贝索生物技术有限公司

伊红染料: 珠海贝索生物技术有限公司

无水乙醇: 成都市科隆化学品有限公司

75%乙醇: 成都市科隆化学品有限公司

稀盐酸: 南京化学试剂股份有限公司

氨水: 北京华英生物技术研究所

二甲苯: 无锡新叶临化工贸易有限公司

Annexin V(FITC/PI)凋亡检测试剂盒: 北京全式金生物技术有限公司

DEPC 水(不含 DNA 酶及 RNA 酶): 上海碧云天生物技术有限公司

多聚甲醛: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司

Triton-100: 上海碧云天生物技术有限公司

PAGE 凝胶配制试剂盒: 上海雅酶生物医药科技有限公司

脱脂奶粉: 武汉赛维尔生物技术有限公司

三色预染蛋白 Marker: 上海雅酶生物医药科技有限公司

一抗稀释液: 上海碧云天生物技术有限公司

二抗稀释液: 上海碧云天生物技术有限公司

蛋白上样缓冲液: 上海雅酶生物医药科技有限公司

SDS-PAGE 电泳缓冲液(干粉): 广州硕谱生物(Biosharp)科技有限公司

转膜液: 南京金斯瑞生物科技有限公司

2.0 um PADF 膜: 美国 Millipore 公司

1mL 一次性无菌注射器: 浙江康德莱医疗器械股份有限公司

4. 主要实验仪器

小动物麻醉手术专用附属升温台: 江苏易核科学仪器有限公司

生物安全柜: 上海瑞仰净化装备有限公司

细胞培养箱: 美国 Thermo Fisher 公司

-80°C超低温冰箱: 美国 Thermo Fisher 公司

Nano Drop 分光光度计: 美国 Thermo Fisher 公司

变温水浴锅: 美国 Thermo Fisher 公司

涡旋混合器: 美国 Scilogex 公司

4°C离心机: 美国 Scilogex 公司

自动细胞计数仪: 上海百翱杰生物科技有限公司

15ml 管水平离心机: 湖南湘仪实验仪器有限公司

倒置生物显微镜: 日本 Olympus 公司

可调式恒温孵箱: 上海跃进医疗器械厂

纯水机: 美国 Millipore 公司

制冰机: 日本 SANYO 公司

高精度电子天平: 青岛精诚仪器仪表有限公司

实用电子天平: 上海衡际科学仪器有限公司

包埋机: 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司

切片机: 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司

脱水机: 意大利 DIAPATH 公司

组织摊片机：山东千司科学仪器有限公司

烤箱：天津莱玻璃仪器设备有限公司

包埋框：武汉赛维尔生物科技有限公司

蛋白电泳仪：美国 BIO-RAD 公司

凝胶电泳电源：美国 BIO-RAD 公司

中号水平电泳槽：美国 BIO-RAD 公司

电转膜仪器：南京金斯瑞生物科技有限公司

凝胶成像系统：广州博鹭腾生物科技有限公司

5. 抗体信息

表 2-1 该部分所用到的抗体信息对应表

名称	公司	种属	稀释比
C-caspase-3	CST	兔	1:1000
Bcl-2	CST	鼠	1:1000
BAX	CST	兔	1:1000
PCNA	CST	兔	1:1000
Tubulin	Proteintech	鼠	1:5000
HRP 标记山羊抗鼠	Servicebio	山羊	1:5000
HRP 标记山羊抗兔	Servicebio	山羊	1:5000

(二) 实验方法：

1. γ 射线造模

详见第一部分实验方法。

2. Zymosan-A 的配置

详见第一部分实验方法。

3. 实验分组与相关检测样本收集

3.1 实验动物分组

从上海吉辉实验动物饲养有限公司购入实验小鼠后，随机将雌性小鼠分为对照

组、单纯给药组、单纯辐照组和给药辐照组，每组 8 只，辐照组根据第一部分实验结果给予 2Gy (2Gy*1) 单次盆腔局部照射，在实验开始前均先适应性饲养于我校动物中心 1-3 周。

3.2 实验动物的处理

详见第一部分实验方法。

3.3 实验样本收集

(1) ELISA 样本收集与制备：详见第一部分实验方法。

(2) 卵巢组织样本收集：ELISA 样本收集结束后，以颈椎脱臼法处死小鼠，并将小鼠置于小动物解剖操作台上，仔细解剖小鼠盆腹腔，去除小鼠卵巢组织周围的脂肪，将小鼠双侧卵巢组织取出置于 DEPC 水中涮洗，取出卵巢组织用吸水纸上吸掉卵巢表面的液体，用精密电子天平对双侧卵巢组织进行称重。并将一侧卵巢组织固定在含 4% 的多聚甲醛的组织固定液中，另一侧卵巢组织置于 2.0ml 细胞冻存管中并迅速投入含液氮的容器中保存。

4. 细胞培养

详见第一部分实验方法。

5. 小鼠胎儿数量

详见第一部分实验方法。

6. 小鼠动情周期检测

正常小鼠的动情周期总时长约为 4-6 天，简而言之，即在 4-6 天之内，具有正常动情周期的雌性小鼠在体内激素水平的影响下依次出现动情前期、动情期、动情后期以及动情间期，仅当动情前期、动情期、动情后期及动情间期依次连续出现才记为一次规律的动情周期。如若上述四个时期未按照顺序出现，或小鼠持续处于某一时期无变化，则视为动情周期紊乱或无规律动情周期。

本实验中通过小鼠阴道脱落细胞形态学变化来判断小鼠具体的动情时期，从辐照后第三天开始，每天均进行小鼠动情周期评估。具体操作如下：

(1) 用左手固定住小鼠，使其腹部及会阴部充分暴露在操作者面前，右手持微量移液枪吸取 20 μ L 无菌生理盐水反复冲洗 3 遍小鼠的阴道，冲洗结束后用微量移液

器吸出全部冲洗液，并将小鼠重新放回鼠笼；

(2) 将移液枪内的液体均匀涂抹在经 75%酒精消毒过的载玻片表面，置于通风环境下自然干燥，分散面积不小于 $2 \times 2 \text{cm}^2$ ，避免因分散面积较小造成的细胞团块及细胞聚集，涂抹结束后用防酒精记号笔做好标记；

(3) 将载玻片水平放置于托盘内，往前述标记区域内滴加 500 μL 95%酒精，固定 5min；

(4) 在流动水流下洗去固定用酒精，吸水纸沾干表面液体后，往标记区域内滴加 500 μL 吉姆萨染液 A 液，染色 2min；

(5) 继续往吉姆萨染液 A 液表面滴加 2mL 吉姆萨染液 B 液，并用洗耳球吹出微风使 A 液和 B 液充分混合，继续染色 8min；

(6) 染色结束后，在流动水流下冲洗掉载玻片表面染料，置于通风条件下自然风干；

(7) 在光学显微镜下进行具体动情周期时期的评估。

评估标准：

动情前期：富含椭圆形有核上皮细胞，而白细胞及角质化上皮细胞很少；

动情期：富含片状角化上皮细胞，而白细胞和有核上皮细胞较少；

动情后期：富含白细胞，而有核上皮细胞和角化上皮细胞较少；

动情间期：阴道分泌物较少，只存在少量散在的白细胞、角化上皮细胞以及有核细胞

7. HE 染色

(1) 固定取材：将前述小鼠卵巢组织在含 4%多聚甲醛的组织固定液中固定 24h 以上，用眼科镊将固定完全的小鼠卵巢组织小心取出，用 75%酒精溶液洗涤 3 遍，每遍 5min，直至卵巢组织无明显甲醛刺激性气味后，将卵巢组织和相对应的标签放于包埋框内；

(2) 脱水浸蜡：将上述包埋框放置在脱水盒内，依次经梯度酒精脱水→醇苯混合液 10min→二甲苯 10min \times 2 次→65 $^{\circ}\text{C}$ 融化的石蜡 1h \times 3 次；

(3) 石蜡包埋：组织浸蜡后，标记好包埋框，将组织纵切面朝上放置于含有融化蜡液的包埋框中，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷却 12 小时后修整蜡块；

(4) 石蜡切片：修整蜡块后，将其放于切片机中，设置厚度为 4-5 μ m 进行切片，并将切片转移至载玻片上，置于烘箱中，设置温度 60 $^{\circ}$ C，烘烤 2h 后冷却至常温。待水烤干、石蜡烤化后取出常温保存备用；

(5) 脱蜡：将上述制备好的切片按照以下步骤进行脱蜡。环保型脱蜡透明液 I 20min \rightarrow 环保型脱蜡透明液 II \rightarrow 无水乙醇 I 5min \rightarrow 无水乙醇 II 5min \rightarrow 75%酒精 5min，最后在流动的自来水下面进行水洗 5min；

(6) 苏木素染色：在脱完蜡的切片表面滴加 500 μ L 的苏木素染液，染色 5min，染色结束后，在流动的自来水下面冲洗 2min，接着往切片表面滴加 200 μ L 苏木素分化液，反应 15s 之后在流动的自来水下面冲洗 2min，最后往切片表面滴加 400 μ L 的苏木素返蓝液进行返蓝，返蓝液滴加 3min 后在流动的的自来水下面进行冲洗 3min；

(7) 伊红染色：将切片依次在 85%酒精、95%酒精的反应容器内脱水 3min，之后往每个切片表面滴加 500 μ L 伊红染液，染色 5min，染色结束后在流动的自来水下面冲洗 3min；

(8) 封片：切片表面滴加中性树胶封片。

8. 小鼠卵泡计数

卵巢作为维持女性正常生理功能的重要器官，在下丘脑-垂体-性腺轴作用下产生周期性排卵的过程。根据卵泡形态及具体的发育阶段，可将卵泡分为原始卵泡、初级卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡及窦卵泡，此外，有极大部分不能发育为成熟卵泡的卵泡退化成为闭锁卵泡。将前述制备好经 HE 染色的卵巢病理切片在光学显微镜下进行连续卵泡计数。各级卵泡卵泡形态学特点如下：

原始卵泡：镜下主要表现为单层扁平卵巢颗粒细胞包绕卵母细胞；

初级卵泡：镜下表现为单层立方上皮样的卵巢颗粒细胞包绕卵母细胞；

窦前卵泡：镜下表现为卵泡周围开始出现窦腔；

窦卵泡：镜下表现为卵泡存在明显的窦腔；

闭锁卵泡：闭锁卵泡形态不一，常根据卵巢颗粒细胞的凋亡情况进行判断，当细胞凋亡时常表现为核固缩、核裂解以及核碎裂。

9. 酶联免疫吸附试验（ELISA 实验）

详见第一部分实验方法。

10.辐照后细胞活力检测

详见第一部分实验方法。

11.细胞凋亡检测

实验原理：正常细胞膜含有完整的磷脂双分子层，磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在双分子层内侧，在早期凋亡时，分布在细胞膜内侧的 PS 因细胞膜结构变化发生外翻。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，与外翻的 PS 具有高亲和力，我们根据上述特征用其来检测细胞的早期凋亡。碘化丙啶(PI)是一种常用的核酸染料，可以透过结构已经破坏了的凋亡中晚期细胞和坏死细胞的细胞膜，对细胞核进行染色，但不能透过细胞膜结构相对完整的正常细胞和发生早期凋亡细胞的细胞膜。FITC 和 PI 在不同波长的激发光照射下显现出不同颜色，根据以上特点及颜色差异，同时使用 Annexin V-FITC 与 PI-PE 染色，可区分细胞的具体凋亡时期。具体操作步骤如下：

(1) 铺板：

(a) 消化：实验开始前，取处于对数生长期的小鼠卵巢颗粒细胞，用移液枪吸净培养皿内的培养基，加入 2mL 无菌 PBS 缓慢润洗后用移液枪吸净，紧接着往培养皿中加入 1mL 含 EDTA-胰酶，并轻轻晃动，保证胰酶分布于培养皿底部的所有表面，常温消化 3min，加入 3mL 专用培养基终止消化，用移液枪轻轻吹打保证细胞从培养皿上消化下来；

(b) 离心：移液枪将含有细胞及胰酶的培养基全部转移至 15mL 离心管中，离心机 1000rpm 离心 3min；

(c) 重悬：倾倒掉上层含胰酶的无细胞培养基，加入 3mL 专用培养基重悬；

(d) 计数：移液枪吸出 20 μ L 加至细胞计数板，用细胞计数机器进行细胞计数，总共计数 5 个视野，最终取平均数即为该细胞浓度；

(e) 铺板：调整细胞浓度后，按照 2×10^5 个/孔在 12 孔板每个孔内各加入 1mL 细胞悬液，铺板结束后轻轻拍打 12 孔板顶部及四周，使细胞在板内分布更加均匀。将 12 孔板水平放置于标准细胞培养箱中培养。

(2) 给药：在辐照前 12 小时，观察细胞贴壁情况及细胞形态无异常，按照 40 μ g/mL 的给药浓度间隔 10 小时给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 刺激 2 次，对照组给予同等体积的无菌 PBS 处理。每组设置复孔 3 个，每次药物处理完成后均需轻轻拍打 12 孔板使药物分布均匀。继续水平放置于标准细胞培养箱中培养。

(3) 辐照：在铺板后 36 小时，按照第一部分辐照剂量筛选结果，给予卵巢颗粒细胞 8Gy 的单次 γ 射线辐照。在辐照结束后将 12 孔板继续水平放置于标准细胞培养箱中培养。

(4) 细胞收集：在照射结束后 24 小时，从细胞培养箱中取出 12 孔板，将细胞上清一一对应的收集于 1.5mLEP 管内，加入适量胰酶消化 3min，再将细胞上清重新加回原培养孔中终止消化，重悬细胞后，将细胞悬液一一对应的收集于前述 EP 管内，以 4°C、1500rpm 条件离心 3min。

(5) 洗涤：用微量移液器去除细胞上清，每个 EP 管内加入 1mL 无菌预冷的 PBS 重悬细胞，再次以前述离心条件离心 3min，此过程重复 3 遍。

(6) 分装：离心结束后每个 EP 管内加入 1mL 1X Binding buffer 重悬细胞，并用微量移液器吸取 20uL 重悬液加入新的无菌 1.5mL EP 管内，此过程操作过程中需注意所有样本要一一对应。

(7) 染色：按照重悬液：Annexin V-FITC 染液=10:1 的比例往每个 EP 管内加入 FITC 染液，并用微量移液器充分混匀，避光孵育 25min，之后按照相同比例往每个 EP 管内加入 PI-PE 染液，充分混匀后，避光孵育 5min。

(8) 检测：往每个 EP 管内加入 1mL 无菌 PBS，将样本置入流式细胞检测仪器上按标准操作流程检测。

12. 细胞克隆

(1) 在实验开始前 36 小时，取处于对数生长期的小鼠卵巢颗粒细胞，经细胞消化、离心、重悬后制成单细胞悬液；

(2) 紧接着按照下表所示的细胞接种密度将小鼠卵巢颗粒细胞接种在 6 孔板内，每组设置 3 个复孔，铺板结束后将 6 孔板置于 37°C 含 5%CO₂ 的标准细胞培养箱内培养；

表 2-2 细胞克隆实验中细胞密度与照射剂量间对应表

照射剂量 (Gy)	细胞密度 (个/孔)
0	600
2	1200

4	2400
8	4800

(3) 铺板结束后 24 小时, 对细胞进行换液, 并按照 40ug/mL 的浓度浓度间隔 10 小时给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 刺激 2 次, 对照组给予同等体积的无菌 PBS 处理;

(4) 按照前述照射条件分别给予细胞不同剂量的辐照, 辐照结束后将 6 孔板继续置于 37°C 含 5%CO₂ 的标准细胞培养箱内培养;

(5) 培养过程中每 2-3 天肉眼观察一次克隆形成情况, 大约在辐照后 12-16 天, 6 孔板中可见小的细胞团块, 此时取出 6 孔板, 在光学显微镜下观察确定非细菌及真菌污染形成的团块后, 小心去除培养基, 每孔加入 2mL 无菌 PBS 清洗 2 遍;

(6) 固定: 每孔加入 2mL 含 4%多聚甲醛的细胞固定液, 在室温条件下 (18-25°C) 固定 20min, 然后用移液器吸去各孔内的多聚甲醛;

(7) 染色: 每孔加入 2mL 结晶紫染液, 在室温条件下 (18-25°C) 染色 15 分钟;

(8) 洗板: 染色结束后, 在流动的自来水下方对 6 孔板进行清洗, 以去除培养板中的残留染色液;

(9) 拍照及统计分析: 在室温条件下晾干 6 孔板, 用细胞克隆分析仪器进行拍照, 同时进行克隆数目的计数和统计分析。

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{最终菌落形成数目}}{\text{初始细胞接种数目}} \times 100\%$$

13. Western-Blot 实验

(1) 样本制备:

(a) 自液氮中取出装有小鼠卵巢组织的细胞冻存管, 将卵巢组织取出, 置于不含蛋白酶的 1.5mL 无菌 EP 管内, 每个管内添加两枚 1mm 经无水乙醇消毒并晾干的钢珠, 再往管内添加 300uL 预先按照蛋白裂解液: 蛋白酶抑制剂=100:1 配置好的蛋白裂解工作液。

(b) 将 EP 管置于低温研磨震荡仪中, 按照操作流程以 55-60Hz 频率震荡 30s, 间隔 10s, 循环 3 次。

(c) 破碎结束后的将 EP 管转至低温离心机中, 以 4°C、3000rpm 离心 10 分钟;

(d) 微量移液枪吸取 200uL 上清转至新的不含蛋白酶的 1.5mL 无菌 EP 管内,

用超声波破碎仪中超声破碎 6s, 然后将 EP 管置于低温高速离心机 13500g 离心 15min;

(e) 微量移液枪吸取 150 μ L 上清转移至新的 1.5ml EP 管中备用。

(2) 蛋白浓度测定:

(a) 稀释待测样本: 将上述步骤制备的蛋白样本吸取 5 μ l 至新的 EP 管中, 加入 45 μ l PBS 稀释 10 倍;

