DOI:10.19893/j.cnki.ydyxb.2025-0068

Cathepsin B 介导巨噬细胞 M1 极化调控人卵巢储备功能减退机制探讨

李 姣[1],李红梅[2],岳红云[2],张媛媛[2*]

(1. 延安大学延安医学院,陕西 延安 716000; 2. 延安大学附属医院,陕西 延安 716000)

摘 要:目的 研究组织蛋白酶B(Cathepsin B)对巨噬细胞极化的影响及对卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve,DOR)的作用及相关机制。**方法** 获取7例卵巢组织样本及对应患者血清,根据抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)水平将样本分为正常组(n=3)及DOR组(n=4)。苏木素-伊红(haematoxylin-eosin,HE)染色、免疫组化和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)分析卵巢组织中的卵泡形态、Cathepsin B及巨噬细胞极化因子表达;qRT-PCR检测巨噬细胞M1极化后Cathepsin B表达的变化,敲低Cathepsin B后评估M1极化及核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)通路的变化;qRT-PCR及细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)检测巨噬细胞与人卵巢颗粒细胞(KGN)共培养后的颗粒细胞凋亡及增殖情况。**结果** 与正常组相比,DOR组卵巢组织中生长卵泡较少、闭锁卵泡较多,Cathepsin B、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α,TNF-α)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)的表达显著升高。巨噬细胞M1极化状态高表达Cathepsin B,敲低Cathepsin B后,M1极化因子及NF-κB通路相关因子表达均显著下降。巨噬细胞M1极化促进KGN细胞凋亡,并抑制其增殖。**结论** DOR患者卵巢组织中Cathepsin B的表达显著上调,且M1型巨噬细胞浸润明显。Cathepsin B可能通过靶向NF-κB信号转导通路促进巨噬细胞M1极化。巨噬细胞M1极化可促进人卵巢颗粒细胞的凋亡,抑制其增殖。

关键词:卵巢储备功能减退;组织蛋白酶B;巨噬细胞极化;卵巢颗粒细胞;NF-κB通路

中图分类号:R711.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2639(2026)01-0032-07

Exploration of the mechanism by which cathepsin B mediates macrophage M1 polarization in regulating human ovarian reserve dysfunction

LI Jiao[1], *LI Hongmei*[2], *YUE Hongyun*[2], *ZHANG Yuanyuan*[2*]

(1.Yan′an Medical College of Yan′an University, Yan′an 716000, China;
2.Yan′an University Affiliated Hospital, Yan′an 716000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cathepsin B on macrophage polarization and its role and mechanism in diminished ovarian reserve (DOR). **Methods** Seven ovarian tissue samples and the corresponding patient sera were obtained. The samples were divided into the normal group (n=3) and the DOR group (n=4) according to the anti-Müllerian hormone (AMH) level. Hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemistry and real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to analyze the follicular morphology, expression of cathepsin B and macrophage polarization factors in ovarian tissues. qRT-PCR was used to detect the changes in cathepsin B expression after M1 polarization in macrophages. After knockdown of cathepsin B, the

基金项目:中国高校产学研创新基金资助课题(2023HT055);陕西省自然科学基础研究计划项目(2024JC-YBMS-762);延安市科技计划项目(2023-SFGG-146)

作者简介:李 姣(2000—),女,陕西榆林人,在读硕士研究生。研究方向:生殖内分泌。

* **通信作者:**张媛媛(1986—),女,陕西延安人,副主任医师,硕士研究生导师。研究方向:生殖内分泌。E-mail:2061331730@qq.com

changes in M1 polarization and the nuclear factor-κB (NF-κB) pathway were evaluated. The apoptosis and proliferation of granulosa cells after co-culture of macrophages and human ovarian granulosa cells (KGN) were detected by qRT-PCR and the cell counting kit-8 (CCK-8). **Results** Compared with the normal group, the DOR group had fewer growing follicles and more atretic follicles in the ovarian tissue, and the expressions of cathepsin B, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were significantly increased. In the M1 polarization state of macrophages, cathepsin B is highly expressed. After knocking down cathepsin B, the expressions of M1 polarization factors and NF-κB pathway-related factors all decreased significantly. M1 polarization of macrophages promotes apoptosis of KGN cells and inhibits their proliferation. **Conclusion** The expression of cathepsin B in the ovarian tissues of DOR patients was significantly upregulated, and there was a notable infiltration of M1 type macrophages. Cathepsin B may promote the M1 polarization of macrophages by targeting the NF-κB signaling pathway. The M1 polarization of macrophages can induce apoptosis of human ovarian granulosa cells and inhibit their proliferation.

