

基础研究 DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000289

Ghrelin 基因在多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞中的表达

王炼炼¹, 李 聪², 杨 曦¹, 孟江萍¹, 幸贵邦¹

(重庆医科大学附属第一医院 1. 生殖健康与不孕专科; 2. 妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 Ghrelin 基因在卵巢颗粒细胞中的表达及其与多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)的关系。**方法:**选择 47 例在重庆医科大学辅助生育中心接受体外受精-胚胎移植治疗的不孕妇女, 其中 PCOS 组 11 例, 对照(Non-PCOS)组 36 例, 采用 real-time PCR 及免疫印迹法分别测定 2 组妇女卵巢颗粒细胞中 Ghrelin mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:**PCOS 妇女颗粒细胞中 Ghrelin mRNA 和蛋白的表达均低于 Non-PCOS 妇女(0.926 ± 0.206 vs. 1.137 ± 0.105 , $t=2.73$, $P=0.015$; 0.647 ± 0.052 vs. 0.937 ± 0.038 , $t=7.82$, $P=0.001$)。**结论:**PCOS 妇女卵巢颗粒细胞的 Ghrelin mRNA 和蛋白表达水平明显低于 Non-PCOS 妇女, 可能与卵泡发育障碍相关。

【关键词】Ghrelin 基因; 卵巢颗粒细胞; 多囊卵巢综合征**【中图分类号】**R711.75**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-06

Expression of Ghrelin gene in ovarian granulosa cells of patients with polycystic ovarian syndrome

Wang Lianlian¹, Li Cong², Yang Xi¹, Meng Jiangping¹, Xing Guibang¹

(1. Department of Reproduction Health and Infertility; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the expression of Ghrelin gene in ovarian granulosa cells(GCs) of patients with polycystic ovarian syndrome(PCOS) and to discuss the relationship between them. **Methods:** GCs were obtained at the time of oocyte retrieval from a total of 47 women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET) treatment due to male factors or tubal factors. Eleven PCOS women were taken as PCOS group and 36 non-PCOS women as control group. The expression of Ghrelin mRNA was measured by real-time PCR and Western blot was used to detect the expression of Ghrelin protein in GCs. **Results:** The expression of Ghrelin mRNA in GCs was significantly lower in PCOS group than in control group($t=2.73$, $P=0.015$) and the expression of Ghrelin protein in GCs was also significantly lower in PCOS group than in control group($t=7.82$, $P=0.001$). **Conclusion:** The mRNA and protein expressions of Ghrelin in GCs are significantly lower in women with PCOS than in non-PCOS women, suggesting that Ghrelin may be involved in the disturbance of follicular development in PCOS.

【Key words】Ghrelin gene; ovarian granulosa cells; polycystic ovarian syndrome

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是临床上常见的妇科生殖内分泌疾病,以肥胖、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、排卵障碍、雄激素过多为主要临床特点^[1]。目前的研究认为, PCOS 发病机制之一是卵巢原发性功能障碍^[2]。近年研究表明,胃生长素(Ghrelin)基因在卵巢颗粒细胞

(granulosa cells, GCs)中有表达,与 GCs 的增殖有关^[3]。已有不少研究探讨 Ghrelin 基因在肥胖、Ⅱ型糖尿病和胃功能障碍中的作用,鲜见 Ghrelin 基因与 PCOS、卵巢功能调节关系的报道。本文拟从 PCOS 患者 GCs 中分析 Ghrelin 表达变化来揭示 Ghrelin 基因与 PCOS 的关系。

作者简介:王炼炼, Email: llian_w@sina.com,

研究方向: 妇科生殖内分泌、辅助生殖技术等。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号: 81100399); 重庆市科委资助项目(编号: CSTC2011jjA0111)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1111.015.html>
(2014-05-22)

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013 年 2 月至 2013 年 9 月期间, 因输卵管因素或者男性因素而行体外受精-胚胎移植或卵胞浆内单精子注射治疗

