

# Sericin Protects Vitrified Cryopreserved Mouse Ovarian Tissues by Upregulating the Expression of Nrf2/HO-1 and HSP90

Xin Zhang Weihan Shu Yuebing Qiao\*

Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China

## Abstract

**Objective:** The aim of this paper was to investigate whether sericin protects vitrified cryopreserved ovarian tissues by modulating HSP90 and Nrf2/HO-1 pathways. **Methods:** Thirty mouse ovaries were taken and randomly divided into fresh, control, 0.5% sericin, 1% sericin, and 0.1 mM melatonin (MLT) groups, and all four groups were cryopreserved by vitrification, except the fresh group. Hematoxylin-eosin staining (HE) and immunohistochemical staining (IHC) were performed. Protein immunoblotting (WB) and real-time fluorescence quantitative PCR experiments were performed in the four groups that were cryopreserved and frozen. **Results:** The sericin group improved the morphology of follicular cells and maintained a high rate of morphologic normalization. IHC showed that the sericin group increased the expression of Bcl-2 and decreased the expression of Bax and Caspase-3. The results of WB and PCR showed that the sericin group could effectively increase the levels of Nrf2, HO-1, HSP90 proteins and mRNA. The above results 1% sericin had the best effect, and there was no significant difference with 0.1 mM MLT. **Conclusion:** Sericin can improve the antioxidant capacity of cryopreserved ovaries, reduce apoptosis, and maintain the normal structure of ovaries, and its effect may be related to the up-regulation of Nrf2/HO-1 pathway and HSP90 expression.

## Keywords

sericin; ovarian tissue; cryopreservation; HSP90; Nrf2/HO-1

# 丝胶通过上调 Nrf2/HO-1 和 HSP90 的表达保护玻璃化冷冻小鼠卵巢组织

张欣 舒薇茵 乔跃兵\*

承德医学院, 中国·河北承德 067000

## 摘要

**目的:** 探究丝胶是否通过调控HSP90和Nrf2/HO-1通路来保护玻璃化冷冻卵巢组织。**方法:** 取30只小鼠卵巢, 随机分新鲜组、对照组、0.5%丝胶组、1%丝胶组和0.1mM褪黑素组(MLT), 除新鲜组外, 其他四组均进行玻璃化冷冻。进行苏木素-伊红染色(HE)及免疫组织化学染色(IHC)。玻璃化冷冻的四组进行蛋白免疫印迹(WB)和实时荧光定量PCR实验。**结果:** 丝胶组可改善卵泡细胞形态, 维持较高的形态正常率。IHC显示丝胶组增加Bcl-2的表达, 降低Bax和Caspase-3的表达。WB和PCR结果显示丝胶组可有效提高Nrf2/HO-1、HSP90蛋白和mRNA的水平。以上结果1%丝胶效果最佳, 与MLT无显著差异。**结论:** 丝胶可提高玻璃化冷冻卵巢的抗氧化能力, 降低细胞凋亡, 维持卵巢的正常结构, 其作用可能与上调Nrf2/HO-1通路及HSP90的表达相关。

## 关键词

丝胶; 卵巢; 冷冻保护; HSP90; Nrf2/HO-1

## 1 引言

卵巢组织冷冻保存是青春期前女性和抗癌治疗无法延迟的女性患者生育保护的有效手段<sup>[1]</sup>。但卵巢组织冷冻保存

仍有很多问题存在, 比如冷冻过程中产生的活性氧会破坏卵泡, 诱导卵泡凋亡并最终导致卵母细胞存活率和发育能力的下降<sup>[2]</sup>。如何在低温保存过程中有效保留卵巢组织的超微结构和后续内分泌功能恢复一直是研究学者关注的问题。

为降低卵巢组织冷冻过程中的氧化应激损伤, 已经有多种抗氧化剂被尝试添加到卵巢组织的冷冻复苏过程中, 比如白藜芦醇、褪黑素等, 研究证明抗氧化剂在一定程度上改善了卵泡凋亡和脂质过氧化<sup>[3,4]</sup>。丝胶是一种来自蚕丝的天然抗氧化剂<sup>[5]</sup>, 具有良好的生物相容性, 可以保护细胞免受低

