

PGC-1 α 在多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢组织的表达变化*

郭琴, 高瑞萍, 陶莹 Δ

广东药科大学附属第一医院 妇产科(广州 510080)

【摘要】目的 探讨多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)大鼠模型及肥胖PCOS大鼠模型卵巢组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子1 α (PGC-1 α)的表达,以及PCOS发生的可能机制。**方法** SD大鼠30只,随机分为对照组、PCOS组及肥胖PCOS组,PCOS两组大鼠每日一次予脱氢表雄酮[DHEA, 60 mg/(kg·d)]溶于0.2 mL注射用大豆油中皮下注射,共21 d,制备PCOS模型,肥胖PCOS模型组大鼠在DHEA制模基础上加入高脂饮食,每组大鼠各10只。造模前(0 d)和造模后第22天称体质量,取腹主动脉血检测血清睾酮(testosterone, T)水平,取大鼠卵巢组织,HE染色观察组织形态学改变,免疫组织化学染色和Western blot检测PGC-1 α 蛋白表达。**结果** 造模前3组大鼠体质量差异无统计学意义,造模后第22天,大鼠增加的体质量以及大鼠血清T质量浓度,均为肥胖PCOS组>PCOS组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。大鼠卵巢组织HE染色结果显示,对照组大鼠卵巢组织镜下可见不同发育时期的卵泡和少量黄体,颗粒细胞排列多为4~6层;PCOS组及肥胖PCOS组大鼠卵巢组织中未成熟的小卵泡数量明显增加,颗粒细胞1~3层排列、较松散,部分卵泡闭锁,肥胖PCOS组大鼠卵巢闭锁卵泡直径增大,颗粒细胞层数减少,卵母细胞消失等现象更明显。免疫组化染色结果显示,对照组大鼠卵巢组织PGC-1 α 蛋白阳性表达主要分布于卵丘及颗粒细胞。从PGC-1 α 蛋白在卵巢组织的表达平均灰度均值来看,PCOS组(0.53 \pm 0.06)和肥胖PCOS组(0.36 \pm 0.03)均低于对照组(0.75 \pm 0.03),差异有统计学意义($P<0.05$),肥胖PCOS组PGC-1 α 表达低于PCOS组($P<0.01$)。Western blot检测结果与免疫组化染色结果一致。**结论** PGC-1 α 表达降低与高脂环境下卵巢颗粒细胞损伤有关。PGC-1 α 在卵巢卵泡的颗粒细胞中表达降低可能是PCOS发生发展的重要原因。

【关键词】 PGC-1 α 肥胖PCOS大鼠模型 颗粒细胞 高脂饮食

Expression of PGC-1 α in Ovarian Tissue of PCOS Rat Model GUO Qin, GAO Rui-ping, TAO Ying Δ . Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

Δ Corresponding author, E-mail: 1140832540@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α) in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome (PCOS) rat model and obese PCOS rat model, and the possible mechanism of PCOS. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, PCOS rat model group and obese PCOS rat model group. DHEA dissolved in 0.2 mL soybean oil was injected daily into the rats of two PCOS groups for 21 d. Rats in obese PCOS model group were added with high-fat diet based on DHEA modeling, and each group had 10 rats. Body mass were measured before and on the 22nd day after modeling. The serum testosterone (T) levels were measured by abdominal aortic blood, and the ovarian tissues of rats were taken for histological changes were observed by HE staining, immunohistochemical staining and Western blot to detect PGC-1 α protein expression. **Results** The body mass of rats in each group increased after modeling, and the body mass of rats in PCOS group and obese PCOS group increased significantly ($P<0.05$). The serum T concentration of two PCOS model groups was higher than that of control group ($P<0.01$). The serum T concentration in obese PCOS model group was higher than that in the PCOS group ($P<0.05$). The results of HE staining of rat ovarian tissue showed that there were follicles and a small amount of corpus luteum at different developmental stages in the control group, and the granulosa cells were arranged in 4-6 layers. The number of immature small follicles in the two PCOS groups was significantly increased. The granulosa cells were arranged in 1-3 layers, relatively looser, and some follicles were atresia. In the obese PCOS group, the diameter of ovarian atretic follicles increased, the number of granulocyte layers decreased, and oocytes disappeared more obviously. Immunohistochemical staining showed that the PGC-1 α protein was mainly expressed in the cumulus and granulosa cells of ovarian tissue in the control group. The mean gray level of PGC-1 α protein expression in PCOS group (0.53 \pm 0.06) and obese PCOS group (0.36 \pm 0.03) was lower than that of the control group (0.75 \pm 0.03), with the statistical