的 47 例不孕妇女, 年龄 25~35 岁, 其中 PCOS 组 11 例, 对照 (Non-PCOS) 组 36 例。PCOS 组纳入标准为 2011 年中国诊断标准^[4], 对照 (Non-PCOS) 组纳入标准为: 体质指数和月经正常、妇科超声及基础内分泌检查未见异常, 且除外其他内分泌疾病。2 组患者均无心、肝、肾疾病史, 无糖尿病家族史, 在年龄、不孕年限、体质指数方面无统计学差异 (表 1)。

表 1 患者一般情况对比

Tab.1 Comparison of basic information between the two groups

组别	平均年龄 (岁)	不孕年限 (年)	体质指数 (kg/m ²)
PCOS 组 (n=37)	28.140 ± 3.906	5.409 ± 2.567	23.970 ± 2.388
对照组 (n=11)	27.310 ± 5.013	4.527 ± 2.027	22.760 ± 1.794
t 值	0.501	1.191	1.822
P 值	0.619	0.240	0.075

1.2 试剂与仪器

淋巴细胞分离液 (天津灏洋), 红细胞裂解液 (天根生物), Western blot 试剂盒 (碧云天), Ghrelin 抗体 (博士德), 兔源性 β -actin 多克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (H+L) 二抗 (北京中山), PVDF 膜 (美国 Millipore), Ghrelin 引物、 β -actin 引物 (上海生工设计合成, 表 2), 离心柱型总 RNA 提取试剂盒 (北京北泰克), ReverTra Ace qPCR 试剂盒, SYBR real-time PCR 试剂盒 (TOYOBO)。电泳转移系统 (北京六一), Quantity One 凝胶成像系统、Option 型定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad)。

表 2 Ghrelin 和 β -actin 的引物序列Tab.2 Primers of Ghrelin and β -actin

基因	引物
Ghrelin	上游引物 5'-TTC AGT ACC AGC AGC ACA GC-3'
	下游引物 5'-CAT TTA TTC GCC TCC TGA GC-3'
β -actin	上游引物 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GGA AA-3'
	下游引物 5'-AAG GAA GGC TGG AAG ACT GC-3'

1.3 标本收集

2 组患者均采用 GnRH-a 长方案超促排卵, 在取卵日留取无血污染的成熟卵泡的卵泡液, 分离出 GCs。GCs 标本的分离及鉴定按相关文献所述进行^[5], 方法如下述: (1) 收集 2 组妇女拾卵后的卵泡抽吸液, 于室温下 2 000 r/min 离心 10 min。 (2) 弃上清液, 向细胞沉淀物中加入等量 PBS, 混成悬液, 再缓缓加入到等体积的淋巴细胞分离液上, 3 000 r/min 离心 20 min。 (3) 小心吸取 GCs 层 (上下液面间的淡黄红色云雾状细胞薄层), 转移到另一 EP 管, 加入 3~5 倍体积的 PBS, 洗涤后, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。 (4) 加入 3 倍体积的红细胞裂解液, 轻轻吹打、震荡混匀后, 37 ℃ 水浴 10 min, 溶解红细胞。 (5) 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。若所得沉淀中仍混有少许红色, 则将 (4)、(5) 再重复进行 1、2 次。 (6) 将得到的 GCs 用 PBS 洗净后, 取少量细胞, 在显微镜下观察细胞形态, 经确认是 GCs 后, EP 管分装, -70 ℃ 冰箱保

存待测。

1.4 实验方法

1.4.1 Real-time PCR 检测 GCs 中 Ghrelin mRNA 的表达

分别将每组中各份 GCs 混合, 提取总 RNA, 合成 cDNA (-20 ℃ 保存), PCR 扩增: 95 ℃ 预变性 1 min, PCR 循环 40 周期 (95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 15 s), 循环完成后, 72 ℃ 延伸 10 min。计算 Ghrelin mRNA 的相对表达量。

1.4.2 Western blot 检测 GCs 中 Ghrelin 蛋白的表达 分别将每组中各份 GCs 混合, 提取总蛋白, 测定蛋白浓度并变性, 电泳、转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭、孵育一抗及二抗, 化学发光法显影, 分析 Ghrelin 蛋白的相对表达量。

