

泌尿生殖医学基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002193

Chemerin对卵巢颗粒细胞的影响及对PCOS发病机制的研究

蔡留芸, 胡建国, 龚阳阳, 甘晓玲, 罗小东

(重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探究 Chemerin 在多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)发病机制中的作用。**方法:**体外培养人卵巢颗粒细胞(COV434), 分别下调及过表达 COV434 细胞中的 Chemerin 基因, 采用 ELISA 测定培养液炎症因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)浓度, EdU 方法测定各组细胞增殖能力, 流式细胞法测定细胞凋亡。**结果:**下调组(LV3-shChemerin-1、LV3-shChemerin-2)与阴性对照组(LV3-NC)相比, 培养液中 IL-6、IL-8、TNF- α 浓度均明显降低, IL-10 浓度明显升高, 差异均有统计学意义($P_{IL-6}=0.006$, $P_{IL-8}=0.001$, $P_{TNF-\alpha}=0.012$, $P_{IL-10}=0.002$), 颗粒细胞 COV434 增殖能力明显降低($P=0.004$), 凋亡明显增加($P=0.000$)。过表达组(LV5-Chemerin)与阴性对照组(LV5-NC)相比, 培养液中 IL-6、IL-8、TNF- α 明显升高, IL-10 明显降低, 差异均有统计学意义($P_{IL-6}=0.044$, $P_{IL-8}=0.008$, $P_{TNF-\alpha}=0.015$, $P_{IL-10}=0.004$), 颗粒细胞 COV434 增殖能力明显提高($P=0.013$), 凋亡明显降低($P=0.029$)。**结论:**Chemerin 可能通过促进卵巢颗粒细胞炎症反应, 并诱导颗粒细胞增殖抑制凋亡参与 PCOS 的发生发展。

【关键词】人卵巢颗粒细胞 COV434; Chemerin; 白介素-6; 白介素-8; 白介素-10; 肿瘤坏死因子- α

【中图分类号】R711.75

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-10-07

Effect of Chemerin on ovarian granulosa cells and pathogenesis of polycystic ovary syndrome

Cai Liuyun, Hu Jianguo, Gong Yangyang, Gan Xiaolin, Luo Xiaodong

(Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of Chemerin in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods:** Human ovarian granulosa cells (COV434) were cultured *in vitro*. Down-regulation and overexpression of Chemerin were performed in the COV434 cells. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the concentrations of inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the culture medium. The EdU method and flow cytometry were used to measure cell proliferation ability and apoptosis, respectively. **Results:** Compared with the negative control group (LV3-NC), the down-regulation groups (LV3-shChemerin-1, LV3-shChemerin-2) had significantly lower concentrations of IL-6, IL-8, and TNF- α and a significantly higher concentration of IL-10 in the culture medium ($P_{IL-6}=0.006$, $P_{IL-8}=0.001$, $P_{TNF-\alpha}=0.012$, $P_{IL-10}=0.002$), significantly lower proliferative capacity of COV434 cells ($P=0.004$), and significantly enhanced apoptosis ($P=0.000$). Compared with the negative control group (LV5-NC), the overexpression group (LV5-Chemerin) had significantly higher concentrations of IL-6, IL-8, and TNF- α and a significantly lower concentration of IL-10 in the culture medium ($P_{IL-6}=0.044$, $P_{IL-8}=0.008$, $P_{TNF-\alpha}=0.015$, $P_{IL-10}=0.004$), significantly higher proliferative capacity of COV434 cells ($P=0.013$), and significantly reduced apoptosis ($P=0.030$). **Conclusion:** Chemerin plays a role in the development and progression of PCOS by promoting inflammatory response, inducing proliferation, and inhibiting apoptosis of ovarian granulosa cells.

【Key words】 COV434 cell; Chemerin; interleukin-6; interleukin-8; interleukin-10; tumor necrosis factor- α

作者介绍: 蔡留芸, Email: chongqingliuyun@163.com,

研究方向: 不孕及产前诊断。

通信作者: 罗小东, Email: luodongcq@163.com。

项目基金: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81501220, 81702557);

重庆市科委资助项目 (编号: cstc2015jcyjA10067); 重庆

市卫计委资助项目 (编号: 2017MSXM031)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190603.1533.004.html>

(2019-06-04)