**【作者简介】**张欣(1996-), 女, 中国内蒙古鄂尔多斯人, 在读硕士, 从事生殖内分泌研究。

**【通讯作者】**乔跃兵(1965-), 男, 中国河北衡水人, 博士, 从事生殖内分泌研究。

温损伤<sup>[6]</sup>。丝胶的添加有效减少了水牛、山羊冷冻过程中的氧化应激损伤,保护精子活力<sup>[7,8]</sup>。

HSP90 是细胞应激反应的标志物,也是负责蛋白质正确折叠、组装和运输的分子伴侣,研究发现,HSP90 可以通过多种机制,减少氧化应激反应,减少细胞凋亡<sup>[9]</sup>,已被确定为生理或低温条件下蛋白质稳定的重要调节因子。核因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素加氧酶 1 (HO-1) 被认为是重要的抗氧化途径。该途径的激活触发相应的抗氧化酶的产生,从而增强细胞清除活性氧的能力,维持体内氧化还原的平衡,减少氧化应激损伤<sup>[10]</sup>。

本实验旨在探究丝胶是否通过调控 Nrf2、HO-1 以及 HSP90 的表达发挥抗氧化作用,减少细胞凋亡,从而保护玻璃化冷冻卵巢组织功能和结构的完整性。

## 2 材料与方法

### 2.1 动物实验

取 30 只成年雌性 KM 小鼠(购自北京华府康生物科技有限公司,动物合格证编号 110323311102543151),行双侧卵巢摘除,将卵巢组织随机分为新鲜对照组,玻璃化冷冻对照组,0.5% (v/m) 丝胶组,1% (v/m) 丝胶组 (sericin) 和褪黑素 (0.1mM MLT) 组,每组 12 枚卵巢。将取出的卵巢按步骤进行玻璃化冷冻复苏。本实验已通过承德医学院伦理委员会审批,伦理审批编号为:CDMULAC-20220421-004。

### 2.2 冷冻液和复苏液的配制

配置冷冻液和复苏液,两者均以 Medium 199 液体培养基为基础溶液。冷冻液分 A、B 两种,A 液含 10mg/mL BSA、10% 乙二醇、10%DMSO 和 0.25mol/L 蔗糖;B 液含 10mg/mL BSA、20% 乙二醇、20%DMSO 和 0.25mol/L 蔗糖。复苏液根据步骤分为 A、B、C 三种,A 液含 3mg/ml BSA 和 0.5mol/L 蔗糖;B 液含 3mg/mL BSA 和 0.25mol/L 蔗糖;C 液仅含 3mg/mL BSA。根据分组,分别向冷冻液和复苏液中加入 0.5% 丝胶、1% 丝胶和 0.1mol/L MLT。

### 2.3 卵巢组织的冷冻和复苏

将取出的卵巢依次置于冷冻液 A、B 中各 5 分钟后,装入含有 B 液的冻存管中,在液氮蒸汽 (-30℃) 放置 5 分钟,最后放入液氮中保存至少两周。复苏时,将冻存管室温平衡 30s,放入 37℃ 水浴 1 分钟迅速解冻后,取出卵巢组织依次放置于复苏液 A、B、C 中各 5 分钟,完成复苏。

### 2.4 卵巢组织 HE 染色及形态学观察

卵巢组织复苏后于 4% 多聚甲醛固定 3 天,经全自动

组织脱水机处理后进行石蜡包埋,5μm 厚度切片,行 HE 染色。各组随机取 5 个卵巢,每枚卵巢取 5 张切片,光镜下观察卵泡形态并计数正常卵泡数量。形态卵泡正常率 = 正常形态卵泡数量 / 卵泡总数 × 100%。

### 2.5 免疫组织化学实验检测凋亡相关蛋白的表达

经 4% 多聚甲醛固定 3 天后的卵巢组织,脱水包埋,5μm 厚度切片,按试剂盒 (中杉金桥 pv-9000) 说明书要求进行免疫组织化学染色。所用一抗为 Bcl-2 (Engene, P10415)、Bax (Engene, Q07814)、Caspase-3 (Gene Tex, GTX110543),DAB 显色液购自中杉金桥生物科技有限公司。将染色切片置于显微镜 400 倍镜下观察,随机选取 5 个视野,检测样本中出现棕黄色颗粒即判定为阳性染色。阳性染色区域用平均灰度值表示,通过图像分析系统 (Image J 1.53e) 进行平均灰度值的测定。