(b) 配置显色工作液: 本实验使用雅酶 Omni-Rapid™ 快速蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。待测样本做 3 个复孔, 根据标准品的个数 (8 个) 及需定量的组织样本个数 (n 个) 计算所需显色工作液 A 液总量 $(8+3n)\times 200\mu\text{l}$ 。紧接着按照该产品的操作说明书, 将 A 液与 B 液按照 50:1 体积混匀;

(c) 在 96 孔板中划好工作区域, 取待检测的样品与标准品各 20 μ l 加入相应区域内, 标准品 1-8 浓度详见下表:

表 2-3 蛋白浓度测定中标准品与浓度对应表

标准品	1	2	3	4	5	6	7	8
浓度 (mg/mL)	0	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0

(d) 定量检测: 各样本孔加好之后, 继续往每孔中加入 200 μ l 提前配置好的显色工作液, 轻轻拍打 96 孔板, 使其充分混匀, 在室温条件下 (18-25 $^{\circ}$ C) 孵育 5min, 用酶标仪检测 480nm 波长的 OD 值, 根据结果绘制标准品拟合曲线, 最后按照已知标准品浓度推算出各待测样本蛋白浓度。

(3) 蛋白变性: 使用蛋白裂解液及 5 \times Loading Buffer 将已测好浓度的蛋白样本稀释成终浓度为 1mg/ml, 并放置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴锅煮 10min 完成蛋白变性。

(4) 配胶:

本实验使用上海雅酶生物医药科技有限公司生产的 PAGE 凝胶快速制备试剂盒进行制胶, 具体操作步骤如下 (以一块胶为例):

(a) 5mL 移液枪分别吸取 4mL 的下层凝胶缓冲液及下层胶加入干燥清洁容器中充分混匀;

(b) 按照 1mL 混合液: 10 μ l 促凝剂的比例向上述容器中加入 80 μ L 的促凝剂,

并充分混匀；

(c) 用 1mL 微量移液枪将上述混合液小心注入制胶玻璃板中，添加结束后，在液面上方加入适量的去离子水，压平下层胶；

(d) 室温条件下静置 15min，当下层胶与去离子水之间出现明显分界线，小心去除去离子水，并用吸水纸吸干残留的液体；

(e) 用 1mL 微量移液枪分别 1mL 的下层凝胶缓冲液及下层胶加入干燥清洁容器中充分混匀，并添加 20 μ L 促凝剂充分混匀；

(f) 用 1mL 微量移液枪将上述混合液小心注入下层胶上方，添加结束后，插入梳齿板；

(g) 在室温条件下静置 10min，待上层胶凝固后，取出制胶玻璃板，放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

(5) 电泳：

(a) 自冰箱内取出电泳玻璃板固定于电泳槽内，加入电泳液检查其密闭性良好后，继续加入配制好的 SDS-PAGE 电泳液，随后垂直拔出梳齿板；

(b) 自-80 $^{\circ}$ C冰箱里取出蛋白样，在冰上缓慢解冻后，在振荡器上震荡混匀 15s，在加样孔每孔加入样品各 10 μ l，样品左侧连续两个孔道加入预染蛋白 marker 5 μ l，样品右侧一个孔道加入预染蛋白 marker 5 μ l，确认好正负极位置正确后盖上电泳盖，设定电泳条件：恒压，30V，25min \rightarrow 恒压，120V，60min。

(6) 转膜：

(a) 将提前配置好 1 \times 转膜液置于 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜冷藏；

(b) 将 PVDF 膜裁剪成 8.5 \times 5.5cm 的大小，用塑料镊将其转运至包含甲醇溶液的容器内激活 30s；

(c) 将电泳完成的玻璃板用去离子水冲洗两遍，撬胶板沿玻璃板的左上角小心撬开，接着用切胶板将预制胶切至合适大小，放入预冷的转膜液中平衡；

(d) 将转膜夹置于托盘中，使其黑面朝下，白面朝上，倒入适量转膜液润湿海绵垫及滤纸，按海绵垫（一层） \rightarrow 滤纸（两层） \rightarrow 胶 \rightarrow PVDF 膜 \rightarrow 滤纸（两层） \rightarrow 海绵垫的顺序依次放置，并用滚轮小心赶走之间的气泡，合上转膜夹；

(e) 将转膜夹按正负极对应的顺序放置到转膜槽中，在转膜槽内放置合适数量

的冰盒，之后添加足够量的转膜液使其至少漫过 PVDF 膜，并将整个电泳槽放置在含包含碎冰的泡沫箱内，接通电源，300mA 恒流转膜 120min。

(7) 封闭：

(a) 用微量称量天平称取 2.0g 脱脂奶粉加入 1×TBST 40mL 配制成 5%浓度的封闭液置入 4°C冰箱中备用；

(b) 转膜结束后，将 PVDF 膜自转膜夹中取出，放置到装有提前配制好的预冷牛奶中，使牛奶充分漫过 PVDF 膜，并于室温条件下（18-25°C）在摇床上封闭 1h。

(8) 一抗孵育：

(a) 封闭结束后，将 PVDF 膜自牛奶中取出，在干净容器内加入 10mL 1×TBST，在摇床上洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 5min；

(b) 按照前述抗体配置浓度吸取适量一抗原液加入足量的一抗稀释液配制一抗孵化液；

(c) 按照具体的分子大小裁剪 PVDF 膜，并将裁剪好的 PVDF 膜加入具体的一抗孵化液中，在 4°C摇床上过夜孵育。

(9) 二抗孵育：

(a) 一抗孵育结束后,将 PVDF 膜自含有一抗孵化液的 15mL 离心管内取出，用 1×TBST 洗涤 3 次，每次 5min；

(b) 按照前述抗体稀释浓度吸取适量二抗原液，加入足量的二抗稀释液配制二抗孵化液；

(c) 室温条件下（18-25°C），将 PVDF 膜放进含有二抗孵化液的离心管内，在室温条件下（18-25°C）的摇床上孵育 1h。

(10) 显影曝光：

(a) 二抗孵育结束后，将 PVDF 膜取出，用 1×TBST 洗涤 3 次，每次 5min；

(b) 配制 ECL 发光工作液，取避光 1.5mLEP 管，按照 A 液：B 液=1:1 的比例用微量移液枪吸取适量液体，并充分混匀；

(c) 吸取适当发光液均匀滴在 PVDF 膜上，轻轻晃动使其分布均匀，室温避光反应 1min 后置于曝光机曝光。

14. 统计学分析

本部分所有实验均重复 3 次及以上，所有统计资料最终都用平均值±标准差 (Means±SD) 来表示。计量资料间的差异性分析，两组之间的差异比较采用非配对的 t 检验。3 组及 3 组以上之间的差异分析，若满足正态分布且方差齐，采用单因素方差分析 (ANOVA)，进一步两两之间的比较采用 Bonferroni 检验。若方差不齐，则采用 Mann-Whitney 检验。计数资料间的差异性分析采用了 fisher 确切概率法， $P < 0.05$ 被认为在统计学上具有显著性差异。

三、实验结果

(1) Zymosan-A 对辐照小鼠的体重变化无影响

小鼠随机分组后，进行了初始体重称量，结果显示各组之间小鼠体重未见明显差异。按照实验条件，给予辐照组小鼠 2Gy 单次盆腔局部照射，照射结束后 7 天、第 14 天、第 35 天及第 56 天分别称量单纯辐照组及辐照给药组小鼠静息状态下的体重，并进行统计学分析，结果如图 2-1 所示，单纯辐照组小鼠与辐照给药组小鼠体重间未见显著差异。

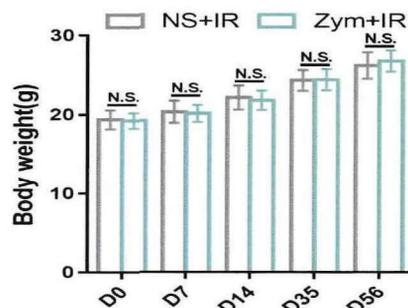


图 2-1 辐照后母代小鼠体重变化。(IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组)

(N.S.: 无统计学意义)

(2) Zymosan-A 可以减轻辐照引起的小鼠卵巢组织及卵巢器官系数的下降

将小鼠随机分成对照组、给药组、单纯辐照组及给药辐照组，在辐照后第七天称量小鼠体重，并解剖得到小鼠卵巢组织进行称重，结果显示：辐照会引起小鼠卵巢组织重量减轻，辐照前给予 Zymosan-A 会一定程度提高小鼠卵巢组织重量，与单

纯辐照组相比，二者间具有统计学差异（图 2-2A）。在卵巢器官系数方面，与对照组相比，单纯辐照组小鼠的卵巢器官系数明显减轻，在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A 会一定程度逆转这个趋势，与单纯辐照组相比，二者在统计学上也具有明显差异（图 2-2B）。

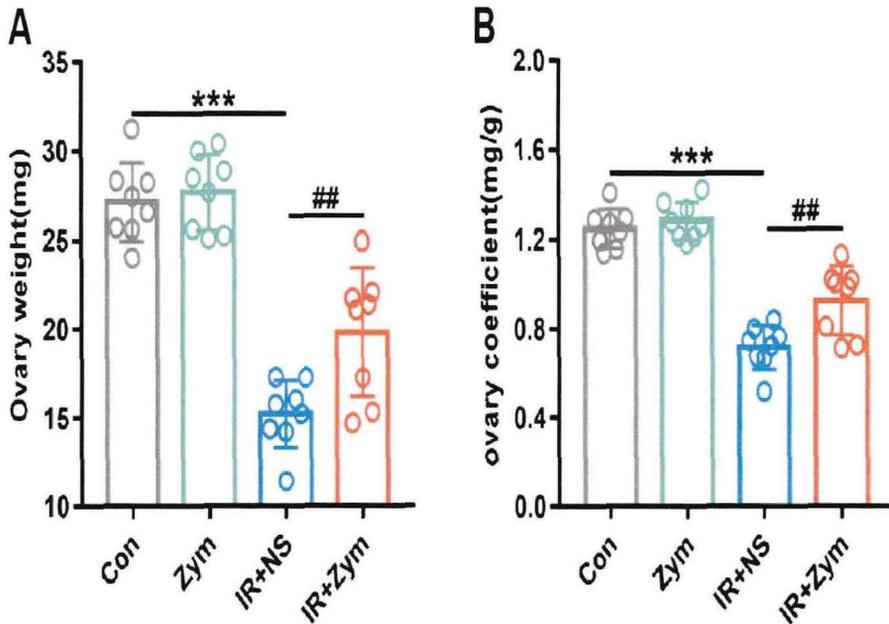


图 2-2 各组小鼠卵巢重量及卵巢组织器官系数变化。（A）辐照后小鼠卵巢组织湿重变化。

（B）辐照后小鼠卵巢组织器官系数变化。（Con:对照组；Zym:单纯给药组；IR+NS: 单纯辐照组；IR+Zym: 给药辐照组）（***: $P < 0.001$; #: $P < 0.01$ ）

（3）Zymosan-A 可有效改善辐照引起的小鼠动情周期紊乱

在辐照后第 3 天开始，我们开始检测各组小鼠的动情周期变化。如表 2-1 所示：对照组小鼠及单纯给药组小鼠在三批次的实验过程中，所有的实验对象均存在正常的动情周期，而辐照组及辐照给药组在三批次实验过程中均有部分小鼠出现了动情周期紊乱，相比于单纯辐照组小鼠有 $72.22 \pm 9.62\%$ 的小鼠出现了动情周期紊乱，辐照给药组的小鼠动情周期紊乱率为 55.56 ± 9.62 ，二者在统计学上存在差异。

分组	规律比	紊乱比
Con	100	0
Zym	100	0
IR+NS	27.78±9.62	72.22±9.62
IR+Zym	44.44±9.62	55.56±9.62(**)

表 2-4 各组小鼠的动情周期紊乱率。(Con:对照组; Zym:单纯给药组; IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (**: $P < 0.01$)

(4) Zymosan-A 可有效改善辐照引起的小鼠卵巢激素水平紊乱

在辐照结束后的第 7 天, 将各组小鼠进行腹腔注射麻醉, 并通过眼球取血制得血清, 运用 ELISA 方法检测各组小鼠的血清抗缪勒管激素 (AMH)、雌激素 (E2)、卵泡刺激素 (FSH) 及黄体生成素 (LH) 水平, 并进行统计学分析。结果如图 2-3 所示, 与单纯辐照组相比, 在辐照前给予小鼠应用 Zymosan-A 会显著升高辐照小鼠的抗缪勒管激素 (图 2-3A) 及雌激素 (图 2-3B) 水平, 同时可明显降低辐照小鼠的卵泡刺激素 (图 2-3C) 及黄体生成素 (图 2-3D) 水平。

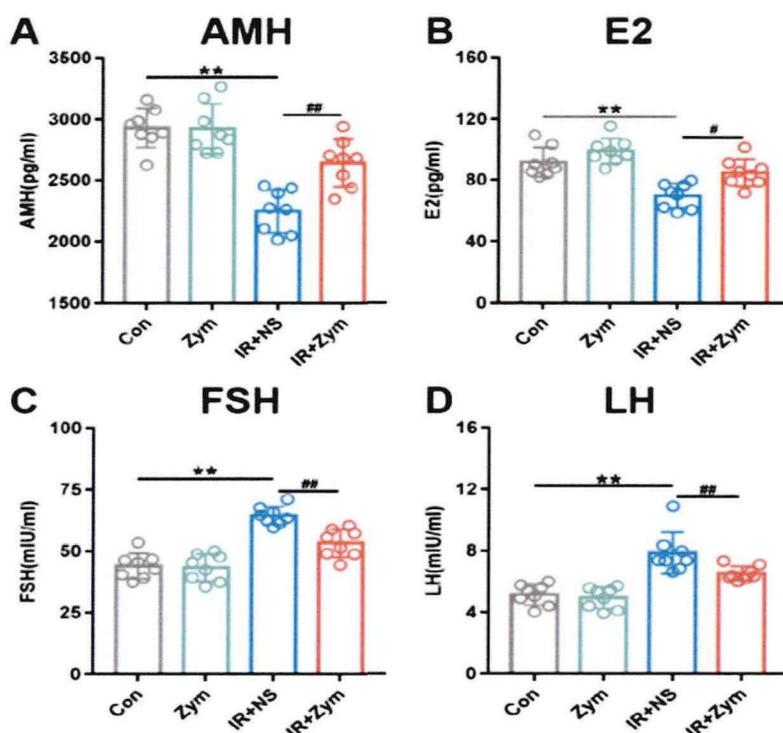


图 2-3 Zymosan-A 可有效改善辐照引起的小鼠卵巢激素水平紊乱。(A) Zymosan-A 对小鼠

抗缪勒管激素 AMH 的保护性作用；(B) Zymosan-A 对小鼠雌激素 E2 的保护性作用；(C) Zymosan-A 对小鼠雌激素 FSH 的保护性作用；(D) Zymosan-A 对小鼠雌激素 LH 的保护性作用。
(Con:对照组; Zym:单纯给药组; IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (***: $P < 0.001$; #: $P < 0.01$)

(5) Zymosan-A 可有效改善辐照小鼠的生殖功能

如前所述, 辐照会损害小鼠的生殖功能, 显著减少辐照后妊娠小鼠的胚胎数量。在此部分, 我们通过辐照前给予小鼠腹腔注射一定剂量的 Zymosan-A, 辐照结束后, 通过促排卵并与性成熟雄鼠按照 2:1 比例合笼, 在合笼后第一天通过观察小鼠阴道粘液栓情况判断其是否受孕, 并在怀孕后第 7 天通过解剖小鼠子宫并计数胎儿数量。结果如图 2-4 A 所示, 与单纯辐照组相比, 辐照给药组小鼠在妊娠率方面一定程度增加, 二者存在统计学差异。在妊娠小鼠胚胎数量的统计上, 结果如图 2-4 B 所示, 与单纯辐照组相比, 辐照给药组小鼠胎儿数量明显增加。

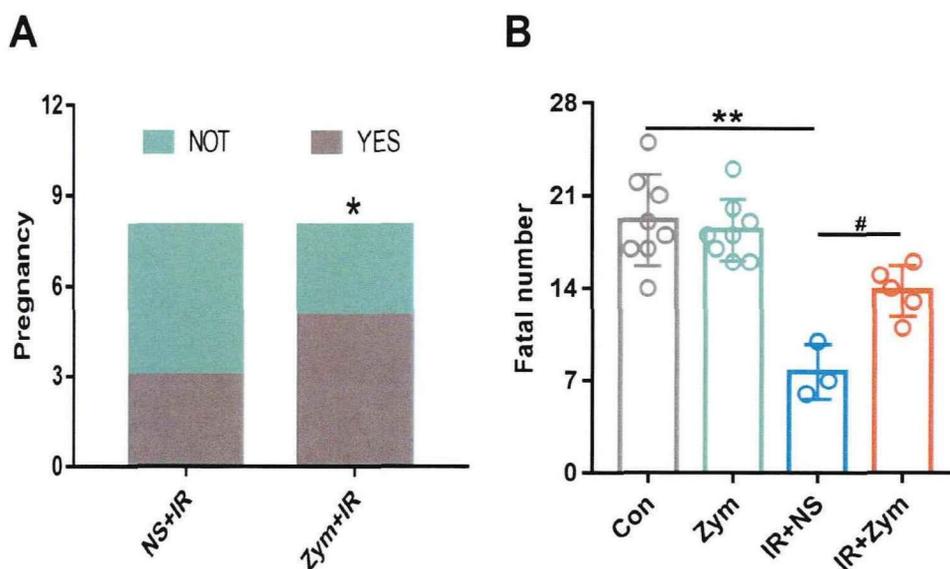


图 2-4 Zymosan-A 可有效改善辐照小鼠的生殖功能。(A) 不同组别小鼠的妊娠率; (B) 不同组别小鼠的胎儿数量。(Con:对照组; Zym:单纯给药组; IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (**: $P < 0.01$; #: $P < 0.05$)