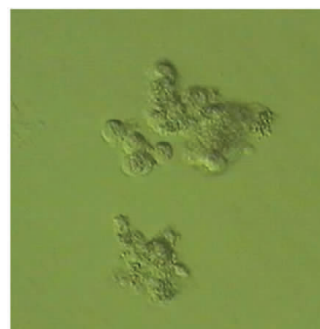
1.5 统计分析

每个实验重复 3 次, 采用 Graphpad prism 5 软件进行统计学分析及制图, 组间差异的比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

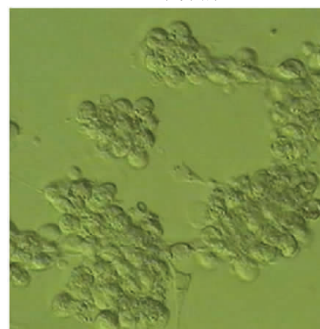
2 结 果

2.1 GCs 的鉴定

收集好 GCs 后, 倒置显微镜下观察: GCs 为圆形或椭圆形, 呈葡萄状分布 (图 1A); 培养 48 h 见 GCs 呈星形或椭圆形生长, 细胞浆内富含颗粒, 细胞间有丝状连接 (图 1B)。



A. 培养前



B. 培养 48 h 后

图 1 GCs 的鉴定 (200 ×)

Fig.1 Identification of ovarian GCs (200 ×)

2.2 GCs 中 Ghrelin mRNA 的表达

采用 real-time PCR 分析发现, GCs 中有 Ghrelin mRNA 的表达, 与 Non-PCOS 组相比, PCOS 组的 Ghrelin mRNA 表

达下调,差异有统计学意义(0.926 ± 0.206 vs. 1.137 ± 0.105 , $t=2.73$, $P=0.015$,图 2)。

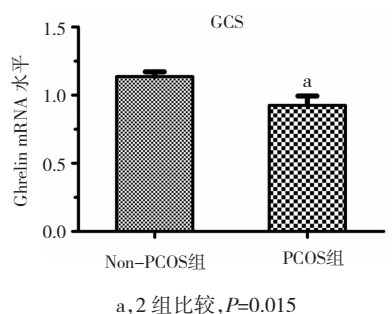
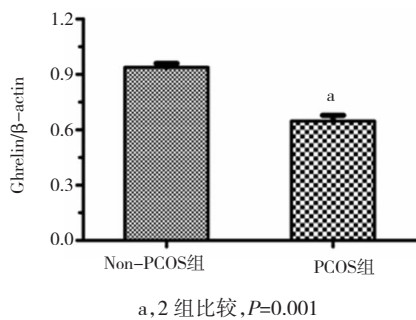
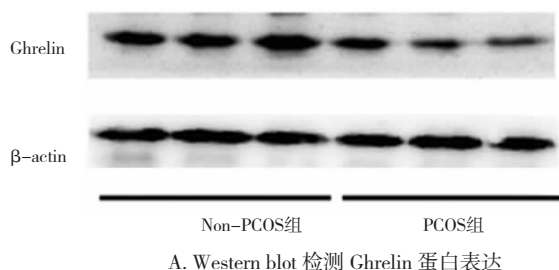


图 2 2 组患者 GCs 中 Ghrelin mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig.2 Comparison of expression of Ghrelin mRNA in GCs between the two groups ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

2.3 GCs 中 Ghrelin 蛋白的表达

为进一步在蛋白水平检测 Ghrelin 的表达,通过蛋白印迹法检测发现,PCOS 组的 Ghrelin 蛋白表达低于 Non-PCOS 组(图 3A),经灰度值分析显示差异有统计学意义(0.647 ± 0.052 vs. 0.937 ± 0.038 , $t=7.82$, $P=0.001$,图 3B)。



B. Ghrelin 蛋白表达转化为灰度值比较

图 3 GCs 中 Ghrelin 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.3 Expression of Ghrelin protein in GCs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