* 广东省医学科学技术研究基金项目(No. A2019364)资助

Δ 通信作者, E-mail: 1140832540@qq.com

difference ($P < 0.05$). PGC-1 α expression in the obese PCOS group was lower than that in the PCOS group ($P < 0.01$). The results of Western blot were consistent with those of immunohistochemical staining. **Conclusion** PGC-1 α is associated with damage of ovarian granulosa cells in high-fat environment. The decrease of PGC-1 α expression in granulosa cells of ovarian follicles may be an important cause of PCOS development.

【Key words】 PGC-1 α Obesity PCOS rat model Granulosa cells High fat-diet

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)为育龄妇女常见的内分泌代谢紊乱和生殖功能障碍性疾病,在育龄期女性发病率为6%~15%,近年来有逐步上升的趋势^[1]。PCOS主要表现为排卵障碍、月经失调、肥胖伴高雄激素血症、胰岛素抵抗^[2],其机制尚不明确,而排卵障碍被认为是导致PCOS患者不孕的重要原因之一。研究表明^[3-4],各种原因导致的卵巢颗粒细胞过度损伤会引起卵泡生长异常、卵泡闭锁等,进而导致不排卵。PCOS不排卵和临床内分泌改变的病理基础可能是内在性、原发性的卵泡生长发育异常,其内在性的卵泡发育异常与卵巢颗粒细胞凋亡的调控失常有关^[4]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子1 α (PGC-1 α)作为一种核转录辅激活因子,是调节线粒体生物合成、脂肪酸氧化的关键因子。PGC-1 α 主要在能量需求较高的器官或组织中表达,为线粒体发生最关键的调控子^[5]。现越来越多的研究提示PGC-1 α 可能会成为改善线粒体功能的重要靶点。有学者发现^[6],对有肥胖倾向的大鼠予短暂高脂饮食,肝脏中线粒体呼吸链的活性降低,而PGC-1 α 过表达可致降低的呼吸链活性增加,提示PGC-1 α 在减少线粒体障碍等方面有重要意义。本研究选择PCOS模型大鼠,并予高脂饮食,观察PGC-1 α 在卵巢组织的表达情况。查阅相关文献,研究PCOS的动物模型中,以脱氢表雄酮(DHEA)为造模药物诱导SD大鼠的PCOS模型较成功^[7],而目前对探讨PGC-1 α 在PCOS卵巢组织表达中的作用机制方面国内外研究甚少,因此,本研究采用DHEA制备PCOS模型,对PGC-1 α 在PCOS动物模型和肥胖PCOS动物模型卵巢组织的蛋白表达进行研究,旨在探讨PGC-1 α 在PCOS卵泡发育异常机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

选取23日龄SD雌性大鼠30只,体质量191~238 g,由广东省医学实验动物中心生产提供:批号SCXK(粤)2013-0002。大鼠于SPF级屏障系统下饲养,昼夜12 h,温度22 $^{\circ}\text{C}$,湿度55%,自由饮水、进食,并遵循广东药科大学附属第一医院动物实验管理委员会的相关规定进行实验动物操作。DHEA购自美国IL公司,大豆油购自Aladdin上海阿拉丁生化科技股份有限公司,高脂饲料由

广东省医学实验动物中心引入,配方成分:87.6%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.4%胆酸钠。PGC-1 α 免疫组织化学试剂盒(一抗PPARGC1A;二抗生物素标记羊抗兔IgG)、DAB显色液均购自上海雅吉生物科技有限公司(生产批号:202003)。