### 2.6 蛋白免疫印迹 (Western Blotting) 检测 Nrf2/HO-1、HSP90 的蛋白表达水平

复苏的卵巢组织中加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液冰上研磨成组织匀浆,置于高速离心机 12000r/min, 4℃,离心 15min,得到蛋白上清。根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定各组蛋白浓度,测定各组蛋白体积后加入 1/4 体积的 5× 蛋白上样缓冲液,100℃ 干式孵育 10min 使蛋白变性。12%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样本,之后转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,取特异性一抗 HSP90 (Abcam, ab13495), Nrf2 (CST, 12721T), HO-1 (Abcam, ab68477), GAPDH (Abcam), 室温孵育 2h 并 4℃ 过夜。第二天室温复温 30min, TBST 洗膜缓冲液冲洗 3 次,加入 HRP 荧光标记的二抗,室温孵育 1h 后 TBST 洗膜缓冲液冲洗 3 次。避光加入 ECL 特超敏发光液,经 Tanon 6100 凝胶成像仪扫描显影。通过 Image J 1.53e 软件分析目的蛋白和内参蛋白的灰度值,进而判定目的蛋白相对表达水平。

### 2.7 实时荧光定量 PCR 法检测相关 mRNA 的表达

使用 Takare 试剂盒提取各组复苏卵巢组织的总 RNA,分光光度计测定各组 RNA 浓度及纯度,通过 Takare 反转录试剂盒合成 cDNA,根据 TB Green qPCR Premix 扩增试剂盒说明书以 cDNA 作为模板进行 Real-time PCR 反应,扩增条件为:预变性,95℃,30s;95℃,5s,60℃,30s,40 个循环。得到检测指标 Nrf2、HO-1、HSP90 mRNA 表达的 CT 值后,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行定量分析,各检测指标引物均购自上海生工工程有限公司,引物序列如表 1 所示。

表 1 各检测指标引物序列

Gene	Forward	Reverse
Nrf2	5'-ACTACAGTCCCAGCAGAGTGATGG	5'-GCGTGCTCAGAAACCTCCTCC
HO-1	5'-ACCGCCTTCCTGCTCAACATTG	5'-CTCTGACGAAGTGACGCCATCTG
HSP90	5'-GGCTGAGGACAAGGAGAACTACAAG	5'-CGGCGTCGGTTAGTGAATCTTC
GAPDH	5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

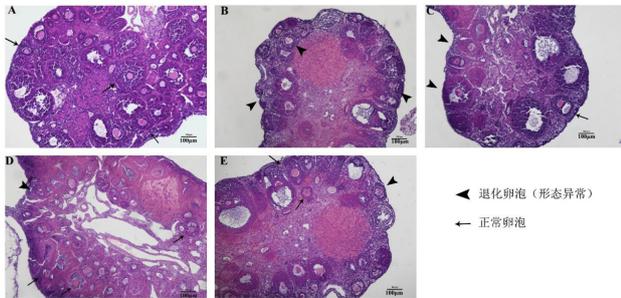
## 2.8 统计分析

使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 所有实验重复三次, 实验数据以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

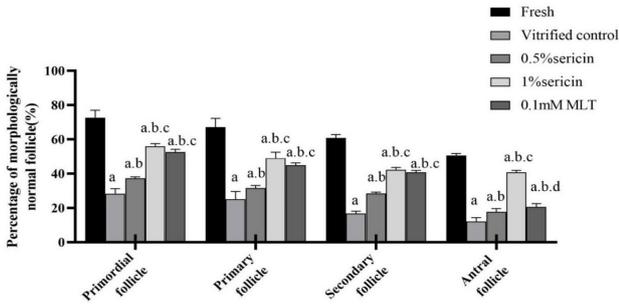
### 3.1 各组卵巢形态学观察

如图 1 所示, 新鲜组卵泡及卵母细胞形态规整, 颗粒细胞紧密排列在卵母细胞周围, 基底膜完整; 冷冻对照组卵泡及卵母细胞形态不规则, 卵母细胞变形、胞质皱缩, 颗粒细胞从基底膜脱落。添加褪黑素及丝胶均能有效改善卵泡的变形退化, 有效地保护了卵母细胞及颗粒细胞的正常形态, 提高各级卵泡形态正常率 ( $P < 0.05$ ), 其中 1% 丝胶效果显著, 与褪黑素组无显著差异或略高于褪黑素组 (图 1、图 2)。