Key words: Diminished ovarian reserve; Cathepsin B; Macrophage polarization; Ovarian granulosa cells; NF-κB pathway

卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)是指卵母细胞质量和数量的减少[1]。近年来DOR的发病率逐渐上升,且患病人群趋于年轻化,已成为女性生殖健康领域的重要问题[2]。因此,提前预防及治疗DOR对保护女性生殖健康具有重要意义。组织蛋白酶B(cathepsin B)是木瓜蛋白酶样溶酶体半胱氨酸肽酶C1家族的成员之一,在炎症因子刺激下,溶酶体膜稳定性受损甚至发生破裂,导致大量Cathepsin B向胞质内释放,进而触发细胞炎症性坏死及凋亡等细胞死亡途径[3]。Li等[4]研究发现,Cathepsin B可导致核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)p65的磷酸化及核易位,最终加剧血管平滑肌细胞的焦亡。另有研究[5]表明,下调Cathepsin B可抑制小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡。巨噬细胞是免疫系统的核心效应细胞,在宿主防御、炎症调控及组织稳态维持中发挥多重关键作用。组织驻留巨噬细胞具有显著的可塑性,能够响应微环境信号发生不同极化表型,主要分化为:经典活化型(M1)及替代活化型(M2)[6]。M1型巨噬细胞由干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等促炎信号诱导,高表达促炎细胞因子如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等,发挥抗菌和抗肿瘤作用。M2型巨噬细胞受白介素-4(IL-4)和白介素-13(IL-13)等抗炎因子调控,高表达精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、转化生长因子-β(transforming growth factor β, TGF-β)等标志物,参与组织修复和免疫调节[4]。研究[7]显示M1型巨噬细胞可显著促进衰老相关表型的累积。本研究在组织及细胞水平探讨Cathepsin B对巨噬细胞极化的影响,并进一步阐明其调控卵巢储备功能的相关机制,旨在为DOR的预防及治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床样本及分组 获取延安大学附属医院妇科行卵巢良性病灶切除术后,病灶边缘的少量卵巢组织样本共7例,并获取对应患者术前血清,患者年龄为30~40岁,且患者均知情同意。根据血清中抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)水平将样本分为正常组(n=3)及DOR组(n=4)。本研究得到延安大学附属医院伦理委员会的批准(伦理批件号:S-S20240153号)。

1.1.2 实验细胞 人单核白血病细胞(THP-1)购自中国科学院细胞库,人卵巢颗粒细胞(KGN)购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

抗CD68兔pAb、抗Cathepsin B兔pAb、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG(PBS稀释)、苏木素染液、伊红染液及细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)均购自武汉赛维尔(GB113150、GB115596、GB23303、G1004、G1001、G4103);RNAex Pro Reagent、反转录预混型试剂盒及定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)试剂盒均购自艾科瑞生物(AG21101、AG11728、AG11701);siRNA及

PCR 引物均由艾科瑞生物设计并合成；佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate，PMA)购自美国MCE(HY-18739)；脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)购自北京索莱宝(L8880)；Lipofectamine™ 8000转染试剂购自碧云天(C0533)。细胞计数仪(美国赛默飞，型号：A49892)；高速冷冻离心机(安徽中科中佳，型号：KDC-140HR)。

1.3　苏木素-伊红(haematoxylin-eosin，HE)染色

固定24 h后的卵巢组织进行脱水、浸蜡及包埋，取部分切片进行HE染色，在显微镜下观察卵巢组织中的卵泡形态并采集图像。生长卵泡比例=(原始卵泡个数+初级卵泡个数)/总卵泡个数×100%，闭锁卵泡比例=闭锁卵泡个数/总卵泡个数×100%。