1.2 建立PCOS模型

大鼠适应性喂养3 d。随机分为对照组、PCOS组及肥胖PCOS组,每组10只。DHEA[60 mg/(kg·d)]溶于0.2 mL注射用大豆油中,PCOS两组大鼠每日皮下注射DHEA大豆油液0.2 mL共21 d,建立DHEA诱导的PCOS大鼠模型^[8],肥胖PCOS组大鼠在PCOS组的基础上同时喂高脂饲料,对照组大鼠同期皮下注射等量的生理盐水。

1.3 实验前后体质量变化及血清睾酮(testosterone, T)激素水平的测定

各组大鼠在造模前和造模后第22天前晚禁食水12 h后晨称体质量,观察各组大鼠体质量变化情况。然后用10%水合氯醛麻醉大鼠,取腹主动脉血,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,并取血清部分,分别装于EP管,-80 $^{\circ}\text{C}$ 进行冻存。采用放射免疫分析法测定血清T水平。

1.4 卵巢组织病理学检查

取大鼠双侧卵巢,生理盐水冲洗后放置于体积分数为4%多聚甲醛溶液中。常规脱水并石蜡包埋。每个蜡块取4 μm 厚度连续切片,常规进行HE染色,显微镜下观察组织病理学变化。

1.5 免疫组织化学染色和Western blot检测PGC-1 α 蛋白表达

免疫组织化学染色:将制作好的大鼠卵巢切片脱蜡透明水化,蒸馏水冲洗,PBS浸泡进行抗原修复;3%双氧水(H_2O_2)去离子水孵育阻断其内源性过氧化物酶的活性。滴加一抗(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2~3 h,PBS冲洗,滴加二抗封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,PBS冲洗。滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min。PBS冲洗,3 min \times DAB显色,苏木素复染,PGC-1 α 以细胞核黄色或棕黄色颗粒为阳性。每张片随机测定5个区域,在高倍镜下($\times 100$)使用Imaga-Pro Plus彩色图像分析系统对棕黄色阳性细胞的平均灰度进行测定,以平均灰度值表示该卵巢组织的PGC-1 α 蛋白表达水平。

Western blot 检测:取大鼠卵巢组织,用组织裂解液

分离出总蛋白。用蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度后, 每组样本取50 μ g蛋白行SDS-PAGE电泳。然后将分离的蛋白转移至PVDF膜上。5%BSA封闭PVDF膜后, 室温孵育一抗(1:1 000稀释比例的PGC-1 α 和1:5 000稀释比例的 β -actin)2 h。洗膜后, 室温孵育1:1 000稀释比例的辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠IgG(H+L)二抗1 h。再次洗膜后, 用ECL发光液使得条带形象化并曝光于胶片。用Image-Pro Plus软件分析条带灰度值。以PGC-1 α 条带与 β -actin灰度值的比值为PGC-1 α 蛋白的相对含量, 并以对照组PGC-1 α 蛋白的相对含量为1, 计算其他各组PGC-1 α 蛋白的相对含量。

1.6 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及造模后体质量变化

各组大鼠造模前体质量差异无统计学意义。造模后, 各组大鼠其精神、大小便等一般情况正常, 体质量均有增加, PCOS组和肥胖PCOS组大鼠体质量增加幅度更大, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表1。

表1 三组大鼠造模前后体质量的变化比较

Table 1 Comparison of changes of pre- and post-modeling mass in three groups of rats

Group	n	Body mass pre-modeling/g	Body mass post-modeling/g	Increased body mass/g
Control	10	198.2 \pm 6.0	250.8 \pm 9.3	52.7 \pm 8.6
PCOS	10	202.5 \pm 15.2	282.6 \pm 12.8	80.3 \pm 2.1*
Obese PCOS	10	201.1 \pm 7.5	285.0 \pm 10.0	84.1 \pm 6.9* [#]

* $P < 0.01$, vs. control group; [#] $P < 0.05$, vs. PCOS group.