(6) Zymosan-A 可以改善辐照引起的卵泡成熟障碍

在辐照结束后的第 7 天，我们经解剖得到小鼠卵巢组织，固定后切片进行苏木素-伊红染色，并按照国内外相关实验操作标准对各组小鼠的卵泡进行计数，从而评估辐照对卵巢组织中卵泡发育情况的影响以及 Zymosan-A 用药的保护性作用。根据卵泡形态学的差异对各级卵泡数量进行统计，包括：原始卵泡数目、初级卵泡数目、窦前卵泡数目、窦卵泡数目、闭锁卵泡数目及总体卵泡数目。如图 2-5 所示，Zymosan-A 的用药不影响小鼠卵泡成熟，在各级卵泡计数上及总卵泡数量统计上，与对照组相比均未见明显统计学差异。相反，与对照组相比，辐照会引起小鼠的卵泡成熟障碍。在原始卵泡计数上，辐照组小鼠的原始卵泡数量明显减少，二者间存在统计学差异，辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，其原始卵泡数量减少的比例显著降低（图 2-5B）。在初级卵泡（图 2-5C）、窦前卵泡（图 2-5D）及窦卵泡（图 2-5E）的计数上，也呈现相同的趋势。辐照会显著增加小鼠卵巢闭锁卵泡数量，辐照前给予 Zymosan-A 预处理，会一定程度的减少受辐照小鼠卵巢中闭锁卵泡数量，二者在统计学上存在差异（图 2-5F）。在总卵泡数量的统计上，与对照组相比，辐照组小鼠总卵泡数量明显减少，Zymosan-A 可一定程度逆转这个趋势，增加辐照小鼠卵巢总卵泡数量（图 2-5G）。

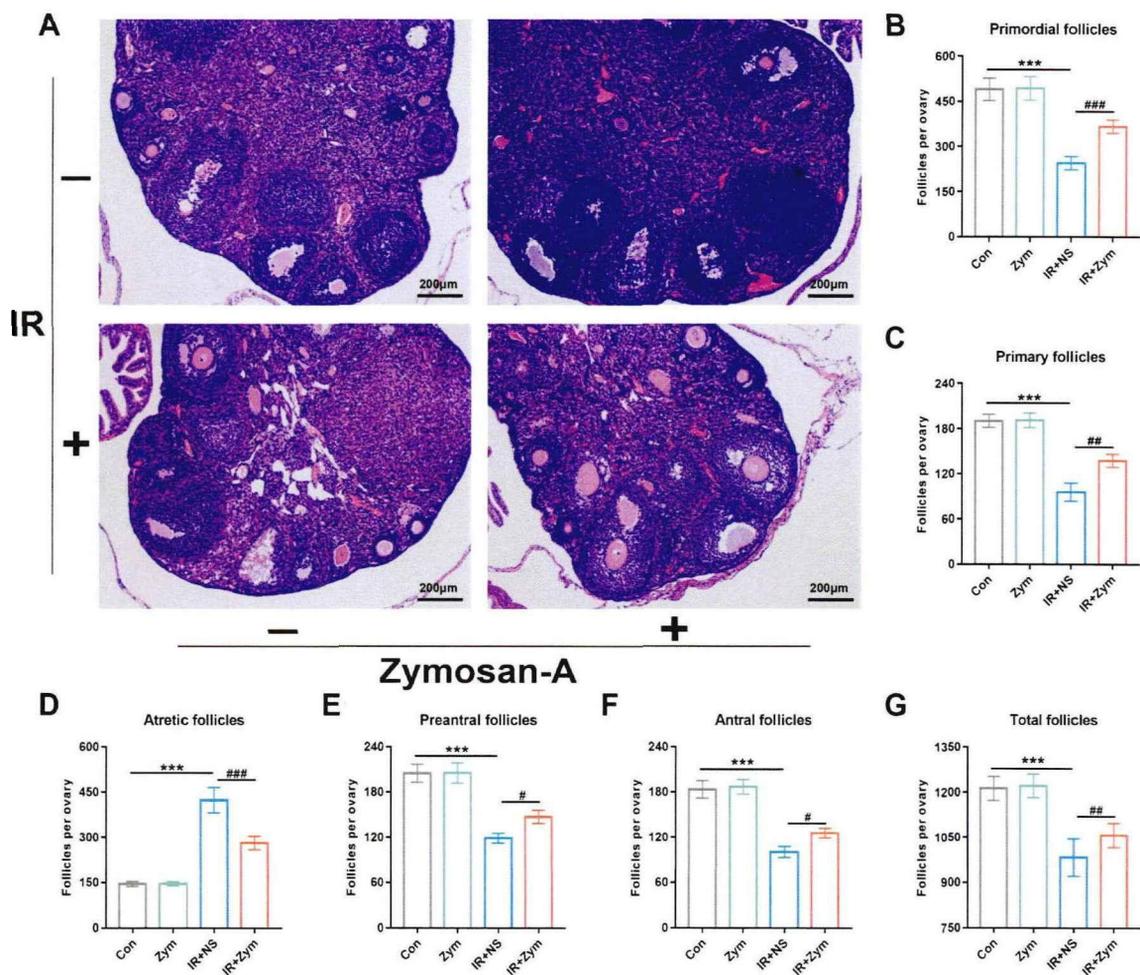


图 2-5 Zymosan-A 可以改善辐照引起的卵泡成熟障碍。(A) 各组小鼠的卵巢组织 HE 染色 (100X); (B) 各组小鼠原始卵泡计数; (C) 各组小鼠初级卵泡计数; (D) 各组小鼠窦前卵泡计数; (E) 各组小鼠窦卵泡计数; (F) 各组小鼠闭锁卵泡计数; (G) 各组小鼠总卵泡计数。(Con:对照组; Zym:单纯给药组; IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (***: $P < 0.001$; #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$)

(7) Zymosan-A 可提高辐照小鼠子代的体重

将小鼠分成对照组, 单纯给药组, 单纯辐射组及给药辐射组, 辐照前给药组小鼠予以腹腔注射 Zymosan-A, 然后给予辐照组小鼠 2Gy 单次盆腔局部照射, 在辐照后经促排卵并与性成熟期雄鼠合笼, 后每天观察小鼠的妊娠状态, 并记录每只小鼠的分娩时间。最后选择出生时间相近的子代小鼠进行体重称量并进行统计学分析。如图 2-6A 所示, 在出生后第 3 天, 与对照组相比, 辐照组新生小鼠体重明显减轻,

仅为对照组的 75%左右，辐照给药组新生小鼠的体重较单纯辐照组有所上升，且存在统计学差异。在出生后的第 5 天（图 2-6B）及第 7 天（图 2-6C）的体重统计上，辐照组新生小鼠的体重较对照组均明显减轻，而辐照给药组新生小鼠的体重较单纯辐照组均有所上升，且存在统计学差异。在较远期的出生后第 42 天的体重统计上，辐照组新生小鼠的体重较对照组仍减轻，存在明显差异，同样，辐照给药组新生小鼠的体重较单纯辐照组仍增加，存在统计学差异（图 2-6D）。

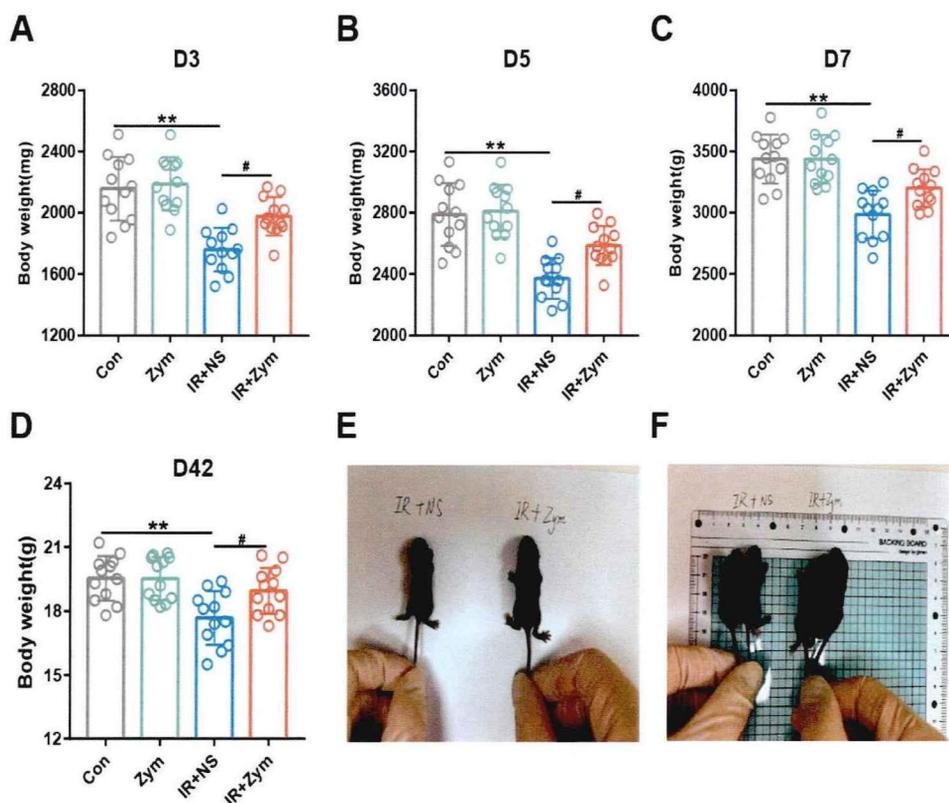


图 2-6 Zymosan-A 可提高辐照小鼠子代的体重。（A）各组小鼠出生后第 3 天体重；（B）各组小鼠出生后第 5 天体重；（C）各组小鼠出生后第 7 天体重；（D）各组小鼠出生后第 42 天体重；（E）辐照组与辐照给药组新生小鼠在出生后第 5 天大体对比代表性图片；（F）辐照组与辐照给药组新生小鼠在出生后第 7 天大体对比代表性图片。（Con:对照组；Zym:单纯给药组；IR+NS: 单纯辐照组；IR+Zym: 给药辐照组）（**: $P<0.01$ ；#: $P<0.05$ ）

（8）Zymosan-A 可增加照射后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖能力

我们使用了 CCK-8 实验来探究 Zymosan-A 是否可以对小鼠卵巢颗粒细胞的增殖产生影响。将细胞分成对照组及辐射组，其中在辐射组之中，根据前期的实验结果

设置了 4Gy 组、6Gy 组及 8Gy 组，在辐照后 24 小时，我们分别检测了各组细胞的增殖情况。结果如图 2-7A 所示，与单纯辐照组相比，辐照给药组细胞的增殖能力显著升高，在不同辐照剂量组趋势基本一致。接下来我们从蛋白层面进一步验证了 Zymosan-A 可增加照射后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖能力，小鼠卵巢颗粒细胞经 6Gy 射线照射，在辐照后 24 小时检测增殖相关蛋白 PCNA 的表达水平的变化。结果表明，与单纯辐照组相比，给药辐照组 PCNA 的表达量增加，二者具有明显统计学差异（图 2-7 B/C）。

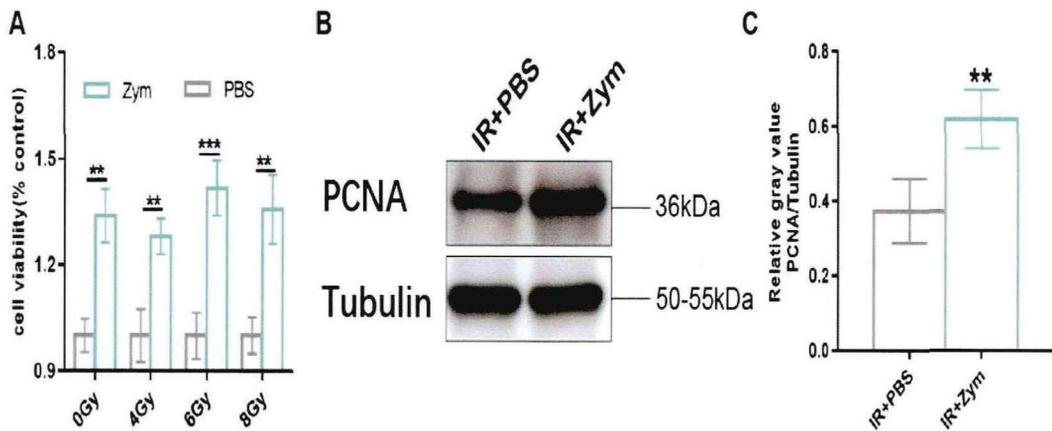


图 2-7 Zymosan-A 可增加照射后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖能力。（A）不同组别间细胞增殖率；（B）不同组别间细胞增殖相关蛋白 WB 的结果；（C）不同组别间细胞增殖相关蛋白 PCNA 相对表达量。（IR+PBS：单纯辐照组；IR+Zym：给药辐照组）（**： $P < 0.01$ ；***： $P < 0.001$ ）

（9）Zymosan-A 可升高辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的存活率

CCK-8 实验证实了 Zymosan-A 可以对辐照后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖产生影响，但 Zymosan-A 是否可以对辐射诱导的小鼠卵巢颗粒细胞的存活产生影响不得而知。我们在辐照前用 Zymosan-A 对细胞进行预处理，然后接受不同剂量的射线照射，通过细胞克隆形成率来反映细胞存活及增殖情况。结果如图 2-8 所示：在无辐射条件下，单纯的 Zymosan-A 刺激不会增加小鼠卵巢颗粒细胞的克隆形成，但在辐射条件下，Zymosan-A 的预处理可以显著提高小鼠卵巢颗粒细胞克隆形成的数量，二者存在明显的统计学差异。

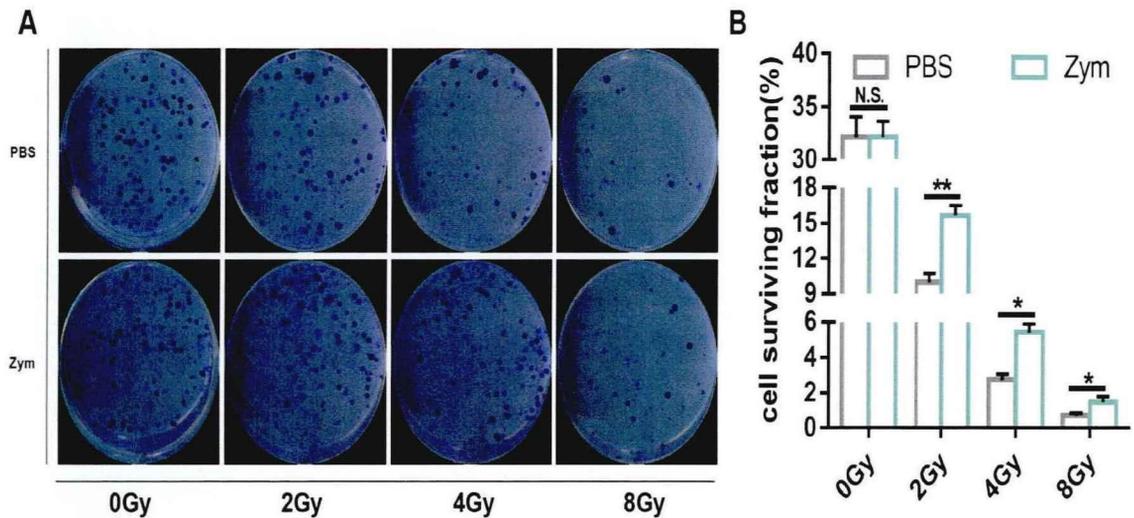


图 2-8 Zymosan-A 可升高辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的存活率。(A) 不同辐照剂量下, 细胞集落形成的代表性图片; (B) 不同辐照剂量下细胞存活率的定量分析。(IR+PBS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$)

(10) Zymosan-A 可降低辐射诱导的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡

细胞凋亡结果的检测主要采用流式细胞术进行, 根据实验原理提示不同时期的细胞与染料结合后荧光强度或颜色的不同, 可以区分出细胞的早期凋亡、晚期凋亡及死亡。本实验开展过程中, 在辐照前 12 小时和 2 小时分别给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 刺激, 随后给予 8.0 Gy 的辐照, 在辐照后 24 小时检测各组小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡情况。结果如图 2-9A/B 所示, 与对照组相比, 单纯的给予 Zymosan-A 刺激不会增加小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡。相反, 辐照会引起小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率增加; 给药辐照组相较于单纯辐照组而言, 其细胞凋亡率明显降低, 具体表现为右上象限 (晚期凋亡) 和右下象限 (早期凋亡) 细胞比例的总和减少。紧接着, 我们在蛋白水平上又进一步的验证了 Zymosan-A 可降低辐射诱导的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡。小鼠卵巢颗粒细胞在辐照前经药物处理, 然后接受 6.0Gy 的辐照, 并在辐照后 0 小时、2 小时、4 小时、8 小时、12 小时及 24 小时分别检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、BAX、Cleaved-caspase3 (C-Caspase3) 表达量 (图 2-9C)。结果如图 2-9D/E 所示, 与单纯辐照组相比, 辐照给药组在任何时间点上, 促凋亡蛋白 BAX 及 C-Caspase3 表达量均明显降低。相反, 与单纯辐照组相比, 辐照给药组在任何时间

点上, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量则显著增加 (图 2-9F), 说明 Zymosan-A 的照前给药可降低辐射诱导的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡率。