1.4　免疫组织化学染色

取上述卵巢组织切片，脱蜡水化，抗原修复，过氧化氢阻断内源性过氧化物酶，牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)封闭，加入一抗过夜孵育，复温后加入二抗孵育50 min，二氨基联苯胺(diaminobenzidine，DAB)显色，苏木素复染，脱水封片。显微镜观察Cathepsin B及M1型巨噬细胞标志物CD68，采用Image J软件量化免疫组化结果。

1.5　实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction，qRT-PCR)

采用Trizol提取组织及细胞中的总RNA。依次进行反转录及定量PCR分析。qPCR反应条件为：95 ℃ 30 s×1次，(95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s)×40次循环。数据采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法进行分析，均以GAPDH作为内参，检测*Cathepsin B*、M1型巨噬细胞极化因子(*TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β*、*iNOS*)、NF-κB通路因子(*IκBα*、*NF-κB*)及促凋亡因子(*Bax*、*Caspase 3*、*p53*)的mRNA表达水平。引物序列见表1。

1.6　细胞培养

THP-1使用RPMI-1640完全培养基，KGN使用DMEM完全培养基，均置于37 ℃、5% CO_2条件下的培养箱中培养。细胞生长状态良好且处于对数生长期时进行传代或冻存。

1.7　M1型巨噬细胞模型构建

用100 ng/mL PMA诱导THP-1 48 h，细胞呈贴壁生长，即分化为M0型巨噬细胞，再用100 ng/mL LPS诱导M0 36 h使其转化为M1型巨噬细胞[8-9]。

1.8　细胞转染

按1.7步骤将THP-1诱导为M1型巨噬细胞，待细胞融合度为70%~80%即可进行瞬时转染，转染前将每孔中上清换成2 mL新鲜的完全培养基。向125 μL不含抗生素和血清的RPMI-1640培养基中加入3 μL siRNA-Cathepsin B或siRNA-NC，轻轻吹打混匀。再加入3 μL转染试剂，轻轻吹打混匀后室温下孵育。20 min后于细胞中滴加125 μL配制好的混合物，轻轻摇晃混匀。经转染48 h后使用qRT-PCR检测转染效率。

表1　qRT-PCR引物序列

基因名称	引物序列(5′to 3′)
Cathepsin B	Forward：TGTGTATTCGGACTTCCTGCTC
	Reverse：GGTGTGCCATTCTCCACTCC
TNF-α	Forward：CTGCCTGCTGCACTTTGGAG
	Reverse：ACATGGGCTACAGGCTTGTCACT
IL-6	Forward：AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
	Reverse：TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
IL-1β	Forward：CCAGGGACAGGATATGGAGCA
	Reverse：TTCAACACGCAGGACAGGTACAG
iNOS	Forward：CAGCAAGCAGCAGAATGAGTCC
	Reverse：TGCATCCAGCTTGACCAGAGA
IκBα	Forward：CAAGCACCCGGATACAGCA
	Reverse：TCATCATAGGGCAGCTCGTC
NF-κB	Forward：AGTGAAGACCACCTCTCAGG
	Reverse：CTCGGTAAAGCTGAGTTTGCG
Bax	Forward：GGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG
	Reverse：GTCCAGCCCATGATGGTTCT
Caspase 3	Forward：GACTCTGGAATATCCCTGGACAACA
	Reverse：AGGTTTGCTGCATCGACATCTG
p53	Forward：GCATCTTATCCGAGTGGAAGGA
	Reverse：GGTGGTACAGTCAGAGCCAA
GAPDH	Forward：GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Reverse：TGGTGAAGACGCCAGTGGA

1.9　细胞间接共培养模型

按1.7步骤将THP-1诱导为M0型及M1型巨噬细胞，收集上清液。实验分为3组：CON组、co-M0组及co-M1组。CON组即为单独培养的KGN细胞，co-M0组及co-M1组即为KGN细胞中加入相应巨噬细胞的上清液共培养24 h(原上清液：巨噬细胞上清液=1∶2)。

1.10　CCK-8法检测细胞增殖

取生长状态良好的KGN细胞计数后铺96孔板(每孔100 μL)，按1.9步骤使巨噬细胞与KGN共培养24 h后，于每孔中加入CCK-8试剂(10 μL)，混匀后37 ℃孵育1 h。使用酶标仪测450 nm处的OD值。