A—新鲜组; B—玻璃化冷冻对照组; C—0.5% 丝胶组; D—1% 丝胶组; E—0.1mM MLT 组

图 1 各组小鼠卵巢组织 HE 染色 (100×), 比例尺 =100μm



Primordial follicle—原始卵泡; Primary follicle—初级卵泡  
secondary follicle—次级卵泡; Antral follicle—窦状卵泡。

图 2 各实验组各级卵泡的形态正常率

注: <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Vitrified control; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. 0.5%sericin; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs.1%sericin。

### 3.2 丝胶减少冻融卵巢组织的细胞凋亡

免疫组织化学染色结果显示, Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 均主要表达在卵母细胞中, Bcl-2 在新鲜组表达最高, 在玻璃化冷冻对照组表达最低, 丝胶和褪黑素有效上调了 Bcl-2

的表达 ( $P < 0.05$ )。Bax 和 Caspase-3 的表达情况与之相反, 丝胶和褪黑素有效降低了卵巢组织中 Bax 和 Caspase-3 的表达 (图 3)。

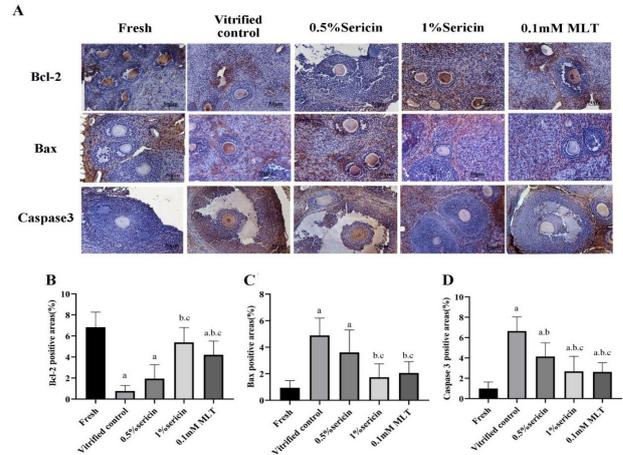


图 3 凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax, Caspase3 在各卵巢组织中的分布及表达情况

注: <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Vitrified control; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. 0.5%sericin; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs.1%sericin。

### 3.3 丝胶上调 HSP90 在冻融卵巢组织中的表达

实时荧光定量 PCR 结果显示, HSP90 在玻璃化冷冻卵巢组织中表达显著下降, 而 1% 丝胶和褪黑素的添加有效提高了 HSP90 的表达 ( $P < 0.05$ ), 蛋白免疫印迹检测的结果与之一致, 其中 1% 丝胶的作用甚至优于褪黑素 (图 4)。

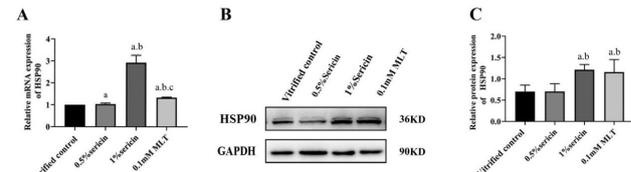


图 4 各冷冻卵巢组 HSP90 蛋白及 mRNA 表达情况

注: <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Vitrified control; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. 0.5%sericin; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs.1%sericin。

### 3.4 丝胶上调 Nrf2/HO-1 在玻璃化冻融卵巢组织中的表达

在本次实验中, 蛋白免疫印迹结果显示玻璃化冷冻对照组 Nrf2 和 HO-1 的表达显著下降, 而添加丝胶及褪黑素后提高了 Nrf2 和 HO-1 的表达 (图 4A-C), 其中 1% 丝胶效果最好, 甚至优于褪黑素 ( $P < 0.05$ )。Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平与蛋白表达水平一致 (图 5)。