人 Ghrelin 基因位于染色体 3p25~26,有 5 个外显子,第 1 个外显子只有 20 个碱基,编码部分 5'非翻译区^[6]。Ghrelin 是生长激素促分泌素受体(growth

hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体,具有很多生理功能,如调节能量平衡、刺激胃酸分泌、促进胃肠蠕动,同时还与心脑血管、免疫、泌乳及生殖发育等功能有关^[7],它可通过促进食欲、增加摄食量以及影响物质和能量代谢的各个方面,导致体重增加、脂肪积累和肥胖^[8]。

Rormualdi 等^[9]的研究发现,Ghrelin 与 PCOS 关系密切。PCOS 患者血浆 Ghrelin 水平降低,Ghrelin 与 IR 有关^[10-11],而原因可能是胰岛素受体基因突变与 PCOS 发病直接相关,故推测至少卵巢的局部因素,如卵巢分泌过高的抑制素,使胰岛素受体后信号传导途径调控产生缺陷,或受体本身缺陷(如发生基因改变),促成了 PCOS 患者高胰岛素血症的发生^[12]。Western blot 结果显示:Ghrelin 在 GCs 中有表达,并且其在 PCOS 患者中的表达降低,猜测 Ghrelin 蛋白表达降低可能影响胰岛素受体的功能,从而表现为高胰岛素血症。

免疫组化显示,Ghrelin 主要表达于人卵巢间质细胞和成熟黄体,而在任一发育阶段的卵泡、新形成和退化的黄体中不表达;其功能性受体 GHS-R1a 在人卵巢组织广泛表达(如卵母细胞、卵泡膜细胞、各阶段黄体 and 卵巢门间质细胞)^[13]。值得注意的是,人黄体中 Ghrelin 表达模式与卵巢黄体的功能活性周期相一致,GHS-R1a 的表达与卵泡的发育相平行,说明卵巢局部产生的 Ghrelin 及其受体对卵泡发育及黄体功能可能存在调节作用。Ghrelin 及 GHS-R1a 在人卵巢的表达及其作用,提示 Ghrelin 可能与 PCOS 的病理生理有关。

卵巢功能的调控机制极其复杂,Ghrelin 是众多调控因子之一,还包括 ERK1/2 和 PI-3 激酶。Koromowska 等^[14]发现,PCOS 患者的细胞增殖指数 Ki67 高于健康人,Rak 和 Gregoraszczuk 等^[15]关于 Ghrelin 促进离体猪 GCs 增殖作用机制的研究提示,Ghrelin 可能通过激活 GCs 中 ERK1/2 和 PI-3 激酶通路调节 GCs 增殖和凋亡。在兔离体实验中,Ghrelin 与其特异性受体结合后,可剂量依赖性地明显抑制 GCs 分泌雌二醇和孕酮,经 Ghrelin 预处理的兔 GCs 分泌孕酮、雌二醇和前列腺素 F 的量较未经 Ghrelin 处理组减少^[16],有研究发现 Ghrelin 也能抑制人 GCs 分泌雌二醇和孕酮,其作用可被 Ghrelin 受体拮抗剂阻断^[17]。

本实验通过对 PCOS 妇女 GCs 中 Ghrelin 的检测发现,与对照组相比,PCOS 组 GCs 中 Ghrelin-mRNA 和蛋白表达均下调,这提示 Ghrelin 表达下调可能参与 PCOS 患者卵泡发育异常的发生,因为卵泡发育是受内分泌激素、卵巢内的调节因子和细胞-细胞之间的相互作用严格调控的联级事件,而在卵母细胞和卵泡之间存在卵母细胞-颗粒细胞调节环,GCs 提供营养和刺激卵母细胞的生长发育^[18],当 GCs 中 Ghrelin 表达下调将可能直接或间接影响到卵泡发育障碍,然而卵泡发育异常是 PCOS 的重要致病基础^[19]。因此,PCOS 患者的 GCs 中 Ghrelin 降低可能成为部分解释排卵障碍和不孕不育的原因。