1.11　统计学方法

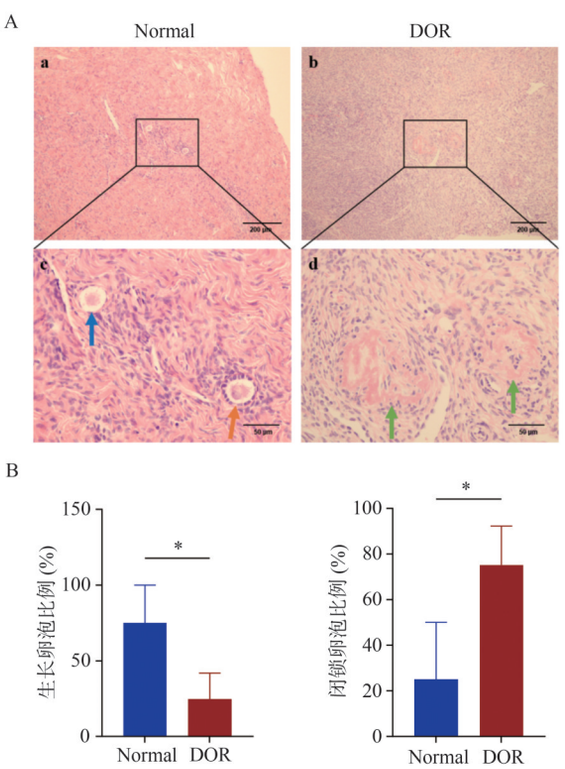
采用Graphpad Prism 10软件进行统计学分析并生成相关统计图。两组组间比较采用独立样本*t*

检验，三组组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织中各级卵泡分布情况

两组卵巢组织经HE染色后，均未见次级卵泡、窦状卵泡及成熟卵泡。结果显示，与正常组相比，DOR组卵巢中闭锁卵泡明显较多，原始卵泡及初级卵泡数量明显较少（$P<0.05$，图1）。



A：HE染色代表图（蓝色箭头为原始卵泡，橙色箭头为初级卵泡，绿色箭头为闭锁卵泡，a-b：100×，c-d：400×）；B：生长卵泡比例及闭锁卵泡比例。与正常组相比，*表示$P<0.05$。

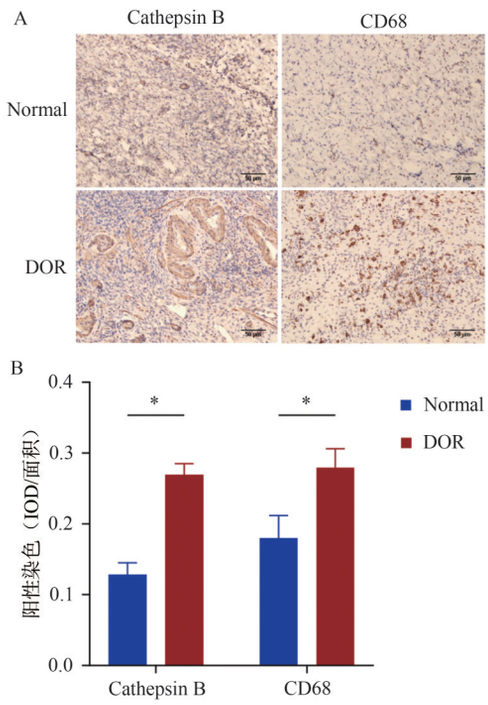
图1 两组卵巢组织的结构差异（HE染色）

2.2 卵巢组织中Cathepsin B的表达及巨噬细胞极化情况

免疫组化染色结果显示，与正常组相比，Cathepsin B及CD68在DOR组中表达量较高（$P<0.05$，图2）。qRT-PCR结果显示，DOR组中*Cathepsin B*、*TNF-α*及*iNOS*在DOR组中表达量显著较高（$P<0.05$，图3）