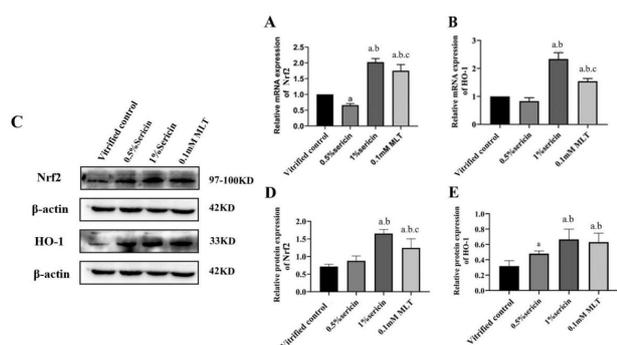


图 5 各冷冻卵巢组 Nrf2、HO-1 蛋白及 mRNA 表达情况

注: <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Vitrified control; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. 0.5%sericin; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs. 1%sericin。

## 4 讨论

卵巢组织冷冻保存为女性生育力保护提供了有效方案,但冷冻过程会造成活性氧的过度蓄积从而导致脂质过氧化、DNA 断裂等一系列氧化应激损伤,导致卵泡凋亡率升高,破坏卵泡形态结构的完整性。已有研究证明白藜芦醇、褪黑素等冷冻添加剂的抗氧化和抗凋亡作用<sup>[3,11]</sup>。本课题组前期实验证明在玻璃化冷冻小鼠卵巢组织中,褪黑素的使用增加了卵巢组织抗氧化能力,抑制了细胞凋亡,从而保护卵巢组织细胞的正常结构形态,且最佳浓度为 0.1mM<sup>[3]</sup>。丝胶作为抗氧化剂,能有效地减少玻璃化冷冻过程的氧化应激损伤,被应用于多种组织细胞的冷冻保护,我们的研究表明在玻璃化冷冻卵巢组织中,丝胶可以提高抗氧化基因的表达,并减少卵巢组织细胞的凋亡,有效保护了玻璃化冻融卵巢组织细胞的正常形态,且最佳浓度为 1% (v/m)。

当细胞处于氧化应激状态时,会激活线粒体凋亡通路,使细胞色素 C (Cytochrome C) 从线粒体中释放出来,激活 Caspase3 从而引发细胞凋亡, Bcl-2、Bax 是线粒体凋亡途径的主要调控因子。本次研究发现 1% 丝胶处理组有效提高了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,减少了促凋亡蛋白 Bax 的表达,以上结果均证实了丝胶的抗氧化活性和抗凋亡作用。

HSP90 是热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 之一,可以保证应激环境下蛋白质的正确折叠,识别受损蛋白质,抑制凋亡相关通路,从而减少细胞氧化损伤和细胞凋亡<sup>[12]</sup>。研究发现, HSP90 抑制剂可以破坏线粒体稳态,减少抗凋亡蛋白的表达,减少抗氧化酶的表达<sup>[12]</sup>。之前的研究证实了在精子冷冻过程中, HSP90 表达逐渐下降, HSP90 与精子抵抗低温压力和受精能力存在一定关系<sup>[13]</sup>。Pan 等人的研究证实 HSP90 的表达与玻璃化冻融卵母细胞发育能力及早期囊胚发育能力成正相关<sup>[14]</sup>。Cheng 等人的研究证实褪黑素可通过调控 HSP90 的表达减少玻璃化冻存卵巢组织的细胞凋亡,其表达水平与卵泡质量呈正相关<sup>[15]</sup>。本次研究结果与之前研究一致,卵巢组织玻璃化冷冻过程中 HSP90 的表达降低,但丝胶显著提高了 HSP90 的表达,减少了细胞凋

亡和卵泡形态变化。

Nrf2 是维持细胞氧化平衡的重要因子,在调节抗氧化基因的表达方面发挥重要作用, HO-1 是 Nrf2 下游重要的抗氧化酶,参与卵巢对氧化应激的反应<sup>[16]</sup>。当细胞内出现氧化应激, Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 分离,由此被激活并进入细胞核中,识别并结合抗氧化反应元件 (ARE),从而激活下游 HO-1 和各种抗氧化蛋白的表达,发挥抗氧化、抗凋亡的作用<sup>[17]</sup>。Sun 等人的研究证实褪黑素可通过 Nrf2/HO-1 通路抵抗玻璃化冷冻卵巢组织的氧化应激<sup>[11]</sup>。本实验中,丝胶提高了 Nrf2 及下游 HO-1 的表达,从而抵抗玻璃化冷冻过程卵巢组织的氧化应激损伤,减少细胞凋亡。但丝胶是通过直接作用 Nrf2 还是促使 Nrf2-Keap1 解离从而增加 Nrf2 的活性,有待于进一步的研究。