2.2 各组大鼠血清T质量浓度检测

肥胖PCOS组和PCOS组大鼠血清T质量浓度[分别为(5.69 \pm 0.41) ng/mL和(5.22 \pm 0.46) ng/mL]均高于对照组[(1.60 \pm 0.47) ng/mL], 差异有统计学意义($P < 0.01$)。肥胖PCOS组大鼠血清T质量浓度高于PCOS组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢组织HE染色

由图1可见, 对照组大鼠卵巢组织镜下可见不同发育时期的卵泡和少量黄体, 颗粒细胞排列多为4~6层, 整齐。在PCOS组及肥胖PCOS组大鼠卵巢组织中, 卵泡内可观察到卵母细胞, 不同阶段的卵泡和黄体在皮层中很少见, 并可见显著囊状扩张卵泡。此外, 未成熟的小卵泡数量明显增加, 颗粒细胞排列较松散, 数量减少(只有1~3)层, 部分卵泡闭锁。肥胖PCOS组大鼠卵巢闭锁卵泡直径

增大, 颗粒细胞层数减少, 卵母细胞消失等现象更明显。

2.4 各组大鼠卵巢组织 PGC-1 α 蛋白的表达

免疫组化染色结果(图2)显示, 对照组大鼠卵巢组织PGC-1 α 蛋白阳性表达主要分布于卵丘及颗粒细胞, 卵泡膜细胞表达少, PGC-1 α 蛋白表达平均灰度值对照组为0.75 \pm 0.03, PCOS组为0.53 \pm 0.06, 而肥胖PCOS组为0.36 \pm 0.03, 肥胖PCOS组和PCOS组PGC-1 α 在卵巢组织中的表达低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。肥胖PCOS组PGC-1 α 在卵巢组织上的表达低于PCOS组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。两组PCOS大鼠卵巢组织中PGC-1 α 主要在颗粒细胞的表达减弱, 而卵泡膜细胞的表达无明显改变, 尤其在高脂饮食后的肥胖PCOS组大鼠表现更明显。Western blot结果(图3)结果与免疫组化结果一致。

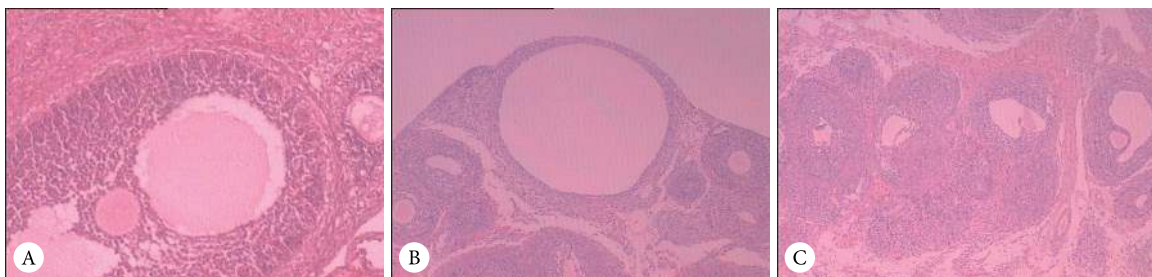


图1 各组大鼠卵巢组织HE染色。 $\times 100$

Fig 1 HE staining of ovarian tissues in each group. $\times 100$

A: Control group; B: PCOS group; C: Obese PCOS group.

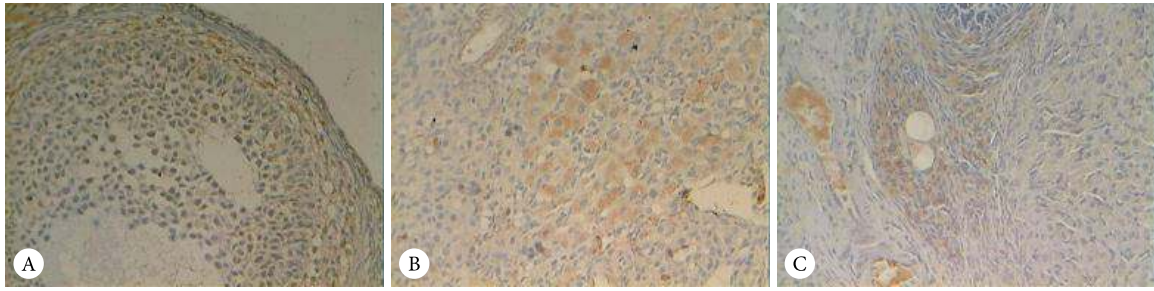


图 2 各组大鼠卵巢组织PGC-1 α 的表达。免疫组化染色 $\times 100$

Fig 2 Expression of PGC-1 α in ovarian tissues of rats. IHC $\times 100$

A: Control group; B: PCOS group; C: Obese PCOS group.