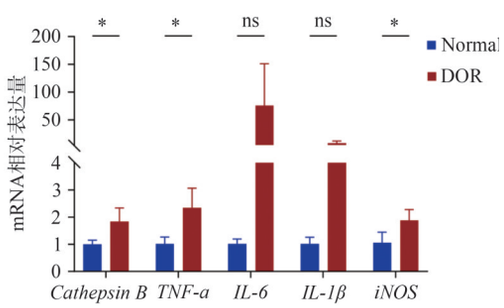
2.3 M1型巨噬细胞模型的构建及验证

与M0组相比，M1组中*TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β*及*iNOS*的mRNA均显著高表达（$P<0.05$，图4）。



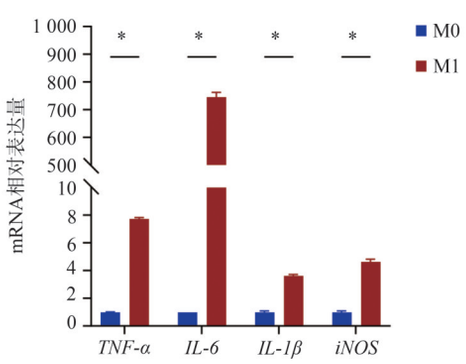
A：免疫组化染色代表图（400×）；B：免疫组化染色统计图。与正常组相比，*表示$P<0.05$。

图2 两组卵巢组织中Cathepsin B及巨噬细胞标志物的表达（免疫组化染色）



与正常组相比，ns表示差异无统计学意义，*表示$P<0.05$。

图3 两组卵巢中*Cathepsin B*及M1型巨噬细胞极化因子的表达情况（qRT-PCR）

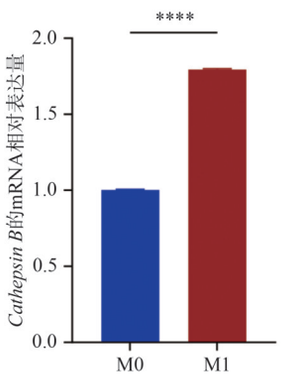


与M0组相比，*表示$P<0.05$。

图4 LPS诱导后M1型极化因子的表达

2.4　Cathepsin B 在 M1 型巨噬细胞中的表达情况

与 M0 组相比，M1 组中 *Cathepsin B* 的表达显著升高（$P<0.000\ 1$，图 5）。



与 M0 组相比，****表示 $P<0.000\ 1$。

图 5　M1 型巨噬细胞中 *Cathepsin B* 的表达情况

2.5　Cathepsin B 对 M1 型巨噬细胞极化的影响

Cathepsin B 表达抑制组的 *Cathepsin B* 表达水平较阴性对照组显著降低（$P<0.001$），敲低效率达到 94.41%（图 6A）；且 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β*、*iNOS* 及 *IκBα*、*NF-κB* 的表达均显著下调（$P<0.05$，图 6B）。

2.6　巨噬细胞 M1 型极化促进人卵巢颗粒细胞凋亡

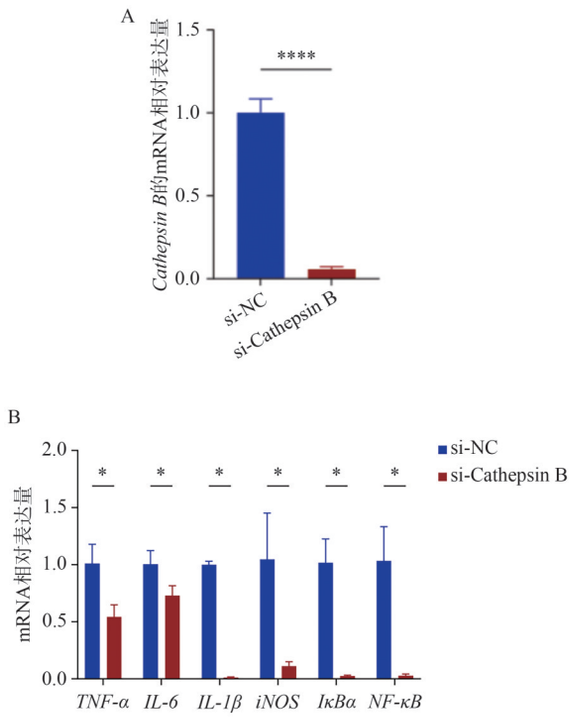
与 CON 组相比，co-M0 组中 KGN 细胞凋亡因子表达无显著差异（$P>0.05$）。co-M1 组 KGN 细胞中促凋亡因子 *Bax*、*Caspase 3* 及 *p53* 的表达量均显著高于 CON 组及 co-M0 组（$P<0.05$，图 7）。