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是育龄期女性常见的一种内分泌紊乱性疾病,临床表现为月经稀发、不孕、高雄激素及卵巢多囊样改变^[1-3],由 PCOS 导致的女性不孕约占女性不孕症的 20%^[4]。PCOS 的病因尚不清楚,近年来慢性亚临床炎症及氧化应激在 PCOS 的发生中受到广泛关注,研究表明 PCOS 患者存在慢性炎症的病理反应,卵巢局部炎性细胞增加,炎症反应明显^[5],具体作用机制尚不明确。颗粒细胞是卵巢重要组成部分,对卵泡的发育成熟及排卵至关重要,颗粒细胞功能异常是引起 PCOS 的主要病理生理基础^[3]。前期研究发现,PCOS 大鼠模型卵巢颗粒细胞结构损伤,激素合成功能异常^[6]。

Chemerin 是近年新发现的脂肪细胞因子,与脂肪细胞分化、炎症反应及糖脂代谢等生物学行为相关^[7],并在炎症反应和免疫应答中发挥重要作用^[8]。有研究发现 Chemerin 与其配体 CMKLR1 在 PCOS 患者及 PCOS 大鼠模型中表达明显增高,与 PCOS 的发生存在密切关系^[9-10]。本实验选择人卵巢颗粒细胞 COV434 细胞作为研究对象,探讨 Chemerin 基因对 COV434 细胞增殖、凋亡以及细胞周围炎性因子的影响,为研究 PCOS 的发病机制提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要材料和试剂

COV434 细胞购于北京北纳创联生物技术研究院,慢病毒载体 Chemerin shRNA、Chemerin 过表达慢病毒载体购于上海吉玛制药技术有限公司,Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购于南京凯基生物,ELISA 试剂盒购于博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 COV434 细胞在含有 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液中培养,孵箱设置温度 37 ℃,CO₂ 浓度为 5%。将细胞分为 2 组,分别下调和过表达 Chemerin 基因。各组内又分别分为实验组和阴性对照组。LV3-shChemerin-1 和 LV3-shChemerin-2 为下调 Chemerin 组, LV3-NC 为对照组。LV5-Chemerin 为过表达 Chemerin 组, LV5-NC 为对照组。

1.2.2 细胞转染实验 将卵巢颗粒细胞 COV434 接种于 6 孔板, 1.0×10^5 细胞/孔, 每孔 100 μ L。当细胞达到 30%~50% 融合时,用慢病毒载体携带的 siRNA 感染 COV434 细胞,最

终浓度为 5 nmol/L。同时加入 polybrene 增强感染率。48 h 后换液,传代。

1.2.3 ELISA 测定 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 浓度 各组 COV434 细胞生长至对数期,接种于 6 孔板内,培养 48 h 后,改用无血清培养基培养 24 h,取培养液。采用 ELISA 法测定培养液中测定 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 浓度。具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.4 EdU 增殖实验 各组 COV434 细胞分别接种于 24 孔板至细胞正常生长阶段,每孔加入 200 μ L 50 μ mol/L EdU 培养基,细胞培养箱内孵育 2 h, PBS 清洗。多聚甲醛固定细胞,室温孵育 10 min。加入 200 μ L 浓度 2 mg/mL 的甘氨酸孵育 5 min 后, PBS 摇床清洗 5 min。每孔加入 100 μ L 含 0.5% 的 TritonX-100 的 PBS,脱色摇床孵育 10 min, PBS 洗 2 次,每次 5 min。Apollo 室温避光染色 30 min, 1xHoechst 33342 DNA 染色液室温避光孵育 20 min。PBS 清洗后荧光显微镜下拍照计数,分析结果。

1.2.5 流式细胞测定细胞凋亡 取对数期生长的 COV434 细胞接种于 6 孔板内,各组均培养 24 h 后终止培养,收集细胞。Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。定量数据结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析,总体有差异的情况下组间两两比较采用 LSD- t 法分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