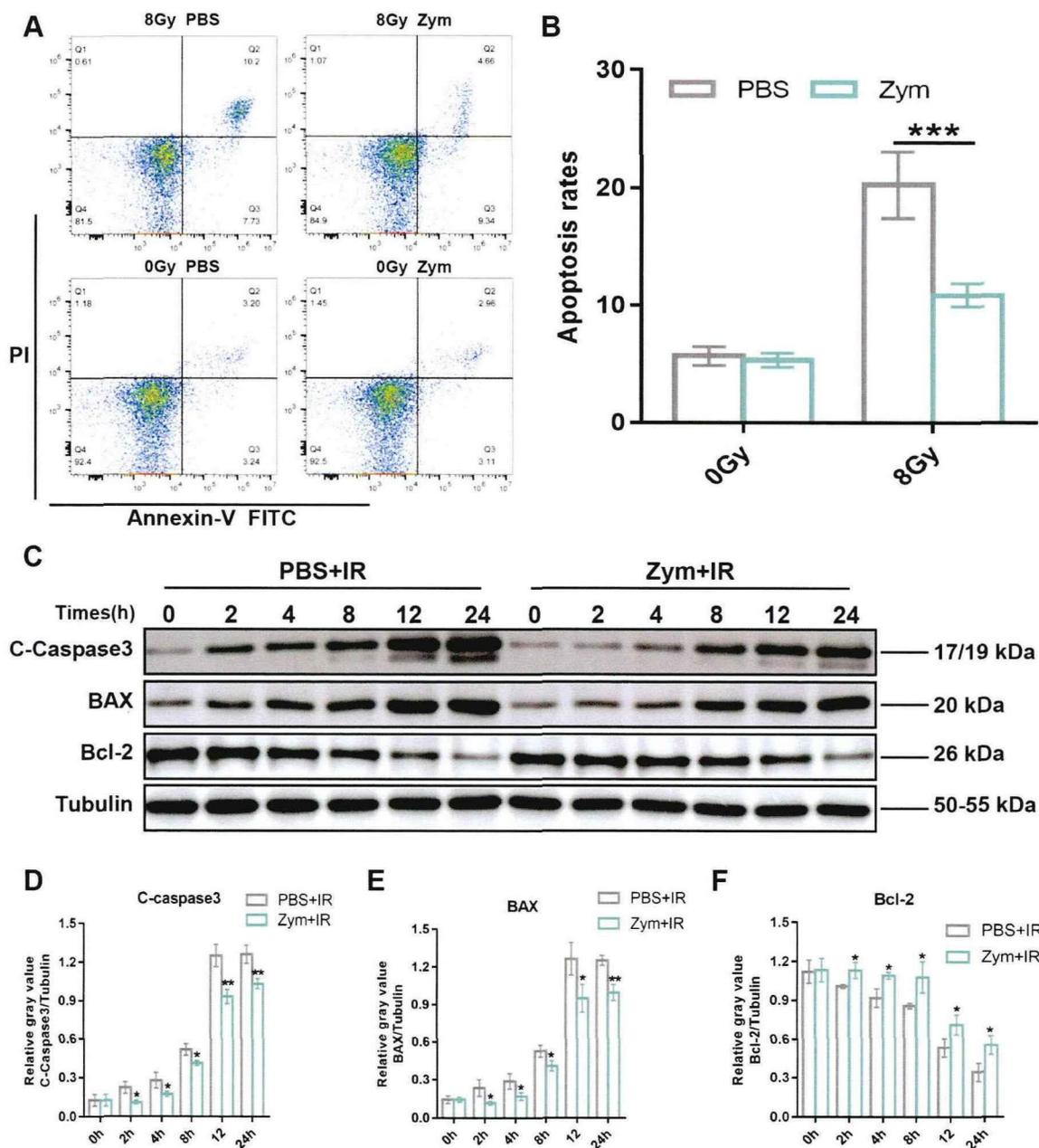


图 2-9 Zymosan-A 可降低辐射诱导的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡。(A) 细胞凋亡流式分析代表性图片; (B) 细胞凋亡定量分析统计图; (C) 凋亡通路相关蛋白的 Western-blot 代表性图片; (D) 对凋亡相关分子 C-caspase-3 蛋白相对表达量的定量分析统计图; (E) 对凋亡相关分子 BAX 蛋白相对表达量的定量分析统计图; (F) 对凋亡相关分子 Bcl-2 蛋白相对表达量的定量分析统计图。(IR+PBS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

四、小结

本部分我们在小鼠体内及小鼠卵巢颗粒细胞中开展研究，通过一系列体内外实验发现了 Zymosan-A 可以对放疗性卵巢损伤发挥防护效应，具体表现在以下几方面：

(1) 与单纯辐照组相比，Zymosan-A 的照射前给药会增加小鼠卵巢组织重量及卵巢器官系数，且二者存在统计学差异。

(2) Zymosan-A 的单纯给药不会引起小鼠动情周期紊乱，相反，在辐照前给予小鼠腹腔注射 Zymosan-A，可以有效降低由辐照诱导的小鼠动情周期总体紊乱率，且在统计学上存在明显差异。

(3) Zymosan-A 在照射前的预防性给药，可以升高辐照小鼠血清中的雌激素 (E2) 及抗缪勒管激素 (AMH) 水平，降低卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 水平。

(4) 辐照会诱发小鼠卵巢卵泡成熟障碍，与单纯辐照组相比，照射前预防性应用 Zymosan-A 可显著减少小鼠卵巢闭锁卵泡数量，增加原始卵泡、初级卵泡、窦前卵泡和窦卵泡数量。在总卵泡数量的统计上，与单纯辐照组相比，辐照给药组小鼠的总卵泡数量明显增加。

(5) Zymosan-A 会改善辐照诱导的小鼠生殖功能障碍，具体表现为：在辐照前应用 Zymosan-A 不仅会提高辐照后雌性小鼠的妊娠率，还会增加辐照后妊娠小鼠的胎儿数量。

(6) 辐照前应用 Zymosan-A 的母代，其子代在出生后第 3 天、第 5 天、第 7 天的体重均较单纯辐照组后代升高，且该趋势在子代出生后第 42 天体重统计上也一致。

(7) Zymosan-A 会显著增加辐射后小鼠卵巢颗粒细胞的增殖率和小鼠卵巢颗粒的细胞存活率，并降低辐射后小鼠卵巢颗粒细胞凋亡率。

五、讨论

大多数肿瘤患者在治疗过程中会接受放射治疗，放疗在杀伤恶性肿瘤组织的同时，对正常组织造成的损伤在实际操作中通常难以避免^[8, 9]。女性卵巢组织作为人体内对放射线相对敏感的组织之一，极易受到放射线的影响。

放疗引起的卵巢组织损伤根据其发生的早晚可分为急性损伤及慢性损伤。急性损伤发生早，通常伴随在较大剂量的放射治疗之后，卵巢组织短时间内发生不可逆损伤。慢性损伤通常持续存在，且影响较持久。在青春期之前接受盆腔区域放疗的女童，可能出现青春期的发育障碍，第二性征延迟，月经稀发，甚至直接不发育^[10]。对于接受盆腔放疗的育龄期女性肿瘤患者，因卵巢慢性损伤的影响，可出现骨密度降低，表现为骨质减少以及骨质疏松^[10-12]。另一方面，有报道指出，放射治疗引起的卵巢慢性损伤还包括引起某些心血管系统疾病的发生率升高，月经量减少、月经稀发，月经期紊乱，暂时性闭经^[10-12]。辐照对卵巢功能的影响不光表现在卵巢组织本身，还可以通过卵巢效应器官功能的变化间接反映出来。有研究提示，接受过腹盆放射治疗的癌症幸存者在之后的妊娠过程中更有可能出现低出生体重儿、早产低出生体重儿以及围产期婴儿死亡率增加等^[7, 13]，且围产期婴儿死亡率和低出生体重的可能性与辐射剂量显著相关^[13]。本部分研究的动物实验是在第一部分构建的小鼠放射性卵巢损伤模型中开展的，评估了包括各组小鼠卵巢性激素水平、卵巢病理切片、小鼠动情周期、小鼠卵巢重量和卵巢器官系数、卵泡细胞计数、妊娠小鼠胎儿数量以及辐照后小鼠后代体重等指标的变化。同时，我们检测了各组小鼠卵巢颗粒细胞辐照后增殖及凋亡情况，从体内外两方面全面评价 Zymosan-A 的卵巢辐射损伤防护效应。

在本部分研究中（图 2-10），在辐照前小鼠腹腔注射 Zymosan-A，然后给予小鼠 2Gy 单次的 γ 射线盆腔局部照射，对辐照后小鼠的卵巢激素水平进行评估发现，给药辐照组较单纯辐照组小鼠卵巢 AMH 及 E2 水平明显升高，FSH 及 LH 水平明显降低，从卵巢内分泌水平上评估了其有效性。紧接着，我们在辐照后将受辐照的雌性小鼠与性成熟的雄性小鼠合笼，通过评估雌性小鼠的妊娠率及妊娠后小鼠胚胎数量，从卵巢生殖功能水平评估了其有效性。同时，我们也对各组小鼠进行卵泡计数、动情周期观察，结果发现给药组小鼠较单纯辐照组均有明显改善。对辐照小鼠的卵巢组织重量称量及卵巢器官系数的统计结果进一步验证了 Zymosan-A 可以对放疗性卵巢损伤发挥防护效应。辐照会引起受照小鼠的后代出生体重减轻，在本部分实验的开展过程中，我们通过统计辐照后小鼠子代的体重来评估 Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的远期影响。更进一步，我们采用体外细胞学实验探索

Zymosan-A 对卵巢辐射损伤的防护作用，通过细胞增殖、细胞克隆形成率及细胞凋亡实验证实照前 24 小时和照前 2 小时给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 预刺激可以明显提高受照细胞的细胞活力并抑制辐射引起细胞凋亡率。

该部分通过体内外研究证实了 Zymosan-A 的卵巢辐射损伤防护效应，但其发挥放射性卵巢损伤的具体机制尚未知。接下来，我们将继续开展实验进一步对其发挥效应的机制进行探讨。

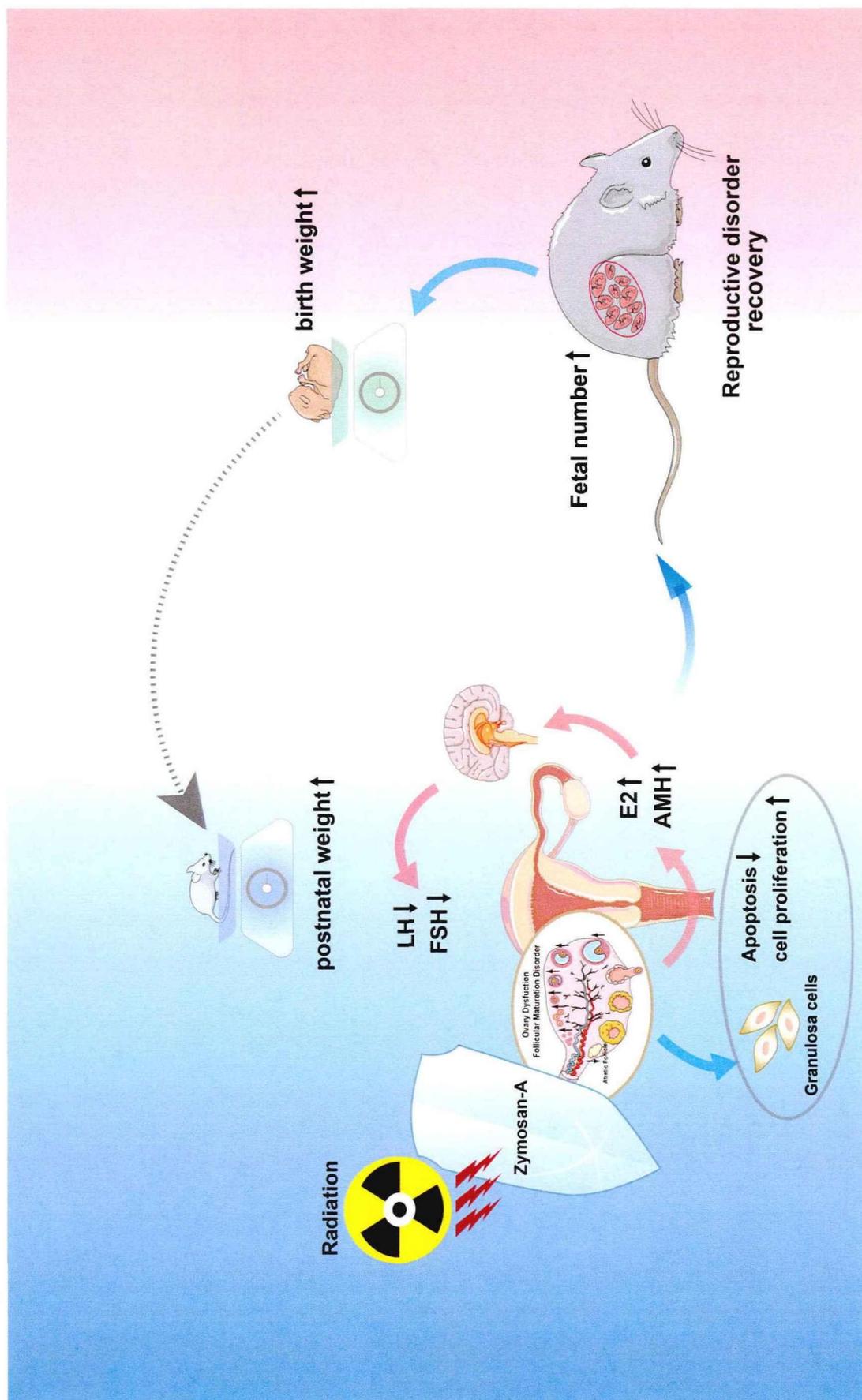


图 2-10 Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护效应的示意图

参考文献

- [1] WALLACE W H, THOMSON A B, KELSEY T W. The radiosensitivity of the human oocyte [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2003, 18(1): 117-21.
- [2] WALLACE W H, THOMSON A B, SARAN F, et al. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries [J]. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2005, 62(3): 738-44.
- [3] WELT C K. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure [J]. Clinical endocrinology, 2008, 68(4): 499-509.
- [4] STUENKEL C A, GOMPEL A. Primary Ovarian Insufficiency [J]. The New England journal of medicine, 2023, 388(2): 154-63.
- [5] MCGLACKEN-BYRNE S M, CONWAY G S. Premature ovarian insufficiency [J]. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 2022, 81(98-110).
- [6] MARCI R, MALLOZZI M, DI BENEDETTO L, et al. Radiations and female fertility [J]. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 2018, 16(1): 112.
- [7] GREEN D M, LANGE J M, PEABODY E M, et al. Pregnancy outcome after treatment for Wilms tumor: a report from the national Wilms tumor long-term follow-up study [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2010, 28(17): 2824-30.
- [8] BARKER H E, PAGET J T, KHAN A A, et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence [J]. Nature reviews Cancer, 2015, 15(7): 409-25.
- [9] GORBUNOV N V, SHARMA P. Protracted Oxidative Alterations in the Mechanism of Hematopoietic Acute Radiation Syndrome [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2015, 4(1): 134-52.
- [10] LAWRENZ B, HENES M, NEUNHOEFFER E, et al. Fertility preservation in girls and adolescents before chemotherapy and radiation - review of the literature [J]. Klin Padiatr, 2011, 223(3): 126-30.
- [11] GAO W, LIANG J X, YAN Q. Exposure to radiation therapy is associated with female reproductive health among childhood cancer survivors: a meta-analysis study [J]. Journal of assisted reproduction and genetics, 2015, 32(8): 1179-86.
- [12] REISER E, BAZZANO M V, SOLANO M E, et al. Unlaid Eggs: Ovarian Damage after Low-Dose Radiation [J]. Cells, 2022, 11(7):

- [13] GREEN D M, SKLAR C A, BOICE J D, JR., et al. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009, 27(14): 2374-81.