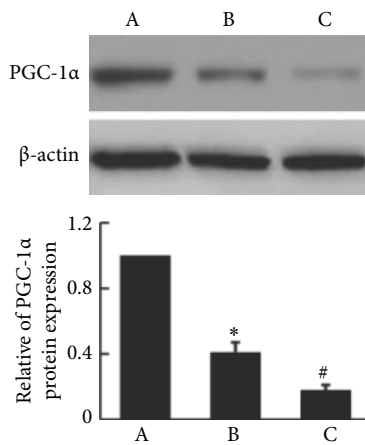


图 3 Western Blot检测各组大鼠卵巢组织PGC-1 α 的表达 ($n=10$)

Fig 3 Expression of PGC-1 α in ovarian tissues of rats detected by Western blot ($n=10$)

A: Control group; B: PCOS group; C: Obese PCOS group. * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. PCOS and control group.

3 讨论

颗粒细胞是卵泡的主要功能细胞之一,经缝隙连接围绕在卵母细胞周围。本研究中,PCOS大鼠模型中可见多个囊性扩张的卵泡,提示PCOS患者卵巢中其卵泡的发育存在障碍。在高雄化环境中,卵泡发育受阻,导致卵泡的闭锁。而卵泡的闭锁起始于颗粒细胞的凋亡或卵母细胞的凋亡^[9],PCOS的发病中卵巢颗粒细胞起重要作用。研究发现^[10],在肥胖大鼠或经高脂喂养动物其三酰甘油(triacylglycerol, TRIG)水平升高的同时伴有PGC-1 α 蛋白水平的下降,而低水平TRIG基因突变小鼠PGC-1 α 蛋白水平表达升高。本课题组前期研究发现^[8],DHEA造模可出现体质量增加,睾酮升高,卵巢多囊样改变;并证明^[11]高脂饮食喂养可加剧大鼠肥胖、胰岛素抵抗等症状。故本研究在其造模基础上,加用高脂饮食,结果显示造模后PCOS组和肥胖PCOS组大鼠体质量增加幅度更大($P < 0.05$),血清T质量浓度增高,提示PCOS动物模型建立成功。

PGC-1 α 即PPAR γ 的辅助激活因子,已被证明在糖尿病、肥胖病症等代谢疾病中发挥重要作用,它主要在细胞、组织受到氧化应激及线粒体增殖时表达^[12]。PGC-1 α 在影响人体内激素水平的同时间接影响细胞内的能量代谢。PGC-1 α 不仅是代谢调节因子,也是卵巢颗粒细胞向黄体细胞分化的重要影响因子^[13]。PCOS与PGC-1 α 的表达紊乱有关,后者的缺失会导致机体不孕^[14]。本实验同样发现在对照组大鼠卵巢组织中PGC-1 α 主要表达于卵丘及颗粒细胞,卵泡膜细胞表达少,经予DHEA及加高脂饮食后,PCOS模型大鼠中卵巢颗粒细胞受损,PGC-1 α 在卵巢卵泡颗粒细胞中的表达水平下降,而在肥胖PCOS组大鼠卵巢卵泡颗粒细胞中PGC-1 α 明显低表达。故PGC-1 α 表达水平的降低提示卵巢颗粒细胞的活性减弱,即颗粒细胞在合成雌孕激素方面的功能减退。本研究同时发现在高脂环境下,卵巢颗粒细胞已出现明显的过氧化应激变化:闭锁卵泡直径增大,颗粒细胞层数减少,卵母细胞消失等现象,与国内外研究一致^[8]。PGC-1 α 蛋白表达的下降和颗粒细胞形态学的异常一致。其完整展现了高脂饮食过后脂质过氧化应激对卵巢颗粒细胞的严重损伤,也提示了高脂饮食导致的肥胖可能是致PCOS发生发展的重要环节。故推测PGC-1 α 表达水平下降可能会影响卵母细胞的质量,从而形成大量的囊状卵泡、闭锁卵泡及未排卵的成熟卵泡,以致肥胖PCOS形成。ESPINOZA等^[15]研究表明PGC-1 α 可同时调节脂肪酸氧化及合成。因此我们推测,PGC-1 α 表达降低与高脂环境下卵巢颗粒细胞损伤有关,PGC-1 α 可能参与了卵巢颗粒细胞凋亡的调控,PGC-1 α 可能是PCOS内皮细胞损伤及凋亡的重要生理病理因素。但具体机制还有待进一步研究。