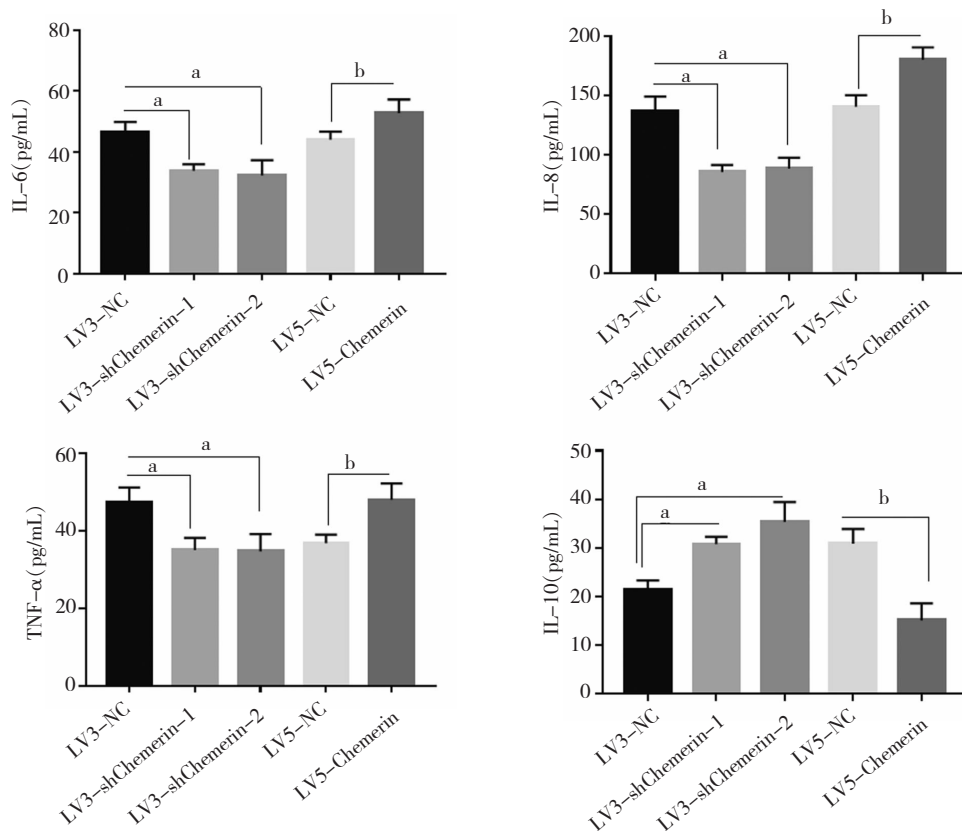
2 结果

2.1 Chemerin 对细胞培养液炎性因子浓度的影响

炎性因子 IL-6、IL-8 及 TNF- α 浓度在下调组 (LV3-shChemerin-1、LV3-shChemerin-2) 中较阴性对照组 (LV3-NC) 明显降低,差异有统计学意义 ($F_{IL-6}=13.545, P_{IL-6}=0.006$; $F_{IL-8}=27.974, P_{IL-8}=0.001$; $F_{TNF-\alpha}=10.283, P_{TNF-\alpha}=0.012$); 抗炎因子 IL-10 浓度在下调组 (LV3-shChemerin-1、LV3-shChemerin-2) 中较阴性对照组 (LV3-NC) 明显升高,差异有统计学意义 ($F=20.145, P=0.002$)。如图 1, 表 1 所示。炎性因子 IL-6、IL-8 及 TNF- α 浓度在过表达组 (LV5-Chemerin) 中较阴性对照组 (LV5-NC) 明显升高,差异有统计学意义 ($t_{IL-6}=2.097, P_{IL-6}=0.044$; $t_{IL-8}=4.854, P_{IL-8}=0.008$; $t_{TNF-\alpha}=4.078, P_{TNF-\alpha}=0.015$; $t_{IL-10}=5.942, P_{IL-10}=0.004$)。抗炎因子 IL-10 浓度在过表达组 (LV5-Chemerin) 中较阴性对照组 (LV5-NC) 明显降低,差异有统计学意义 ($t=5.942, P=0.004$)。如图 1, 表 1 所示。

2.2 Chemerin 促进 COV434 细胞增殖

Chemerin 对 COV434 细胞增殖能力有明显影响。下调 Chemerin 基因后,与阴性对照组 LV3-NC 相比,实验组 LV3-shChemerin-1、LV3-shChemerin-2 细胞增殖能力明显降低



a: 与对照组 LV3-NC 相比, $P < 0.05$; b: 与对照组 LV5-NC 相比, $P < 0.05$

图 1 细胞培养液中 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 浓度

表 1 细胞培养液中 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 浓度 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