第三部分：Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨

一、前言

通过前两部分实验研究的开展，我们在体内和体外水平已经证实 Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的低毒和高效的辐射防护作用，在此部分研究内容中，我们将重点探索 Zymosan-A 发挥卵巢辐射损伤防护作用的初步机制。

近些年来，国内外众多学者研究报道了 Zymosan-A 可通过靶向激活 TLR2 受体参与机体的免疫反应^[1-4]。在辐射损伤防护领域，随着 2008 年 TLR5 受体及其配体在抗辐射损伤防护中的作用被报道之后，国内外学者通过研究也证实了 TLR2 受体及其配体在辐射抗性中同样发挥着重要的作用^[5-9]。既往的多项研究结果提示 Zymosan-A 发挥作用可以通过靶向 NF- κ B 通路^[10, 11]。因此在本实验研究内容中，我们立足于前期效应研究结果基础上，通过 RNA 转录组测序方法筛选给药辐照组和单纯辐照组小鼠卵巢组织的差异表达基因，并通过功能富集分析进行探索和筛选 Zymosan-A 发挥辐射防护作用的潜在作用靶点和作用机制，最后开展相关实验对潜在作用靶点或作用通路进行基本验证。

二、材料和方法

（一）实验材料

1. 实验动物

本部分实验所选用的野生型小鼠遗传背景为：C57BL/6J，购置于上海吉辉实验动物饲养有限公司，周龄为 6-8 周。实验过程中使用的 TLR2 KO 小鼠购置于江苏集萃药康生物科技股份有限公司，周龄 6-8 周。严格遵循我校动物伦理及管理指南进行。

2.主要实验试剂及耗材

Zymosan-A: Sigma-Aldrich 公司

Lipofectamine: Sigma-Aldrich 公司

0.9%生理盐水: 华仁药业股份有限公司

兽用即用型麻醉剂: 南京爱贝生物科技有限公司

Trizol: 美国 Thermo Fisher 公司

氯仿: 美国 Thermo Fisher 公司

无水乙醇: 国药集团化学试剂有限公司

小鼠 TLR2 siRNA: 广州锐博生物技术有限公司

一抗稀释液: 上海碧云天生物技术有限公司

PCR 试剂盒: 日本 Takara 公司

DEPC 水(不含 DNA 酶及 RNA 酶): 上海碧云天生物技术有限公司

二抗稀释液: 上海碧云天生物技术有限公司

鼠尾基因型快速鉴定试剂盒: 上海碧云天生物技术有限公司

PAGE 凝胶配制试剂盒: 上海雅酶生物医药科技有限公司

蛋白上样缓冲液: 上海雅酶生物医药科技有限公司

三色预染蛋白 Marker: 上海雅酶生物医药科技有限公司

SDS-PAGE 电泳缓冲液(干粉): 广州硕谱生物(Biosharp)科技有限公司

脱脂奶粉: 武汉赛维尔生物科技有限公司

甲醇: 国药集团化学试剂有限公司

转膜液: 南京金斯瑞生物科技有限公司

2.0 um PADF 膜: 美国 Millipore 公司

1mL 一次性无菌注射器: 浙江康德莱医疗器械股份有限公司

3.主要实验仪器

高速组织研磨仪: 雷萌生物科技(上海)有限公司

震荡混合仪: 雷萌生物科技(上海)有限公司

PCR 扩增仪: 德国 Biometra 公司

定量 PCR 仪器: 美国 Thermo Fisher 公司

核酸自动提取仪：杭州博日科技有限公司

Nano Drop 风光光度计：美国 Thermo Fisher 公司

涡旋混合器：美国 Scilogex 公司

4°C离心机：美国 Scilogex 公司

可变温度水浴锅：上海精宏实验设备有限公司

纯水机：美国 Millipore 公司

制冰机：日本 SANYO 公司

蛋白电泳仪：美国 BIO-RAD 公司

电转膜仪器：南京金斯瑞生物科技有限公司

凝胶成像系统：广州博鹭腾生物科技有限公司

5. 抗体信息

表 3-1 该部分所用到的抗体信息对应表

名称	公司	种属	稀释比
p-IKK α / β	CST	兔	1:1000
P65	CST	兔	1:1000
p-P65	CST	兔	1:1000
TLR2	Proteintech	鼠	1:1000
Myd88	CST	兔	1:1000
GAPDH	Proteintech	鼠	1:5000
HRP 标记山羊抗鼠	Servicebio	山羊	1:5000
HRP 标记山羊抗兔	Servicebio	山羊	1:5000

6. 引物信息

表 3-2 该部分所用到的 PCR 引物信息对应表

引物名称	基因序列 (5'-3')
Mouse <i>Gapdh</i> Forward	AACGACCCCTTCATTGACCTC
Mouse <i>Gapdh</i> Reverse	CCTTGACTGTGCCGTTGAACT
Mouse <i>Tlr2</i> Forward	TGTCATGTGATGCTGCTGGTGTG

Mouse <i>Tlr2</i> Reverse	ATTGTGTTGATTCCGCTGGACTCC
Mouse <i>Ccl5</i> Forward	CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC
Mouse <i>Ccl5</i> Reverse	ACACACTTGGCGGTTCTTCGA
Mouse <i>Ccl3</i> Forward	TTGCTGTTCTTCTCTGTACCAT
Mouse <i>Ccl3</i> Reverse	AATAGTCAACGATGAATTGGCG
Mouse <i>Akt1</i> Forward	GACGGGCACATTAAGATCAC
Mouse <i>Akt1</i> Reverse	TGAGGATGAGCTCAAAAAGC
Mouse <i>Myd88</i> Forward	TGGCGGAGGAGATGGGTTTTCG
Mouse <i>Myd88</i> Reverse	AGCCTGCCGACCGACGAG
Mouse <i>Ikkkb</i> Forward	AGGCGACAGGTGAACAGAT
Mouse <i>Ikkkb</i> Reverse	CTAAGAGCCGATGCGATG

7. siRNA 信息

表 3-3 该部分所用到的 si-RNA 信息对应表

siRNA 名称	基因序列 (5'-3')
si-TLR2-m_1	CCAATCTCACAAATTTACA
si-TLR2-m_2	CATTTGGATTTGTCTGATA
si-TLR2-m_3	CAACAATCTTGACTCATT

(二) 实验方法:

1. γ 射线造模

详见第一部分实验方法。

2. Zymosan-A 的配置

详见第一部分实验方法。

3. 实验分组与相关检测样本收集

5.1 实验动物分组

野生型小鼠：从上海吉辉实验动物饲养有限公司购入野生型实验小鼠后，随机将雌性小鼠分为单纯辐照组和给药辐照组，每组 6 只，辐照组根据第一部分实验结果给予 2Gy (2Gy*1) 单次盆腔局部照射，在实验开始前均先适应性饲养于我校动物中心 1-3 周。

TLR2 KO 小鼠：将周龄相近的雌性小鼠随机分成单纯辐照组、辐照给药组、TLR2 KO 辐照组和 TLR2 KO 给药辐照组，每组 8 只，给药组小鼠按照第一部分实验结果给予 50mg/Kg 的 Zymosan-A 腹腔注射，辐照组小鼠根据实际实验操作过程最终给予总计 2Gy (1Gy*2) 盆腔局部照射。

5.2 实验动物的处理

详见第一部分实验方法。

5.3 实验样本收集

卵巢组织样本收集：小鼠腹腔注射麻醉后，以颈椎脱臼法处死小鼠，并将小鼠置于小动物解剖操作台上，仔细解剖小鼠盆腹腔，去除小鼠卵巢组织周围的脂肪，将小鼠双侧卵巢组织取出置于 DEPC 水中涮洗，取出卵巢组织用吸水纸上吸掉卵巢表面的液体。将一侧卵巢组织置于 2.0mL 细胞冻存管中并迅速投入含液氮的容器中保存用于 RNA 测序及 RT-PCR 实验，另一侧卵巢组织按照前述 WB 方法中蛋白样制备方法制成 Western-blot 实验样本。

4. 卵巢组织的 RNA 测序

本实验涉及到的卵巢组织 RNA 测序是委托上海欧易生物科技有限公司开展，后续的分析过程通过欧易云平台 (<https://cloud.oebiotech.com/task/>) 进行。

5. RT-PCR

(1) RT-PCR 操作按照 Takara 公司生产的 SYBR 试剂盒操作说明进行，具体操作如下：

表 3-4 PCR 实验中各反应液的配比

试剂组分	反应体积(uL)
TB Green 母液	10.0
PCR Reverse Primer(10 uM)	0.4
PCR Forward Primer(10 uM)	0.4
ROX Reference 母液	0.4
DNA 模板	2.0
无酶水	6.8

总体积 20.0

(2) 按上述体系往 96 孔板中加液结束后, 按照下表所示的程序进行 RT-PCR 反应:

表 3-5 PCR 实验的反应条件

	温度	时间
A. 预变性	95°C	30s
B. PCR 扩增循环 (45X)	95°C	5s
	60°C	34s
C. 溶解曲线	95°C	15s
	60°C	60s
	95°C	15s

(3) 待 PCR 仪器提示反应结束后, 及时确定实验结果的溶解曲线和扩增曲线;

(4) 根据反应曲线的结果进行目的基因相对表达量的计算, 具体计算公式如下:

$$\text{目的基因的相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta Ct},$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$$

6. TLR2 基因遗传性阻断小鼠的鉴定

(1) 基因扩增样本制备:

(a) 在 TLR2 KO (Knockout) 小鼠出生后第 28-35 天之间, 用高压灭菌过的眼科剪剪下约 2.5mm 小鼠末梢尾巴置于 1.5mL 无菌且不含 DNA、RNA 酶的 EP 管中;

(b) 往每个 EP 管中加入约 100uL 裂解液, 轻轻晃动 EP 管, 确保小鼠尾巴完全浸没在溶液中, 裂解液配制参考表:

表 3-6 鼠尾鉴定操作中裂解液的配制表 (单个样本)

试剂	体积(uL)
DNA 提取溶液	96
酶混合物	4
总体积	100

(c) 将所有样本垂直插在泡沫板上, 并将泡沫板置于 55°C 水浴锅中孵育 18min;

(d) 将上述泡沫板取出, 转至 95°C 水浴锅中孵育 5min;

(e) 往每个 EP 管中各加入 100uL 的反应终止液，并在涡旋震荡器上震荡 30s 使其充分混匀；

(f) 将上述 EP 管置于低速离心机上以 800rpm 室温离心 2min；

(g) 从各 EP 管中取适量体积的上清液至一新的不含 DNA、RNA 酶的无菌 EP 管中进行 PCR 检测

(2) PCR 扩增

(a) PCR 扩增过程操作按照碧云天公司生产的鼠尾基因型快速鉴定试剂盒操作说明进行，具体操作如下：

表 3-7. 鼠尾鉴定操作中 PCR 反应体系配置表（单个样本）

试剂	体积 (uL)
双蒸水	7.4
PCR 反应模板	1
反应引物混合物	1.6
PCR Master Mix (2X)	10
总体积	20

(b) 按上述体系往 96 孔板中加液结束后，按照下表所示的程序进行 PCR 扩增过程：

表 3-8. 鼠尾鉴定操作中 PCR 扩增的反应条件

	温度 (°C)	时间
A. 预变性	94	3min
B. PCR 扩增循环 (30-35 个)	94	30s
	55	30s
	72	1kb/min
	72	10min
C. 延伸	72	10min

(3) 琼脂糖凝胶电泳

(a) 琼脂糖制备：

(a₁) 量筒量取适量 10X 的 TAE 溶液，加入 9 倍体积的去离子水，稀释成 1X 的

TAE 溶液倒入烧杯中备用；

(a₂) 微量天平称量 2.1 g 琼脂糖粉末加入 140mL TAE 溶液中；

(a₃) 用搅拌棒充分搅拌混匀；

(a₄) 将装有上述混合液的烧杯置入微波炉中，75℃加热 210s；

(a₅) 取出烧杯，室温条件下降温至 60℃左右，按照混合液：核酸染料=1000:1 的比例加入 14uL 核酸染料，并小心混匀，避免产生气泡；

(b) 将上述琼脂糖溶液缓慢倒入模具中，室温环境静置 25min 等待凝固，注意模具中齿梳放置方向，避免倒置；

(c) 取出模具两侧固定装置，并将模具放置于水平电泳仪中，加入足量 1X TAE 溶液，保证 TAE 溶液漫过凝胶，垂直拔出凝胶上的梳子；

(d) 各梳孔中加入 12uL 前述 PCR 扩增结束后的产物，所有待测样本单侧各加入 6uL DNA marker，设置反应条件：135V，25min；

(e) 电泳结束后，将凝胶取出，并置于曝光仪中曝光留存结果。

7. TLR2 基因遗传性阻断小鼠的扩增

根据前述基因鉴定操作结果，选取 TLR 2^{-/-}小鼠，按照雌性：雄性=2:1 比例进行合笼，并在怀孕后将孕鼠单独饲养，并记录每次分娩时间及子代数量。

8. 联免疫吸附试验（ELISA 实验）

详见第一部分实验方法。

9. 小鼠胎儿数量计数

详见第一部分实验方法。

10. Western-Blot 实验

详见第二部分实验方法。

11. 统计学分析

本文涉及检测的实验均重复 3 次以上，所有数据都用平均值±标准差 (Means±SD) 来表示。计量资料间的差异性分析，两组之间的差异比较采用非配对的 t 检验。3 组及 3 组以上之间的差异分析，若满足正态分布且方差齐，采用单因素方差分析 (ANOVA)，进一步两两之间的比较采用 Bonferroni 检验。若方差不齐，

则采用 Manner-Whitney 检验。计数资料间的差异性分析采用了 fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 被认为在统计学上具有显著性差异。

三、实验结果

(1) 差异基因筛选

造模成功后第 7 天, 通过解剖将单纯辐照组小鼠及辐照给药组小鼠的卵巢组织取出, 在不含 DNA、RNA 酶的 DEPC 水中涮洗后, 立即置于液氮组织中保存, 之后将小鼠卵巢组织按照标准操作流程进行基因表达谱分析, 差异基因按照 $p < 0.05$ 及 $|\log_2FC| > 0.85$ 这一阈值进行筛选, 结果如图 3-1 所示。与单纯辐照组相比, 给药辐照组共筛选出 268 个差异基因, 其中有 156 个基因上调, 有 112 个基因下调。

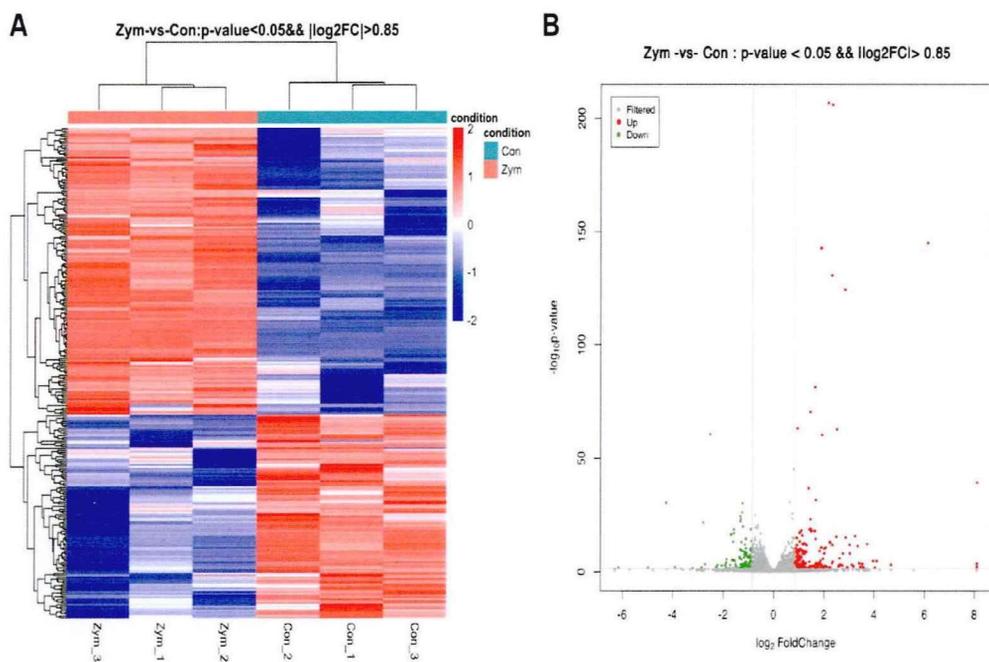


图 3-1 Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护的差异基因筛选。(A) 差异表达基因热图; (B) 差异表达基因火山图。

(2) 卵巢组织测序结果相关差异表达基因的定量 PCR 验证

根据前期两组小鼠卵巢组织转录组测序结果, 选取合适周龄的 C57BL/6 雌性小鼠, 在适应性饲养之后随机分成单纯辐照组及给药辐照组。辐照前通过腹腔注射两次给药, 给药结束后所有小鼠均接受 2.0Gy 单次盆腔局部照射, 照后一周解剖小鼠

卵巢组织并进行抽提RNA进行定量PCR验证。结果如图 3-2 所示，与单纯辐照组相比，给药辐照组小鼠卵巢组织的 *Tlr2*、*Ccl5*、*Ccl3*、*Akt1*、*Myd88* 及 *Ikkbb* 基因表达量均上调，存在明显统计学差异。翻阅差异分子列表及本部分的PCR结果验证，均证实差异基因中，*Tlr2* 基因的差异倍数最大。

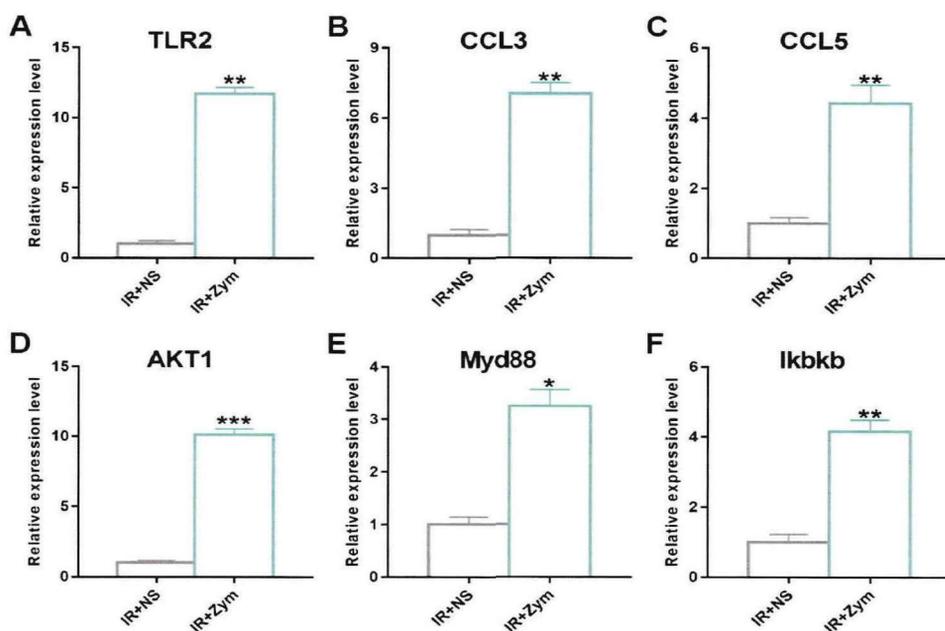


图 3-2 部分差异基因的定量 PCR 验证结果。(A) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量；(2) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量；(3) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量；(4) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量；(5) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量；(6) 小鼠卵巢组织中 TLR2 的相对表达量。(IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

(3) TLR2 基因遗传性阻断小鼠的构建

TLR2 遗传性阻断小鼠构建示意图如下图 3-1 所示，前期我们查阅文献得知编码小鼠 *Tlr2* 的基因位于 3 号染色体，共有 3 个外显子，其中 ATG 起始密码子在外显子 3 中，TAG 终止密码子也在第 3 外显子中，我们以此选定外显子 3 作为敲除的靶位点，预计有效敲除的区域约 1915bp，经过基因文库查阅和论证，证实该敲除区域除 TLR2 以外不包含任何其他已知基因。基于以上理论，采用国际上通用的 CRISPR-Cas9 技术将 cas9 和 gRNA 共同注射到受精卵中，根据子代幼崽时期的基因鉴定结果