综上所述,PGC-1 α 在PCOS大鼠模型组中的卵巢卵泡颗粒细胞上表达降低可能是导致PCOS发生发展的重要原因。虽然本研究有一定局限性,样本量较少,但PGC-1 α 的表达对卵巢组织的潜在影响应引起研究者的

重视,在下一步的研究中,将进一步探讨PCOS的发病机制,PGC-1 α 是否通过改善卵巢颗粒细胞线粒体的功能,抑制卵巢颗粒细胞凋亡,从而对卵巢起保护作用;并探索调节PGC-1 α 的表达是否可能成为治疗PCOS疾病的新靶点。

参 考 文 献

- [1] PRATHAP A, SUBHALAKSHMI T P, VARGHESE P J. A cross-sectional study on the proportion of anxiety and depression and determinants of quality of life in polycystic ovarian disease. *Indian J Psychol Med*, 2018, 40(3): 257–262.
- [2] Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2004, 81(1): 19–25.
- [3] BILAL M, HASEEB A, REHMAN A. Relationship of polycystic ovarian syndrome with cardiovascular risk factors. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(3): 375–380.
- [4] CALDWELL A S, MIDDLETON L J, JIMENEZ M, *et al.* Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*, 2014, 155(8): 3146–3159.
- [5] SANTOSO S, WIHADMADYATAMI H, BAKCHOUL T, *et al.* Role of PGC-1 α in vascular regulation: implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(8): 1467–1473.
- [6] ST-PIERRE J, DRORI S, UIDRY M, *et al.* Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 2016, 127(2): 397–408.
- [7] 张晓薇, 邝健全, 曾爱群, 等. 脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征动物模型的研究. *广州医学院学报*, 2000, 28(3): 14–17.
- [8] ZHANG X, ZHANG C, SHEN S, *et al.* Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod*, 2013, 28(11): 3074–3085.
- [9] ZHENG Q, LI Y, ZHANG D, *et al.* ANP promotes proliferation and inhibits apoptosis of ovarian granulosa cells by NPRA/PGRMC1/EGFR complex and improves ovary functions of PCOS rats. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3145[2019-10-26].<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.494>.
- [10] FOGL C, PUCKEY L, HINSENSEN U, *et al.* A structural and functional dissection of the cardiac stress response factor MS1. *Proteins*, 2012, 80(2): 398–409.
- [11] WU S, DIVALL S, NWAOPARA A, *et al.* Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes*, 2014, 63(4): 1270–1282.
- [12] HAEMMERLE G, MOUSTAFA T, WOELKART G, *et al.* ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1 α . *Nat Med*, 2011, 17(9): 1076–1085.
- [13] YAZAWA T, INAOKA Y, OKADA R, *et al.* PPAR-gamma coactivator-1 α regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(3): 485–496.
- [14] LIN J, WU P H, TARR P T, *et al.* Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell*, 2004, 119(1): 121–135.
- [15] ESPINOZA D O, BOROS L G, CRUNKHORN S, *et al.* Dual modulation of both lipid oxidation and synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α and -1 β in cultured myotubes. *FASEB J*, 2010, 24(4): 1003–1014.

(2019-10-08收稿, 2020-03-12修回)

编辑 沈进