PCOS 患者血浆 Ghrelin 水平降低,Ghrelin 与胰岛素抵抗负相关,与胰岛素敏感性正相关^[10-11],与雄烯二酮负相关,抗雄激素治疗后,Ghrelin 水平明显升高^[20];经二甲双胍治疗后,Ghrelin 水平明显升高^[11],本研究进一步在 GCs 水平发现 PCOS 患者的 Ghrelin 低于 Non-PCOS 患者,提示 Ghrelin 可能成为临床上间接、综合评估 PCOS 患者胰岛素抵抗、高雄激素血症及对症治疗效果的便捷指标,一定程度上还可能预测、评估 PCOS 患者促排卵前后的情况,这还需要更多深入研究。

总之,PCOS 妇女的 GCs 中 Ghrelin 的 mRNA 和蛋白表达低于 Non-PCOS 妇女,揭示出这种客观现象的变化不仅了解 PCOS 妇女 GCs Ghrelin 基因表达下调,重要的是,这暗示 Ghrelin 基因参与 PCOS 患者伴随的胰岛素抵抗、卵泡发育障碍以及卵巢功能变化的调节,为探索 PCOS 的致病因素提供新的认识。

参 考 文 献

- [1] 谢 幸,苟文丽.妇产科学[M].8 版.北京:人民卫生出版社,2013:359-362.
- [2] Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome[J]. N Engl J Med, 2005, 352(12): 1223-1236.
- [3] Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli, et al. Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression[J]. J Endocrinol Invest, 2006, 29(2): 115-121.
- [4] WS 330-2011 中华人民共和国卫生行业标准:多囊卵巢综合征诊断[S].
- [5] 全腊娟,丘 彦,孟江萍,等. ApoA-I 在卵巢颗粒细胞中的表达[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(5): 655-658.
- [6] Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function[J]. Physiol Rev, 2005, 85(2): 495-522.
- [7] 耿春银,杨连玉,严昌国,等. Ghrelin 基因衍生肽 Des-acyl ghrelin 和 Obestatin 主要功能及其分泌调节[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(6): 829-836.
- [8] Scerif M, Goldstone AP, Korbonits M. Ghrelin in obesity and endocrine diseases[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 340(1): 15-25.
- [9] Romualdi D, De Marinis L, Campagna G, et al. Alteration of ghrelin-neuropeptide Y network in obese patients with polycystic ovary syndrome: role of hyperinsulinism[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 69(4): 562-567.
- [10] Daghestani MH, Daghestani MH, El-Mazny A. Circulating ghrelin levels and the polycystic ovary syndrome: correlation with the clinical, hormonal and metabolic features[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011, 155(1): 65-68.
- [11] Shaker M, Mashhadani ZI, Mehdi AA. Effect of treatment with Metformin on Omentin-1, Ghrelin and other biochemical, clinical features in PCOS patients[J]. Oman Med J, 2010, 25(4): 289-293.
- [12] Tucci S, Funerweit W, Concepcion ES, et al. Evidence For association of Polycystic Ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus[J]. J Endocrinol Metab, 2001, 86(1): 446-449.
- [13] Gaytan F, Barreim ML, Chopin LK, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary[J]. Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(2): 879-887.
- [14] Komarowska H, Waśko R, Iwanik K, et al. Ghrelin ovarian cell expression in patients with polycystic ovary syndrome: an immunohistochemical evaluation[J]. Horm Metab Res, 2006, 38(12): 783-788.
- [15] Rak A, Gregoraszczuk EL. ERK 1/2 and PI-3 kinase pathways as a potential mechanism of ghrelin action on cell proliferation and apoptosis in the porcine ovarian follicular cells[J]. J Physiol Pharmacol, 2010, 61(4): 451-458.
- [16] Simtkin AV, Rafay J, Kotwica J, et al. Role of ghrelin in regulating rabbit ovarian function and the response to LH and IGF-I[J]. Domest Anim Endocrinol, 2009, 36(3): 162-172.
- [17] Viani I, Vottero A, Tassi F, et al. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(4): 1476-1481.
- [18] Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(4): 367-378.
- [19] Tosca L, Froment P, Solnais P, et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells[J]. Endocrinology, 2005, 146(10): 4500-4513.
- [20] Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, et al. Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome[J]. Endocrinol Invest, 2003, 26(7): 629-634.

(责任编辑:冉明会)