平紊乱的改善作用

如前所述, Zymosan-A 可以对放疗性小鼠卵巢激素的紊乱发挥改善性作用, 在此部分, 我们在 TLR2 KO 小鼠体内开展研究, 探讨 TLR2 受体在此过程中发挥的作用。结果如图 3-5 所示, 相较于单纯辐照组, TLR2 KO 辐照组小鼠卵巢性激素 AMH、E2 水平进一步降低, FSH、LH 水平进一步升高, 且二者间均具有统计学意义, 提示 TLR2 受体在辐照诱导的小鼠卵巢激素紊乱调节中发挥重要作用。另外, 相较于 TLR2 KO 辐照组, TLR2 KO 给药辐照组小鼠的卵巢性激素包括 AMH、FSH、LH 及 E2 水平均未见明显提高, 表明 Zymosan-A 对辐照小鼠卵巢激素水平紊乱的改善主要是通过靶向 TLR2 受体发挥作用的。

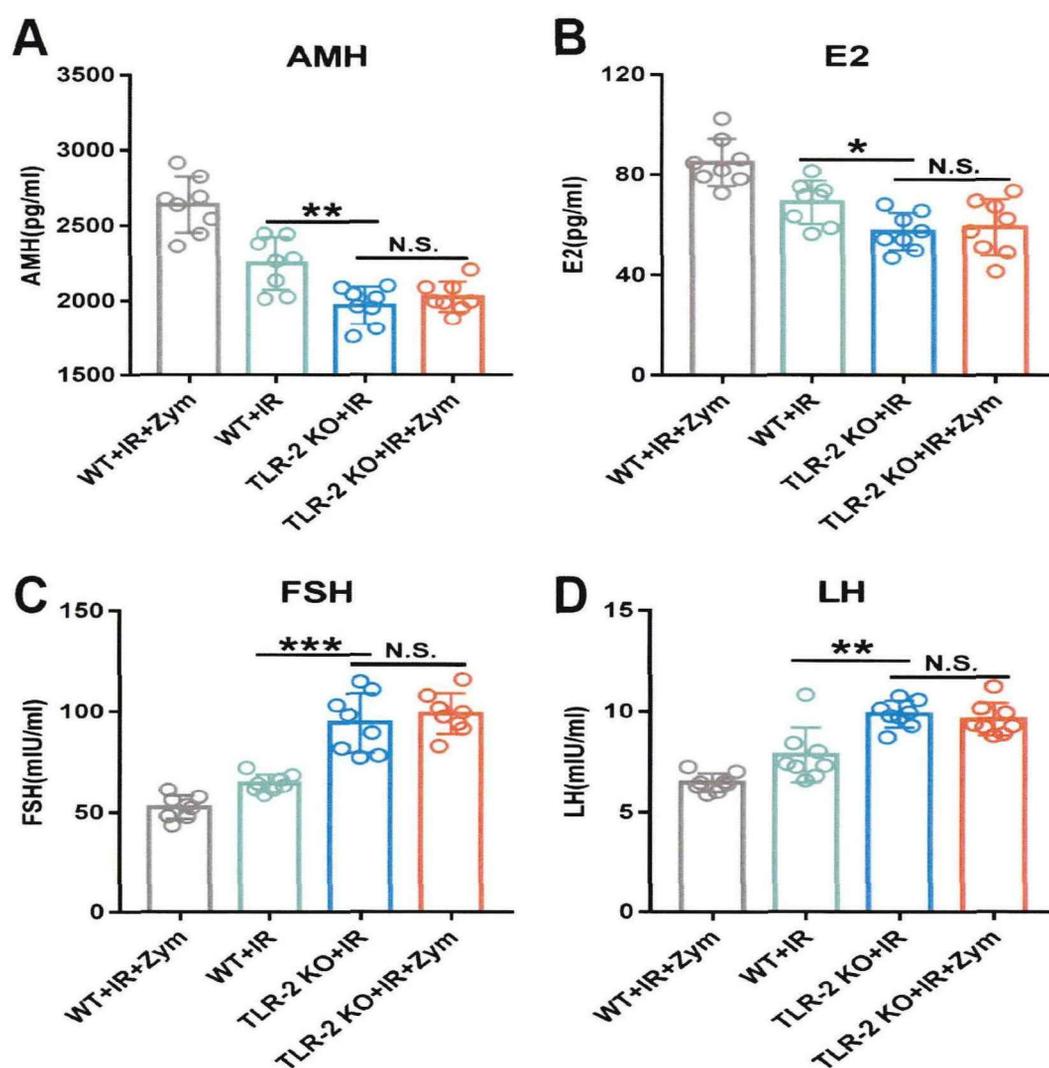


图 3-5 TLR2 KO 能够逆转 Zymosan-A 对辐照小鼠卵巢激素水平紊乱的改善作用。(A) 各

组小鼠卵巢 AMH 水平变化；(B) 各组小鼠卵巢 E2 水平变化；(C) 各组小鼠卵巢 FSH 水平变化；(D) 各组小鼠卵巢 E2 水平变化。(WT+IR:单纯辐照组；WT+IR+Zym:给药辐照组；TLR2 KO+IR: TLR2 KO 辐照组；TLR2 KO+IR+Zym: TLR2 KO 给药辐照组) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

(6) TLR2 KO 可以逆转 Zymosan-A 对辐照小鼠的生殖功能的改善作用

如前所述，Zymosan-A 可以对辐照小鼠的生殖功能的发挥改善作用。在此部分，我们通过在 TLR2 KO 小鼠体内开展实验，并对各组小鼠的妊娠率及妊娠后胚胎数量进行计数。结果如图 3-6 所示，与单纯辐照组相比，TLR2 KO 辐照组小鼠无论在妊娠率方面还是妊娠后胚胎数量计数上均更低，二组间存在统计学差异，提示 TLR2 受体在辐照诱导的小鼠生殖功能障碍中发挥重要作用。此外，相较于 TLR2 KO 辐照组，TLR2 KO 辐照给药组小鼠无论在妊娠率方面还是妊娠后胚胎数量计数上均未见明显提高，表明 Zymosan-A 对辐照小鼠生殖功能的改善主要是通过靶向 TLR2 受体发挥作用的。

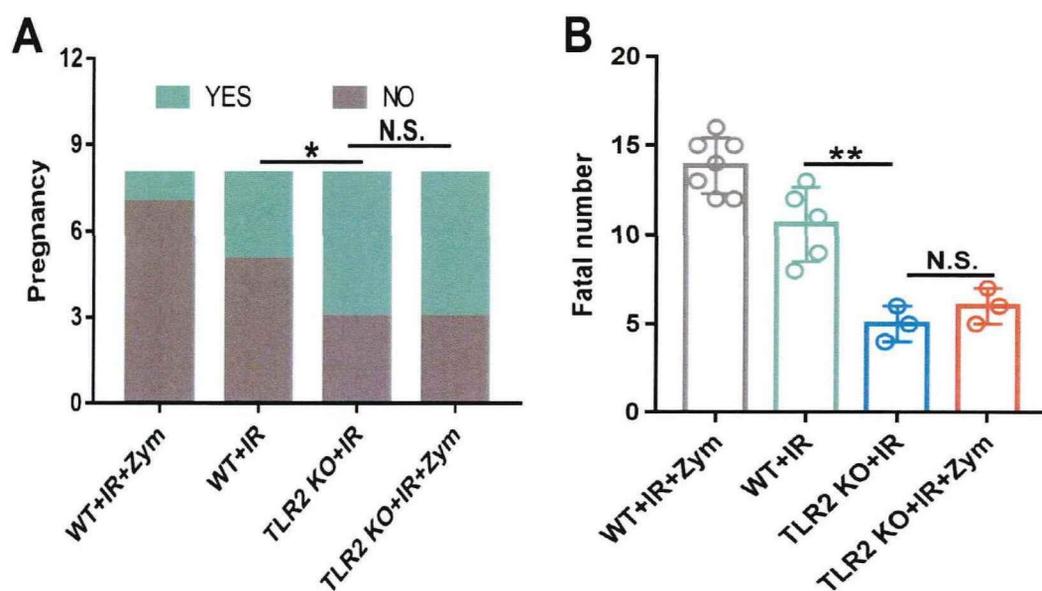


图 3-6 TLR2 KO 可以逆转 Zymosan-A 对辐照小鼠的生殖功能的改善作用。(A) 不同组别小鼠的妊娠率；(B) 不同组别小鼠的胎儿数量。WT+IR:单纯辐照组；WT+IR+Zym:给药辐照组；TLR2 KO+IR: TLR2 KO 辐照组；TLR2 KO+IR+Zym: TLR2 KO 给药辐照组。(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; N.S.: not significant)

$P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

(7) 上调差异表达基因的 KEGG 功能富集分析

紧接着,我们开始了 Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护的机制探索。在此,我们根据前期小鼠卵巢组织转录组测序结果,对筛选出来的上调差异基因进行 KEGG 功能富集分析,结果显示在上调差异基因中,KEGG 首要富集于 Toll-like receptor signaling pathway,这与前期相关研究的结果基本一致。对 KEGG 功能富集列表继续分析,我们发现,其还可能有富集于 NF-kappa B signaling pathway,于是我们提出假设,Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤发挥防护效应主要是通过靶向 Toll-like receptor signaling pathway 通路及 NF-kappa B signaling pathway 通路产生作用。

表 3-9 Zymosan-A 发挥卵巢辐射损伤防护的差异表达基因 KEGG 功能富集分析列表

ID	Term	P-value
mmu04620	Toll-like receptor signaling pathway	1.12E-20
mmu04062	Chemokine signaling pathway	7.54E-15
mmu05417	Lipid and atherosclerosis	8.13E-14
mmu05142	Chagas disease	5.38E-11
mmu05135	Yersinia infection	1.23E-10
mmu04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	3.27E-10
mmu04145	Phagosome	4.32E-10
mmu05152	Tuberculosis	5.94E-10
mmu05140	Leishmaniasis	2.58E-09
.....
mmu04064	NF-kappa B signaling pathway	1.69E-06
.....

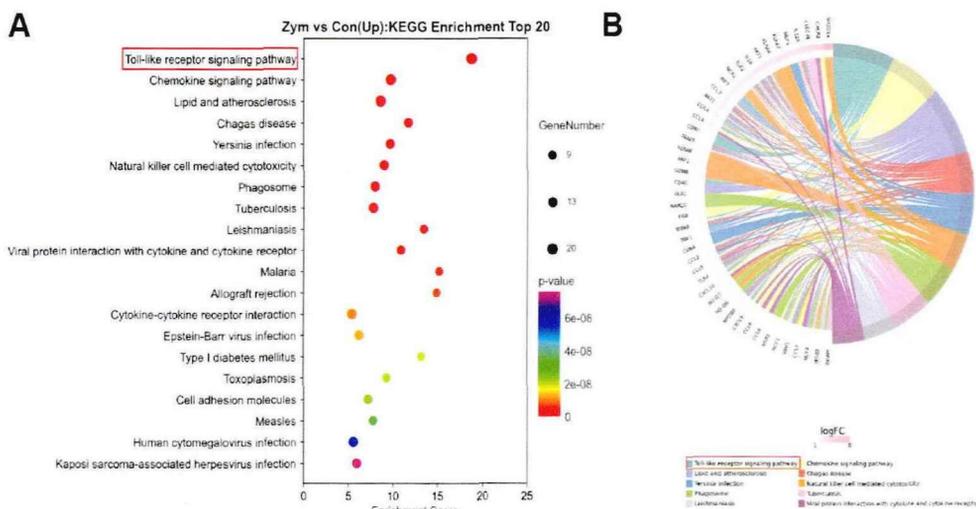


图 3-7 Zymosan-A 发挥卵巢辐射损伤防护的差异表达基因 KEGG 功能富集分析。(A) 卵巢组织测序上调基因的 KEGG 差异图；(B) 卵巢组织测序的上调差异基因 KEGG 和弦图。

(8) 靶向 TLRs 通路及 NF-κB 通路相关蛋白表达量验证

最后，我们在蛋白水平对 TLRs 通路及 NF-κB 通路相关蛋白的表达量进行验证。将小鼠分成单纯辐照组及给药辐照组，在腹腔注射 Zymosan-A 后给予前述相同条件的辐照方式及辐照剂量，在照射后第 7 天，收集各组小鼠的卵巢组织进行蛋白提取。利用 Western-Blot 方法进行蛋白表达量的验证，然后将 Western-Blot 原始结果经 ImageJ 进行灰度定量，并进行统计学分析。结果如图 3-8 所示，与单纯辐照组相比，给药辐照组小鼠卵巢组织的 TLR2、Myd88、P65 的表达量均显著上调。在磷酸化修饰的蛋白表达水平上，给药辐照组小鼠相较单纯辐照组小鼠卵巢组织的 p-P65、p-IKKα/β 的表达量同样上调，均具有统计学差异。

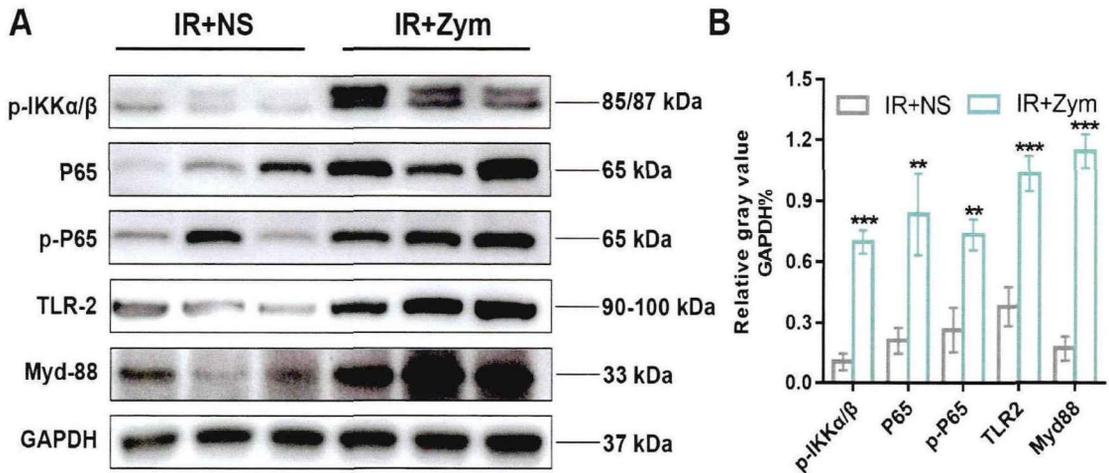


图 3-8 靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路相关蛋白表达量验证。(A) 靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路相关蛋白 Western-blot 代表性图片；(B) 对 P65、TLR2、Myd88 及 p-P65、p-IKK α / β 蛋白相对表达量的定量分析统计图。(IR+NS: 单纯辐照组; IR+Zym: 给药辐照组) (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

四、小结

在本部分的研究过程中，我们通过对单纯辐照组小鼠及辐照给药组小鼠的卵巢组织进行转录组测序，并对测序结果进行进一步分析和验证，以及在 TLR2 KO 小鼠体内开展相关研究，具体结果如下：

(1) 通过对两组小鼠卵巢组织进行转录测序，最终筛选出 268 个差异基因，其中有 156 个基因上调，有 112 个基因下调，其中在上调差异基因中差异最明显的是 *Tlr2* 基因；

(2) 与单纯照射组小鼠相比，TLR2 基因敲除会加重小鼠卵巢的性激素水平紊乱；

(3) 相较于单纯辐照组，TLR2 KO 辐照组小鼠的生殖功能障碍更严重；

(4) Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护可能是主要靶向 TLR2 受体；

(5) Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护效应可能主要是通过靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路产生作用，RT-PCR 及 Western-blot 实验结果也基本证实了上述提出的潜在靶向通路假说。

五、讨论

Zymosan-A 可以通过靶向激活 TLR2 受体参与机体免疫活动已得到了国内外研究者证实。近 10 年来, 围绕 TLRs 受体及其配体在辐射损伤防护中的研究相对热门, TLR2 受体及其配体在抗辐射损伤中的重要作用已被证实^[12, 13]。Zymosan-A 作为一种 TLR2 配体, 既往的研究证实其可以通过靶向激活 TLR2 诱导 NF- κ B 磷酸化和核转位, 进而发挥抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖, 清除自由基的作用^[14-16]。

转录组是指在某一生理条件下, 特定组织或细胞转录出来的所有产物的集合, 包括信使 RNA、核糖体 RNA、转运 RNA 及非编码 RNA。对转录组开展研究, 可以从整体层面把握基因的功能和结构, 对某一特定生物学进程和相关疾病发生过程中的分子机理探索具有十分重要的意义^[17, 18]。转录组测序 (RNA-Seq) 是近些年来发展起来的一种高效、快捷的转录组研究手段, 广泛应用于生物学研究、医学研究、临床研究和药物研发等。在此部分研究中, 我们通过转录组测序技术, 在辐射给药组和单纯辐照组小鼠卵巢组织之间最终确定 268 个差异基因, 其中 156 个差异基因显著上调, 112 个差异基因显著下调。对差异基因列表进行分析发现上调基因差异最大的是 *Tlr2*, 这与国内外研究结果基本一致。由此, 我们构建了 TLR2 KO 小鼠, 并在 TLR2 KO 小鼠体内开展相关研究。结果显示, 相较于单纯辐射小鼠, TLR2 基因敲除小鼠的卵巢内分泌功能紊乱及生殖功能障碍更严重, 提示 TLR2 可能是放射性卵巢损伤防护的重要靶点。此外, 我们通过对上调差异基因进行 KEGG 分析, 其在 TLRs 通路及 NF- κ B 通路显著富集。这与本课题组前期部分工作已经证实的 NF- κ B 信号通路在辐射损伤防护中发挥着重要作用的结果基本一致。进一步我们通过 RT-PCR 及 Western-blot 实验对测序结果进行验证, 结果显示, 与单纯辐照组相比, 辐照给药组卵巢组织中靶向 TLRs 通路及 NF- κ B 通路部分基因及蛋白的表达量显著上调。

总之, 本部分研究通过转录组测序技术筛选出差异基因, 根据差异基因构建了 TLR2 KO 小鼠, 并开展相关体内实验进行论证说明, 进一步对差异基因的分析筛选出潜在的作用通路, 并从基因和蛋白表达水平上加以验证, 初步阐明 Zymosan-A 在体内和体外发挥辐射损伤防护效应的机制: Zymosan-A 通过靶向激活 TLRs 通路和 NF- κ B 通路对放射性卵巢损伤防护发挥关键作用。

参考文献

- [1] SAS A R, CARBAJAL K S, JEROME A D, et al. A new neutrophil subset promotes CNS neuron survival and axon regeneration [J]. *Nature immunology*, 2020, 21(12): 1496-505.
- [2] KOREN T, YIFA R, AMER M, et al. Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses [J]. *Cell*, 2021, 184(24): 5902-15.e17.
- [3] DE GRAAFF P, BERREVOETS C, RÖSCH C, et al. Curdlan, zymosan and a yeast-derived β -glucan reshape tumor-associated macrophages into producers of inflammatory chemo-attractants [J]. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 2021, 70(2): 547-61.
- [4] TAKEUCHI O, AKIRA S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system [J]. *International immunopharmacology*, 2001, 1(4): 625-35.
- [5] CHENG Y, DU J, LIU R, et al. Novel chimeric TLR2/NOD2 agonist CL429 exhibited significant radioprotective effects in mice [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2021, 25(8): 3785-92.
- [6] CIORBA M A, RIEHL T E, RAO M S, et al. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner [J]. *Gut*, 2012, 61(6): 829-38.
- [7] RIEHL T E, ALVARADO D, EE X, et al. Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1003-13.
- [8] GAO F, ZHANG C, ZHOU C, et al. A critical role of toll-like receptor 2 (TLR2) and its' in vivo ligands in radio-resistance [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(13004).
- [9] PAUN A, FOX J, BALLOY V, et al. Combined Tlr2 and Tlr4 deficiency increases radiation-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2010, 77(4): 1198-205.
- [10] SAHAN-FIRAT S, TEMIZ-RESITOGLU M, GUDEN D S, et al. NF- κ B activation mediates LPS-or zymosan-induced hypotension and inflammation reversed by BAY61-3606, a selective Syk inhibitor, in rat models of septic and non-septic shock [J]. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2019, 46(2): 173-82.
- [11] DU J, ZHANG P, ZHAO H, et al. The mechanism for the radioprotective effects of zymosan-A in mice [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2018, 22(4):

2413-21.