2.7　巨噬细胞 M1 型极化抑制人卵巢颗粒细胞增殖

CCK-8 结果显示，CON 组与 co-M0 组间 KGN 的增殖能力无显著差异（$P>0.05$），而 co-M1 组中 KGN 的增殖能力要显著低于 CON 组（$P<0.05$）及 co-M0 组（$P<0.05$，图 8）。

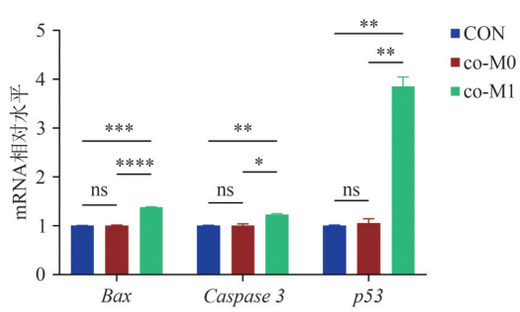
3　讨论

DOR 对育龄期女性造成严重生殖健康损害及心理社会负担[10]，对其行早期诊断及治疗具有重要的意义。DOR 没有单一的诊断指标。2022 年我国专家共识提出[11]：推荐使用 AMH、窦卵泡计数（antral follicle count，AFC）、基础 FSH 并结合年龄因素，对卵巢储备功能进行综合评估。AMH 由窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞分泌，不受月经周期影响，可更好地评估生长卵泡池的大小，AMH 比 FSH 更敏感[12]。本研究以 AMH 水平分组后发现，DOR 组卵巢组织中生长卵泡比例显著低于正常组，其闭锁卵泡比例显著高于正常组。



A：M1 型巨噬细胞转染 Cathepsin B 基因 siRNA 后的效率检测；B：M1 型巨噬细胞转染阴性对照及 Cathepsin B 基因 siRNA 后 M1 极化因子和 NF-κB 通路因子表达水平。与阴性对照组相比，*表示 $P<0.05$，****表示 $P<0.000\ 1$。

图 6　敲低 Cathepsin B 可抑制 M1 极化及 NF-κB 通路因子表达

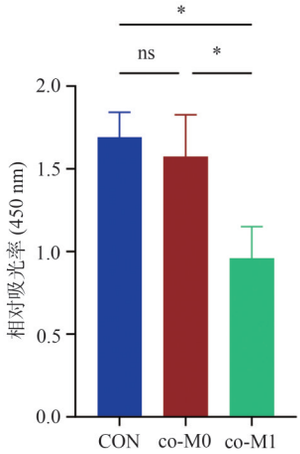


三组间两两相比，ns 表示差异无统计学意义，*表示 $P<0.05$，**表示 $P<0.01$，***表示 $P<0.001$，****表示 $P<0.000\ 1$。

图 7　共培养后 KGN 细胞凋亡因子表达情况

Cathepsin B 作为一种典型的溶酶体半胱氨酸蛋白酶，可促进炎症反应、氧化应激、细胞凋亡与自噬[3]。研究[13-14]表明，Cathepsin B 的过表达与多种疾病的发生和发展有关，例如心血管疾病（动脉粥样硬化、心肌梗死等）及阿尔茨海默病。有研究[15]指出，卵母细胞的体外衰老诱导激活 Cathepsin B，而抑制 Cathepsin B 活性可维持线粒体的功能，并缓解卵母细胞衰老过程中的氧化应激。DOR 患者的

卵泡液中炎症因子如TNF-α、IL-6和IL-12的浓度均较高，可抑制卵泡生成和排卵，并影响卵母细胞成熟和胚胎发育。越来越多的证据[16-18]表明，巨噬细胞极化失衡激活活性氧（reactive oxygen species，ROS）和促炎细胞因子的大量产生。本实验观察到DOR患者的卵巢组织中Cathepsin B的表达量较正常组多，促炎型M1巨噬细胞浸润明显，DOR卵巢中存在异常炎症反应。