本研究中,丝胶维持了玻璃化冷冻卵巢组织的正常细胞形态,并降低了细胞凋亡,提高了抗氧化相关蛋白的表达以及热应激蛋白 HSP90 的表达,且最佳浓度为 1% (v/m)。提示 Nrf2/HO-1 信号通路的激活和 HSP90 的高表达可能是丝胶保护玻璃化冷冻卵巢组织的机制。

## 5 结论

丝胶作为天然抗氧化剂,有效减少了小鼠卵巢组织冷冻过程中卵泡细胞的凋亡,保护卵巢组织细胞形态的完整性,其作用可能是通过调节 HSP90 的表达和调控 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。

## 参考文献

- [1] M M Dolmans, J Donnez, L Cacciottola. Fertility Preservation: The Challenge of Freezing and Transplanting Ovarian Tissue[J]. Trends Mol Med, 27 (2021) 777-791.
- [2] X. Liu, Y. Xu, F. Liu, et al. The Feasibility of Antioxidants Avoiding Oxidative Damages from Reactive Oxygen Species in Cryopreservation[J]. Front Chem, 2021,26: 648684.
- [3] Xiao Chao Liu, Tie Cheng Sun, Hui Ying Li, et al. Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved ovarian tissue in mice[J]. Cryobiology, 2020,96: 99-105.
- [4] B. Kim, H. Yoon, T. Kim, et al. Role of Klotho as a Modulator of Oxidative Stress Associated with Ovarian Tissue Cryopreservation[J]. Int J Mol Sci, 2021,22:13547.
- [5] J.P. Kumar, B.B. Mandal. Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry silk sericin and its implications in biomedicine[J]. Free Radic Biology and Medicine, 2017,108: 803-818.
- [6] K. Tsujimoto, H. Takagi, M. Takahashi, et al. Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin[J]. J Biochem, 2001,129: 979-986.
- [7] V.S. Reddya, B. Yadava, C.L. Yadav, et al. Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat[J]. Cryobiology, 2018,84:33-39.

- [8] F. Farajdokht, S.M. Vatandoust, L. Hosseini, et al. Sericin protects against acute sleep deprivation-induced memory impairment via enhancement of hippocampal synaptic protein levels and inhibition of oxidative stress and neuroinflammation in mic[J]. *Brain Research Bulletin*, 2021,174: 203-211.
- [9] X. Li, R. Luo, R. Jiang, et al. The role of the Hsp90/Akt pathway in myocardial calpain-induced caspase-3 activation and apoptosis during sepsis[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2013,13: 8.
- [10] Xinwei Liu, Xiaochuan Gu, Miaomiao Yu, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on oxidative stress injury in rat spinal cords by regulating the eNOS/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2018,16: 1079-1086.
- [11] Tie Cheng Sun, Xiao Chao Liu, Song He Yang, et al. Melatonin Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in Cryopreserved Ovarian Tissues via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway[J]. *Front Mol Biosci*, 2020,7: 163.
- [12] A Taiyab, A S Sreedhar, C M Rao. Hsp90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009,78: 142-52.
- [13] E Bai, N Kang, J Zhao, et al. Cryopreservation disrupts lipid rafts and heat shock proteins in yellow catfish sperm[J]. *Cryobiology*, 2019,87: 32-39.
- [14] Y Pan, Y Cui, A R Baloch, et al. Association of heat shock protein 90 with the developmental competence of immature oocytes following Cryotop and solid surface vitrification in yaks (*Bos grunniens*)[J]. *Cryobiology*, 2015,71: 33-39.
- [15] L Y Cheng, T C Sun, X C Liu, et al. Melatonin induction of HSP90 expression exerts cryoprotective effect on ovarian tissue[J]. *Cryobiology*, 2021,98: 134-138.
- [16] Z Yan, Y Dai, H Fu, et al. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018,60: 261-271.
- [17] Q Li, B Li, C Liu, et al. Protective role of Nrf2 against mechanical-stretch-induced apoptosis in mouse fibroblasts: a potential therapeutic target of mechanical-trauma-induced stress urinary incontinence[J]. *Int Urogynecol J*, 2018,29: 1469-1477.