- [12] WU J, ZHANG Y, XIN Z, et al. The crosstalk between TLR2 and NOD2 in *Aspergillus fumigatus* keratitis [J]. *Molecular immunology*, 2015, 64(2): 235-43.
- [13] MANOHARAN I, HONG Y, SURYAWANSHI A, et al. TLR2-dependent activation of β -catenin pathway in dendritic cells induces regulatory responses and attenuates autoimmune inflammation [J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2014, 193(8): 4203-13.
- [14] KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors [J]. *Trends in molecular medicine*, 2007, 13(11): 460-9.
- [15] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-66.
- [16] VANPOUILLE-BOX C, HOFFMANN J A, GALLUZZI L. Pharmacological modulation of nucleic acid sensors - therapeutic potential and persisting obstacles [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2019, 18(11): 845-67.
- [17] STARK R, GRZELAK M, HADFIELD J. RNA sequencing: the teenage years [J]. *Nature reviews Genetics*, 2019, 20(11): 631-56.
- [18] HONG M, TAO S, ZHANG L, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2020, 13(1): 166.

全文总结

放射治疗作为肿瘤综合治疗中的一项关键技术，在为人类带来福利的同时，也为人类健康带来了潜在影响。卵巢作为维持女性正常生理功能的重要器官，是体内辐射敏感组织之一，较低剂量的射线就会影响卵巢功能。在本研究中，我们以前期筛选出来的 TLR2 配体 Zymosan-A 开展实验，通过一系列体内外实验证实其可以对小鼠的卵巢辐射损伤发挥防护效应，并通过相关实验对其机制进行了初步探索。

Zymosan-A 是一类通过 β -1,3 糖苷键连接的葡聚糖，主要由啤酒糖酵母真菌壁制备而成。近年来，关于 Zymosan-A 对机体发挥效应的研究已有相关报道，例如，有报道指出其可作为免疫佐剂参与机体的免疫调节，从而发挥促进机体损伤修复以及抗肿瘤等作用。Zymosan-A 可以通过靶向 TLRs 通路激活 Myd88，其下游促使 NF- κ B 激活，诱导 NF- κ B 的磷酸化和核转位，在过去的研究中曾被用于诱发多器官功能衰竭综合征及关节炎。近些年来，其在辐射损伤防护领域的作用也被报道，但其在辐射防护中的作用及其机制尚未完全阐明。

本课题前期预实验证实 Zymosan-A 可以对放射性卵巢损伤发挥防护效应，基于此，我们开展了具体研究。研究内容主要分为三部分，分别是放射性卵巢损伤模型的构建及 Zymosan-A 药物安全性研究、Zymosan-A 对放射性卵巢损伤的防护效应研究及 Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨。

一、放射性卵巢损伤模型的构建及 Zymosan-A 药物安全性研究

在该部分研究的初始，我们通过设置辐照剂量梯度及不同的辐照次数，采取盆腔局部放疗，通过对小鼠卵巢性激素水平及小鼠胚胎数目统计分析成功构建了一个相对稳定的放射性卵巢损伤动物模型。紧接着，在前期毒性试验研究的基础上，继续从小鼠肝酶水平、肌酐水平以及血液学等指标评估 Zymosan-A 的生存毒性，并通过小鼠胚胎数量计数来评估其生殖毒性。另外，我们还在小鼠卵巢颗粒细胞上开展了相关细胞毒性研究，从体内外水平共同评估其作为潜在卵巢辐射损伤防护剂的可能性和应用前景。

二、Zymosan-A 对放疗性卵巢损伤的防护效应研究

在 Zymosan-A 发挥辐射损伤防护效应这一研究内容中，我们从体内外开展多方面实验。在小鼠体内，我们计数了单纯辐照组小鼠及辐照给药组小鼠的卵巢性激素水平，结果表面 Zymosan-A 可显著降低辐射诱导的 FSH 及 LH 升高，提升辐照小鼠卵巢 AMH 及 E2 水平。在卵巢重量及卵巢器官系数的统计上，相较于单纯辐照组，给药辐照组小鼠卵巢重量及卵巢器官系数在统计上均显著提升。紧接着，我们根据各组小鼠的卵巢组织病理切片进行卵泡计数，结果显示，辐照前给予 Zymosan-A 预处理可有效增加小鼠卵巢组织中各级效应卵泡的数量，而闭锁卵泡数目较单纯辐照组明显减少。在卵巢生殖功能的评估中，我们首先通过小鼠阴道粘液栓情况评估了其妊娠率，紧接着通过计数各组妊娠小鼠在其妊娠后某一时间点子宫内胚胎的数目并进行统计分析，证实了 Zymosan-A 可以对辐射诱导的小鼠卵巢生殖功能损害发挥一定程度的改善作用。在小鼠卵巢功能评估过程中，我们还对各组小鼠的动情周期进行监测，结果显示，相较于单纯辐照组近 2/3 的小鼠出现了动情周期紊乱，辐照给药组仅有 45% 左右发生了动情周期紊乱。在该部分研究过程中，我们还开展相关实验评估了 Zymosan-A 对小鼠卵巢辐射防护效应的远期影响，实验结果表明，与单纯辐照组相比，辐照给药组小鼠后代体重更高，且具有明显差异。体外细胞实验主要以辐照后小鼠卵巢颗粒细胞活力、小鼠卵巢颗粒细胞克隆形成率及辐照后小鼠卵巢颗粒细胞凋亡率等指标来评价 Zymosan-A 对放射线引起的小鼠卵巢损伤的防护效应。在辐照前 12 小时和辐照前 2 小时分别给予小鼠卵巢颗粒细胞 Zymosan-A 预刺激，并检测上述指标，结果显示，Zymosan-A 可以明显提高辐照后小鼠卵巢颗粒细胞的细胞活力和克隆形成率并降低辐照诱导的小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡率。综上所述，此部分研究内容从体内到体外实验，在多个方面，通过多重指标全面评价 Zymosan-A 的辐射防护作用。

三、Zymosan-A 发挥放疗性卵巢损伤防护效应的初步机制探讨

在 Zymosan-A 发挥卵巢辐射损伤防护作用初步机制探讨这一研究内容中我们首先运用转录组测序方法进行差异基因筛选，根据差异基因结果构建了 TLR2 KO 小鼠

并开展相关实验进行验证，最后通过 RT-PCR 实验和 Western-blot 实验加以验证。通过对单纯辐照组及辐照给药组小鼠卵巢组织进行转录组测序，最终确定 268 个差异表达基因，其中 156 个差异基因显著上调，112 个差异基因显著下调。对上调差异基因分析发现，*Tlr2* 的差异显著性最大，根据这一结果以及前期其他实验结果，我们构建了 TLR2 基因敲除小鼠并开展研究，结果证实，TLR2 基因的敲除会显著加重放射线对小鼠卵巢组织的损伤。进一步，我们进行差异基因的 KEGG 分析，发现上调基因主要在 TLRs 通路及 NF- κ B 通路显著富集。这与课题组前期工作中已经证实 NF- κ B 信号通路与辐射防护有关相一致。最后，我们通过 RT-PCR 及 Western-blot 实验进一步验证，得出相同结论。

四、创新性

(1) 模拟临床盆腔放疗过程，通过设置放射剂量梯度及不同辐照次数，构建了一个相对稳定的放射性卵巢损伤动物模型；

(2) 通过文献调研、理论分析和预实验验证，筛选出潜在卵巢辐射损伤防护剂 Zymosan-A，并对其毒性及卵巢辐射损伤防护作用进行了系统性研究；

(3) 运用转录组测序筛选出 Zymosan-A 发挥卵巢辐射损伤防护效应的潜在靶点和机制。

五. 不足之处

(1) 虽然我们通过体内外实验证实了其可以对小鼠卵巢组织发挥辐射损伤防护效应，但其发挥效应的具体靶细胞未知；

(2) 我们通过转录组测序筛选出 Zymosan-A 发挥放射性卵巢损伤防护效应的潜在通路，但对其验证的工作目前尚不深入，后期拟继续通过在基因敲除小鼠层面开展相关研究，同时运用受体或通路抑制剂进行相关论证；

(3) 初步的转录组测序结果筛选出一个可能的关键基因：*Tlr2*，但其验证工作开展的尚不深入，后续仍需在小鼠及细胞等多个层面开展研究；此外，后续研究过程中拟继续对转录组测序结果进行分析和挖掘，希望找寻出其他的参与卵巢辐射损伤防护的关键基因。

综述

放射治疗对卵巢功能影响的机制及防护研究进展

摘要

随着肿瘤综合治疗措施的不断发展, 在提高肿瘤患者生存率的同时, 对于年轻女性肿瘤患者的生育力保存, 日益引起重视。放疗作为肿瘤综合治疗中的重要组成部分, 可引起青春期和育龄女性的卵巢损伤, 进而导致其生育力下降及一系列不良反应。放射线除直接作用于生物大分子进而引起卵巢损伤外, 还可以通过增加各级卵母细胞及卵巢颗粒细胞间的氧化应激水平引起卵巢间接损伤。现阶段, 在接受放射治疗的女性肿瘤患者生育力保存具体实践过程中, 主要包含物理防护、药物防护及生物防护三方面措施。近些年来, 相关女性肿瘤患者的生育力保存新技术的发展也为此带来了新希望, 包括防护效果、患者年龄、具体肿瘤治疗措施的选择等在内的因素, 是生育力保存相关措施选择过程中主要考虑的方面。本文综述放射治疗引起卵巢损伤的研究进展, 着重介绍对接受放疗的年轻女性肿瘤患者的生育力保存措施与新技术进展。

关键词: 放射治疗, 卵巢损伤, 继发性卵巢功能不全, 生殖功能, 生育力保存

2020年, 全世界新发女性恶性肿瘤患者达920万以上, 其中相当部分为青春前期和育龄女性^[1]。以手术及放化疗为主的肿瘤综合治疗措施的不断发展, 使得肿瘤患者的生存率得到极大提高, 同时也对肿瘤患者的生活质量提出了更高要求^[2]。对于育龄期女性, 包括放射治疗在内的肿瘤治疗在一定程度上均可能会造成卵巢功能损伤, 致使卵巢储备过早耗尽、卵巢内分泌功能紊乱, 从而导致育龄期女性肿瘤幸存者生育能力下降和更年期提前等一系列远期影响^[3-4]。

女性卵巢卵泡池内的卵泡数量是固定的, 出生后即不可再生, 并且随着年龄的增长而下降。越来越多的临床肿瘤医生逐渐意识到在肿瘤治疗过程中及时评估育龄期女性肿瘤患者的卵巢功能, 尽早地发现卵巢损伤, 及时采取干预措施, 对于保存生育能力, 具有十分重要的意义。然而, 目前的研究重点往往聚集于肿瘤治疗本身, 对于女性肿瘤患者的生殖内分泌及生育能力保存的关注较少。鉴于此, 本文就近些

年相关研究及进展做一综述。

一、放射治疗对卵巢功能的影响

所有接受盆腹腔区域放疗的年轻女性肿瘤患者其卵巢功能均有可能受到影响，具体的影响程度大小主要取决于放疗的剂量、照射的区域以及患者年龄^[5-6]。通常对于在骨盆外区域接受放疗及青春期前接受放疗的女性来说，发生继发性卵巢功能不全的风险相对较低^[6]。

放射治疗对女性肿瘤患者卵巢功能的影响根据发生的时间快慢可分为急性损伤及慢性损伤。急性损伤通常发生在较大剂量的放射治疗之后，导致卵巢组织在短时间内发生不可逆损伤，直接引起卵巢功能的丧失，出现更年期症状，表现出潮热、情绪变化、阴道的干燥及萎缩以及闭经等。慢性损伤通常持续存在，且影响较持久。在青春期之前接受盆腔区域放疗的女童，可能出现青春期的发育障碍，第二性征延迟，月经稀发，甚至直接不发育^[7]。对于接受盆腔放疗的育龄期女性肿瘤患者，因卵巢慢性损伤的影响，可出现骨密度降低，表现为骨质减少以及骨质疏松^[6-8]。另外，有报道指出放射治疗引起的卵巢慢性损伤还可增加某些心血管系统疾病的发病率^[6-7]。在月经方面，放射治疗引起的卵巢慢性损伤主要表现为月经量减少、月经稀发，月经期紊乱，暂时性闭经等^[7-8]。

卵泡是女性卵巢的基本功能单位，由卵母细胞和卵巢颗粒细胞组成。卵母细胞对辐射高度敏感，Wallace 等^[9]的研究证实，引起人类一半卵泡闭锁的放疗剂量（LD50） < 2 Gy，且卵泡的放疗敏感性受年龄的影响：40岁以下的妇女敏感性较低，需要 20 Gy 才能出现卵巢的永久性损伤，而老年妇女仅需要 6 Gy。这种辐射剂量与年龄的反比关系可能是随着年龄的增长卵泡池中原始卵泡数量下降的结果^[10]。此外，卵母细胞的辐射敏感性还与具体的卵泡阶段相关，未成熟卵泡相比成熟卵泡辐射敏感性更低，更不易受到 γ 射线的损伤^[9]。卵巢颗粒细胞的增殖与分化直接影响着卵泡的生长启动、发育、排卵、黄体形成以及甾体激素分泌等卵巢功能活动。同时，颗粒细胞还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。放射治疗可直接作用于正在分裂的卵巢颗粒细胞进而导致卵巢损伤，有研究证实在放疗后的几小时内就能够观察到明显的卵巢颗粒细胞死亡^[11]。此外，Stroud 等^[11]研究指出，放疗引起的卵巢损伤还可能与辐照引起的卵巢基质血管损伤

以及卵巢组织萎缩和纤维化有关。

二、放射治疗引起卵巢损伤的机制

放疗可通过直接效应对卵巢功能产生影响，也可通过间接效应造成卵巢损伤。直接效应是指放射线对生物大分子的直接损伤，如蛋白质、脂类以及 DNA 等，特别是 DNA，它是放疗引起卵巢损伤的主要效应物，一旦被破坏，可以引起细胞分裂和增殖延缓，甚至导致细胞凋亡乃至坏死的发生。间接效应是指放疗产生的氧自由基对生物大分子的影响，主要是水电解之后产生的活性氧（ROS）的效应。最常见的活性氧（ROS）包括超氧化物阴离子（O₂⁻）、过氧化氢（H₂O₂）和羟基自由基（OH⁻）^[12]。少量的 ROS 对细胞反应和免疫功能表现出有益的作用，而过量的 ROS 会破坏身体的抗氧化防御系统，从而导致氧化应激^[13]。这些 ROS 可与脂质、DNA 和蛋白质反应，并在其中引起氧化损伤，导致生物分子的结构损伤，如 DNA 的单链断裂（SSBs）或双链断裂（DSBs）以及 DNA-DNA 或 DNA-蛋白质的交联，导致细胞死亡^[14-15]。ROS 还可以通过破坏生物分子和激活相关信号通路来增加卵巢颗粒细胞的凋亡^[16-18]。氧自由基有两个不成对的电子，可以迅速添加到许多其他自由基中，进一步增加生物大分子的损伤，产生新的反应性自由基，并促进连锁反应。

三、放疗相关卵巢损伤的防护措施

1. 物理防护：针对放疗射线的物理防护，已有多年的历史，从最初的铅屏，到后来的铅衣、铅帽，主要目的是为了减少射线的直接损伤，但因不能有效避免类似于头颅放疗，进而影响下丘脑-垂体-性腺轴导致的卵巢损伤，效果不甚理想。近些年来，卵巢移位术的开展为需要接受盆腔放疗的肿瘤患者卵巢功能的保留带来了希望，通过卵巢移位术可一定程度降低卵巢受到 γ 射线引起的损伤^[19]。因此，卵巢移位术被认为是需要接受放疗的育龄期女性生育力保存的一项关键措施^[19-20]。然而，它在实际应用过程中常常受到一些条件的限制，例如卵巢储备能力差、有卵巢转移的高风险、只单纯进行化疗等。