三组间两两相比，ns表示差异无统计学意义，*表示$P<0.05$。

图8　共培养后KGN细胞的增殖情况

有相关研究[19]发现，*Cathepsin B*基因的缺乏可抑制小胶质细胞/巨噬细胞向M1型极化，本实验结果与该研究一致，发现巨噬细胞极化为M1型后，*Cathepsin B*表达上调，通过敲低*Cathepsin B*基因的表达，炎症因子和NF-κB通路因子的表达水平被有效抑制，M1型极化得到显著改善。为模拟体内细胞间的相互作用，本实验使用条件培养基对巨噬细胞和人卵巢颗粒细胞KGN建立间接共培养模型。使用M1上清液处理后的KGN细胞中促凋亡因子Bax、Caspase 3及p53表达量显著升高，颗粒细胞的增殖能力显著降低。本研究结果提示，Cathepsin B通过介导巨噬细胞M1极化以诱导卵巢颗粒细胞凋亡。NF-κB信号通路可能参与这一过程，其具体机制有待后续深入研究。

参考文献：

[1]XU X F，HAO Y X，ZHONG Q H，et al. Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve [J]. Fertility and Sterility，2020，114(6)：1250-1255.

[2]LV Z X，LV Z K，SONG L J，et al. Role of lncRNAs in the pathogenic mechanism of human decreased ovarian reserve [J]. Frontiers in Genetics，2023，14：1056061.

[3]XIE Z，ZHAO M Y，YAN C X，et al. Cathepsin B in programmed cell death machinery：Mechanisms of execution and regulatory pathways [J]. Cell Death & Disease，2023，14(4)：255.

[4]LI H，ZHAO Q W，LIU D N，et al. Cathepsin B aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice by modulating vascular smooth muscle cell pyroptosis through NF-κB/NLRP3 signaling pathway [J]. PLoS One，2024，19(1)：e0294514.

[5]CHEN C，AHMAD M J，YE T Z，et al. Cathepsin B regulates mice granulosa cells′ apoptosis and proliferation *in vitro* [J]. International Journal of Molecular Sciences，2021，22(21)：11827.

[6]CHEN Y N，HU M R，WANG L，et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. European Journal of Pharmacology，2020，877：173090.

[7]YANG Y X，TANG X T，YAO T，et al. Metformin protects ovarian granulosa cells in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through AMPK/PPAR-γ/SIRT1 pathway [J]. Scientific Reports，2024，14：1447.

[8]袁琴. 环状RNA 0007919在LPS诱导的THP-1巨噬细胞中的作用及机制研究[D]. 上海：上海大学，2022.

[9]雪若妍. 人脂肪间充质干细胞来源外泌体促进巨噬细胞极化治疗面神经损伤的机制研究[D]. 北京：北京协和医学院，2023.

[10]许英，王晔，陈颖. 重组人生长激素对卵巢储备功能减退患者早发LH峰及临床妊娠结局的影响[J]. 中国妇产科临床杂志，2024，25(6)：483-486.

[11]卵巢储备功能减退临床诊治专家共识专家组，中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识[J]. 生殖医学杂志，2022，31(4)：425-434.

[12]TIEGS A W，SUN L，SCOTT R T，et al. Comparison of pregnancy outcomes following intrauterine insemination in young women with decreased versus normal ovarian reserve [J]. Fertility and Sterility，2020，113(4)：788-796. e4.

[13]CAI Z L，XU S Y，LIU C. Cathepsin B in cardiovascular disease：Underlying mechanisms and therapeutic strategies [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine，2024，28(17)：e70064.

[14]SINGH S K，SHARMA A，SWETHA R，et al. Cathepsin B-a neuronal death mediator in Alzheimer′s disease leading to neurodegeneration [J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry，2022，22(15)：2012-2023.

[15]LIANG S，JIANG H，SHEN X H，et al. Inhibition of cathepsin B activity prevents deterioration in the quality of *in vitro* aged porcine oocytes [J]. Theriogenology，2018，116：103-111.

（下转第44页）