2. 化学防护：抗辐射药物的研制一直是临床放射医师和辐射损伤防治领域研究者研究的热点，目前的研究主要聚集于天然化合物，主要包括巯基类化合物、氮氧自由基、二苯并咪唑、富勒烯、超氧化物歧化酶（SOD）等，且大多数仍处于基础研究阶段。临床上用于防治放射治疗引起的副损伤的主要药物为氨磷汀，但其不良

反应较大，限制了其临床应用^[21]。近年来，我国学者在中药领域也取得一定进展，但均受到疗效或者副反应等方面的限制^[22-23]。因此，目前亟需寻找一种不良反应小、效果显著的抗辐射药物。

3. 生物防护

(1) 胚胎冻存：据报道，胚胎冻存是现阶段育龄期女性肿瘤患者生育力保存的最成熟方法，同时也是育龄期女性肿瘤患者生育力保存的首选^[24]。目前已有多项研究证实了该项技术的安全性和有效性^[25-26]。在近些年的临床实践中，不管是胚胎的缓慢冷冻还是玻璃化冷冻方法均被证实具有良好的效果，得到广泛应用^[27]。在具体实施方面，相对于胚胎的缓慢冷冻，胚胎玻璃化冷冻方法在妊娠率和活产率方面可能效果更优^[28-30]。考虑到胚胎冷冻保存需要首先接受相应药物的卵巢刺激以及在胚胎构建过程中需要精子，因而此项技术在青春期前女性肿瘤患者及未婚育龄期女性肿瘤患者群体中的开展受到了极大限制。

(2) 卵母细胞冻存：卵母细胞冻存是胚胎冻存之外的另一种目前被广泛使用的技术，该技术是青春期前女性和相对年轻的育龄期女性肿瘤患者生育力保存的标准技术。随着玻璃化冷冻技术逐步被引入辅助生殖领域，现阶段利用冻存的卵母细胞与新鲜卵母细胞进行辅助生殖操作几乎可以取得相同的结果^[31]。2013年，美国生殖医学学会（American Society for Reproductive Medicine, ASRM）根据4项临床试验的结果已经批准了将卵母细胞冻存技术用于肿瘤患者的生育力保存^[32-35]。然而，因为同样涉及到卵巢刺激，该技术面临着与胚胎冷冻保存相似的缺点，极大地限制了其在青春期前女性肿瘤患者群体中的开展，但它为未婚育龄期女性肿瘤患者提供了另一种生育力保存的选择。

(3) 卵巢组织冷冻保存与移植：卵巢组织冻存是在肿瘤治疗之前，通过卵巢活检、卵巢部分切除术或卵巢全切获得卵巢组织进行冷冻保存。该项技术是患有癌症的儿童或需要立即接受治疗的育龄期女性肿瘤患者生育力保存的唯一选择。该项技术的实施，可以最大程度地保存卵母细胞，并保护卵巢的激素功能，从而提高年轻女性肿瘤患者的生活质量。现阶段的研究提示，缓慢冷冻保存技术是卵巢组织冷冻保存的首选方法^[36]。2019年的一项包含60例患者的回顾性研究显示，92.9%的患者在移植了使用缓慢冷冻技术保存的卵巢组织后，其卵巢功能均得到了恢复^[37]。在卵

巢功能恢复后妊娠结局上，已有研究证实了其有效性^[38-39]。然而，卵巢组织移植的可实施性虽已被证实，但其在实施过程中也存在诸多限制，例如卵巢恶性肿瘤或血液恶性肿瘤，是该项技术开展的禁忌症，因其卵巢组织中可能已包含肿瘤组织或细胞。

四、肿瘤患者生育力保存相关研究新技术

生殖医学的进步给肿瘤患者的生育力保存带来了诸多可能，但均面临着或多或少的限制。相关研究者在其他方面也提出了新的尝试，以期待为肿瘤患者的生育力保存提供更多的选择。

1. 全卵巢移植：全卵巢移植技术的提出有利于移植术后血管的吻合和卵巢血运的重建，从而减少卵巢的缺血性损伤。目前已有动物研究报道了成功的全卵巢冷冻保存和移植^[40-42]。然而，低温保存对卵巢血管的损伤等技术难题的存在，使其短期内很难用于临床实践^[42]。另一方面，迄今为止，尚没有成熟的实验模型可以用来探索人类卵巢的冷冻保存和再移植技术。因此，该项技术的研究仍需要较多的验证。

2. 体外成熟技术：现阶段，体外成熟技术的实践更多是针对多囊卵巢综合征（polycystic ovarian syndrome, PCOS）患者。简而言之，就是在未成熟卵泡阶段或将卵泡在体外培养成熟后提取出未成熟卵母细胞并进行冷冻保存^[43]。这项技术也可以用于缺乏足够时间进行卵巢刺激的癌症患者，或需要立即治疗的育龄期女性。尽管许多研究人员试图通过联合体外成熟技术和玻璃化冷冻技术开展研究，但目前该项技术在肿瘤患者群体的小范围实施过程中仅有少数成功的案例^[44-46]。因此，其后续的开展可能需要更多的技术改进及临床实践。

3. 人工卵巢：人工卵巢是通过将卵巢组织与部分小分子支架一同移植入体内，小分子支架通过释放多种生物活性材料，加速组织血管化进而实现卵巢重建^[47-48]。在前期的动物实验研究中，研究者通过这种方法恢复了实验对象的生殖功能，促使其体内卵泡发育和妊娠成功。然而，迄今为止，该项技术在人类实践过程中尚无成功案例的报道。

4. 卵巢干细胞：干细胞在生育力保存中的研究是近些年来逐渐发展起来的新兴方向^[49]。这项技术可能为患有癌症的青春前期女性和传统生育力保存方法不适用的女性肿瘤患者提供另一种选择。然而，该项技术的实施，面临着人类辅助生殖证据

不足、卵巢干细胞稀缺，以及对相关伦理问题等多方面挑战，它在临床实践中的具体实施需要进一步论证。

五、结语

近年来，包括放化疗在内的肿瘤综合治疗措施的逐步发展，使得肿瘤患者的生存率得到了极大提高，幸存的肿瘤患者在很长一段时间内均需面临肿瘤治疗副反应的影响^[50]。包括放疗在内的肿瘤治疗手段往往会对卵巢功能产生影响，使年轻女性肿瘤患者出现卵巢功能紊乱，严重时可能造成卵巢早衰。尽管肿瘤治疗的益处包括缓解或治愈，但卵巢功能过早丧失无疑会对女性产生不良影响。除了生育能力丧失外，卵巢功能下降还可能导致更年期提前，后者与潮热、骨密度降低和心血管不良事件的发生相关^[51-52]。卵巢功能减退或卵巢功能衰竭的总体效应还可能导致女性肿瘤患者生活质量下降，甚至过早死亡^[53]。

越来越多的肿瘤医生及肿瘤患者的随访人员开始致力于肿瘤患者生育力保存的宣传和研究。“肿瘤生殖学(Oncofertility)”逐渐发展成为新兴热门学科^[54]。辅助生殖技术的不断发展给青春期前女性和育龄女性肿瘤患者的生育力保存提供了多种选择，但面临着技术难度大、短时间内难以推广及相对禁忌证等多重挑战。药物防护因操作过程相对简便，且与肿瘤的治疗极少产生冲突，受到了越来越多的研究者和临床医生关注，但目前多数药物仍处于研究阶段。生育力保存新技术的研究和发展，有望在未来为青春期前和育龄期女性肿瘤患者的生育力保存提供更多可能性。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*. 2019,69(5):363-385. DOI: 10.3322/caac.21565.
- [3] Chemaitilly W, Li Z, Krasin MJ, et al. Premature ovarian insufficiency in childhood cancer survivors: A report from the St. Jude Lifetime Cohort[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017,102(7):2242-2250. DOI: 10.1210/jc.2016-3723.
- [4] Muka T, Oliver-Williams C, Kunutsor S, et al. Association of age at onset of menopause and time since onset of menopause with cardiovascular outcomes, intermediate vascular traits, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Cardiol*, 2016,1(7):767-776. DOI:10.1001/jamacardio.2016.2415.
- [5] Kelsey TW, Hua CH, Wyatt A, et al. A predictive model of the effect of therapeutic radiation on the human ovary[J]. *PLoS One*, 2022,17(11): e0277052. DOI: 10.1371/journal.pone.0277052.
- [6] Gao W, Liang JX, Yan Q. Exposure to radiation therapy is associated with female reproductive health among childhood cancer survivors: a meta-analysis study[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015,32(8):1179-1186. DOI: 10.1007/s10815-015-0490-6.
- [7] Lawrenz B, Henes M, Neunhoeffer E, et al. Fertility preservation in girls and adolescents before chemotherapy and radiation - review of the literature[J]. *Klin Padiatr*, 2011,223(3):126-130. DOI: 10.1055/s-0031-1275292.
- [8] Reiser E, Bazzano MV, Solano ME, et al. Unlaid eggs: ovarian damage after low-dose radiation[J]. *Cells*, 2022,11(7). DOI: 10.3390/cells11071219.
- [9] Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(1): 117-121. DOI: 10.1093/humrep/deg016.
- [10] Van DW, Mulder RL, Kremer LC, et al. Recommendations for premature ovarian insufficiency surveillance for female survivors of childhood, adolescent, and young adult cancer: a report from the international late effects of childhood cancer guideline harmonization group in collaboration with the PanCareSurFup Consortium [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(28): 3440-50. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.3288.
- [11] Stroud JS, Mutch D, Rader J, et al. Effects of cancer treatment on ovarian function[J]. *Fertil Steril*, 2009,92(2):417-427. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1714.

- [12] Laverne JA. OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water [J]. *Radiat Res*, 2000, 153(2): 196-200. DOI:10.1667/0033-7587(2000)153.
- [13] Fischer N, Seo EJ, Efferth T. Prevention from radiation damage by natural products [J]. *Phytomedicine*, 2018, 47:192-200. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.11.005.
- [14] Hatzi VI, Laskaratou DA, Mavragani IV, et al. Non-targeted radiation effects in vivo a critical glance of the future in radiobiology [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1): 34-42. DOI:10.1016/j.canlet.2013.11.018.
- [15] Sridharan DM, Asaithamby A, Bailey SM, et al. Understanding cancer development processes after HZE-particle exposure: roles of ROS, DNA damage repair and inflammation [J]. *Radiat Res*, 2015, 183(1): 1-26. DOI: 10.1667/RR13804.1.
- [16] Pala Ş, Atilgan R, Kuloğlu T, et al. Protective effects of vitamin C and vitamin E against hysterosalpingography-induced epithelial degeneration and proliferation in rat endometrium[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016,10:4079-4089. DOI: 10.2147/DDDT.S117207.
- [17] Nambiar D, Rajamani P, Singh RP. Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy[J]. *Mutat Res*, 2011,728(3):139-157. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.07.005.
- [18] Kim BM, Hong Y, Lee S, et al. Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2015,16(11):26880-26913. DOI: 10.3390/ijms161125991.
- [19] McClam M, Xiao S. Preserving oocytes in oncofertility[J]. *Biol Reprod*, 2022,106(2):328-337. DOI: 10.1093/biolre/ioac008.
- [20] Loren AW, Mangu PB, Beck LN, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update[J]. *J Clin Oncol*, 2013,31(19):2500-2510. DOI: 10.1200/JCO.2013.49.2678.
- [21] Singh VK, Seed TM. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome [J]. *Expert Opin Drug Saf.*, 2019, 18(11): 1077-1090. DOI: 10.1080/14740338.2019.1666104.
- [22] 陈桂莲, 黄惠娟, 田黎明. 橄榄苦甙对卵巢辐射损伤的防治效果 [J]. *东南国防医药*, 2017, 19(6): 576-580. DOI: 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.06.005.
- [23] 赵粉琴, 安明霞, 丁晓南, 等. 基于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨左归丸对⁶⁰Co-γ射线损伤大鼠卵泡凋亡调控作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(18): 12-19. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20221894.

- [24] Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women[J]. N Engl J Med, 2017,377(17):1657-1665. DOI: 10.1056/NEJMra1614676.
- [25] Young SR, Chang YE, Yang WV, et al. Maximize the safety and efficacy of fertility preservation by random start/dual ovarian stimulation for early breast cancer patients[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2023,62(2):330-333. DOI: 10.1016/j.tjog.2022.08.017.
- [26] Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An ohss-free clinic by segmentation of IVF treatment[J]. Hum Reprod, 2011,26(10):2593-2597. DOI: 10.1093/humrep/der251.
- [27] Roque M, Lattes K, Serra S, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in *in vitro* fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2013,99(1):156-162. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.003.
- [28] Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance[J]. Hum Reprod Update,2017,23(2):139-155. DOI: 10.1093/humupd/dmw038.
- [29] AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, et al. Slow freezing, vitrification and ultra rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online, 2010,20(2):209-222. DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.11.013.
- [30] Debrock S, Peeraer K, Fernandez Gallardo E, et al. Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: a RCT[J]. Hum Reprod, 2015,30(8):1820-1830. DOI: 10.1093/humrep/dev134.
- [31] Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, et al. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients?[J]. Fertil Steril,2013,99(6):1485-1495. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.02.050.
- [32] Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2011,23(4):505-512. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.07.003.
- [33] Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, et al. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method[J]. Fertil Steril, 2008,89(6):1657-1664. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.050.
- [34] Cobo A, Meseguer M, Remohí J, et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial[J]. Hum Reprod, 2010,25(9):2239-2246. DOI: 10.1093/humrep/deq146.

- [35] Rienzi L, Romano S, Albricci L, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrifiedmetaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study[J]. HumReprod, 2010,25(1):66-73. DOI: 10.1093/humrep/dep346.
- [36] Lee S, Ryu KJ, Kim B, et al. Comparison between slow freezing and vitrification forhuman ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(13):3346. DOI: 10.3390/ijms20133346.
- [37] Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation[J]. Fertil Steril, 2013,99(6):1503-1513. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.030.
- [38] Lee S, Ozkavukcu S, Ku SY. Current and future perspectives for improving ovarian tissue cryopreservation and transplantation outcomes for cancer patients[J]. Reprod Sci, 2021,28(6):1746-1758. DOI: 10.1007/s43032-021-00517-2.
- [39] Yan L, Wang L, Wu J, et al. Multi-biofunctional graphene oxide-enhanced poly-L-lactic acid composite nanofiber scaffolds for ovarian function recovery of transplanted-tissue[J]. NPJ Regen Med, 2022,7(1):52. DOI: 10.1038/s41536-022-00236-5.
- [40] Zhang JM, Sheng Y, Cao YZ, et al. Cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles: vitrification or conventional freezing?[J]. J Assist Reprod Genet, 2011,28(5):445-452. DOI: 10.1007/s10815-011-9539-3.
- [41] Zhang S, Yao H, Liu Y, et al. Hypothermic machine perfusion after static cold storage improves ovarian function in rat ovarian tissue transplantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2020,37(7):1745-1753. DOI: 10.1007/s10815-020-01797-4.
- [42] Hossay C, Donnez J, Dolmans MM. Whole ovary cryopreservation and transplantation: a systematic review of challenges and research developments in animal experiments and humans[J]. J Clin Med, 2020,9(10):3196. DOI: 10.3390/jcm9103196.
- [43] Lee JA, Barritt J, Moschini RM, et al. Optimizing human oocyte cryopreservation for fertility preservation patients: should we mature then freeze or freeze then mature?[J]. Fertil Steril, 2013, 99(5): 1356-1362. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.042.
- [44] Son WY, Henderson S, Cohen Y, et al. Immature oocyte for fertility preservation[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019,10:464. DOI: 10.3389/fendo.2019.00464.

- [45] Prasath EB, Chan ML, Wong WH, et al. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient[J]. *Hum Reprod*, 2014,29(2):276-278. DOI: 10.1093/humrep/det420.
- [46] Uzelac PS, Delaney AA, Christensen GL, et al. Live birth following in vitro maturation of oocytes retrieved from extracorporeal ovarian tissue aspiration and embryo cryopreservation for 5 years[J]. *Fertil Steril*, 2015,104(5):1258-1260. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1148.
- [47] Tavana S, Valojerdi MR, Azarnia M, et al. Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF[J]. *Growth Factors*, 2016,34(3-4):97-106. DOI: 10.1080/08977194.2016.1194835.
- [48] Tavana S, Azarnia M, Valojerdi MR, et al. Hyaluronic acid-based hydrogel scaffold without angiogenic growth factors enhances ovarian tissue function after autotransplantation in rats[J]. *Biomed Mater*, 2016,11(5):055006. DOI: 10.1088/1748-6041/11/5/055006.
- [49] Cheng H, Shang D, Zhou R. Germline stem cells in human [J]. *Signal Transduct Target Ther*. 2022, 7(1):345. DOI: 10.1038/s41392-022-01197-3.
- [50] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1):7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [51] Anagnostis P, Siolos P, Gekas NK, et al. Association between age at menopause and fracture risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *Endocrine*, 2019, 63(2):213-224. DOI: 10.1007/s12020-018-1746-6.
- [52] Stevenson JC, Collins P, Hamoda H, et al. Cardiometabolic health in premature ovarian insufficiency [J]. *Climacteric*, 2021,24(5):474-480. DOI: 10.1080/13697137.2021.1910232.
- [53] Blümel JE, Mezones-holguín E, Chedraui P, et al. Is premature ovarian insufficiency associated with mortality? A three-decade follow-up cohort [J]. *Maturitas*, 2022,163:82-87. DOI: 10.1016/j.maturitas.2022.06.002.
- [54] Reynolds AC, McKenzie LJ. Cancer treatment-related ovarian dysfunction in women of childbearing potential: management and fertility preservation options [J]. *J Clin Oncol*, 2023,41(12):2281-2292. DOI: 10.1200/JCO.22.01885.