	组别	浓度 (pg/mL)	F/t 值	P 值
IL-6	LV3-NC	46.517 $\pm$ 1.926	13.545	0.006
	LV3-shChemerin-1	33.843 $\pm$ 1.215 ^a		
	LV3-shChemerin-2	28.992 $\pm$ 4.392 ^b		
	LV5-NC	44.050 $\pm$ 1.501	2.907	0.044
	LV5-Chemerin	56.077 $\pm$ 1.225		
IL-8	LV3-NC	52.162 $\pm$ 2.134	27.974	0.001
	LV3-shChemerin-1	35.942 $\pm$ 2.657 ^c		
	LV3-shChemerin-2	34.397 $\pm$ 4.517 ^d		
	LV5-NC	44.940 $\pm$ 1.809	4.854	0.008
	LV5-Chemerin	60.351 $\pm$ 4.489		
TNF- α	LV3-NC	47.352 $\pm$ 2.246	10.283	0.012
	LV3-shChemerin-1	35.075 $\pm$ 1.834 ^e		
	LV3-shChemerin-2	34.776 $\pm$ 2.572 ^f		
	LV5-NC	36.942 $\pm$ 1.233	4.078	0.015
	LV5-Chemerin	48.066 $\pm$ 2.433		
IL-10	LV3-NC	30.534 $\pm$ 2.545	20.145	0.002
	LV3-shChemerin-1	55.741 $\pm$ 2.239 ^g		
	LV3-shChemerin-2	53.115 $\pm$ 4.906 ^h		
	LV5-NC	37.624 $\pm$ 1.874	5.942	0.004
	LV5-Chemerin	26.983 $\pm$ 2.838		

注: a, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-6}=0.005$; b, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-6}=0.003$; c, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-8}=0.001$; d, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-8}=0.001$; e, 与 LV3-NC 比, $P_{TNF-\alpha}=0.008$; f, 与 LV3-NC 比, $P_{TNF-\alpha}=0.007$; g, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-10}=0.006$; h, 与 LV3-NC 比, $P_{IL-10}=0.001$

($F=9.115, P=0.004$) (图 2, 表 2)。上调 Chemerin 基因后, 与阴性对照组 LV5-NC 相比, 实验组 LV5-Chemerin 细胞增殖能力明显增强 ($t=3.161, P=0.013$) (图 2, 表 2)。

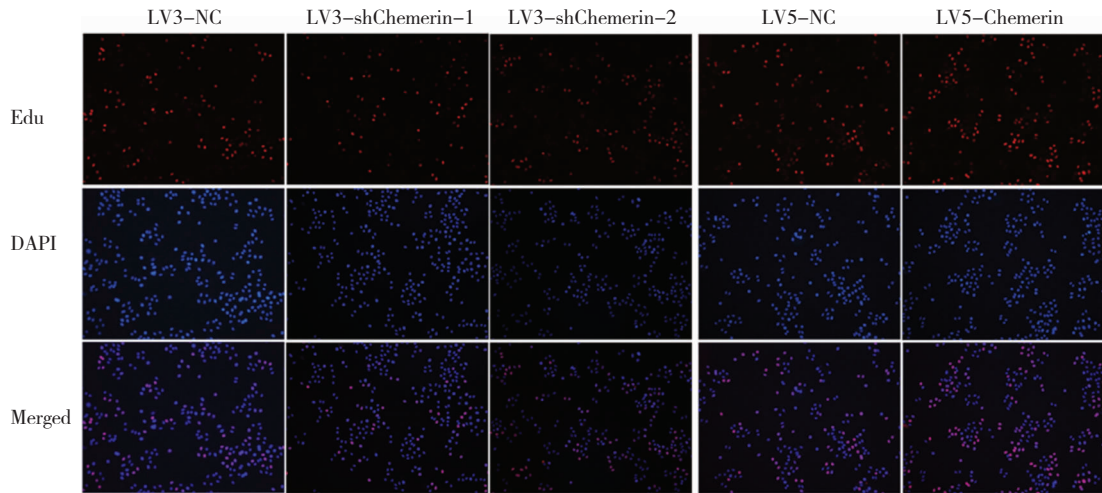
表 2 COV434 细胞 Edu 细胞阳性率 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	Edu 细胞阳性率 (%)	F/t 值	P 值
下调组 LV3-NC	31.480 $\pm$ 0.935	9.115	0.004
LV3-shChemerin-1	25.340 $\pm$ 1.709 ^a		
LV3-shChemerin-2	25.362 $\pm$ 0.572 ^b		
上调组 LV5-NC	30.900 $\pm$ 1.747	3.161	0.013
LV5-Chemerin	38.380 $\pm$ 1.596		

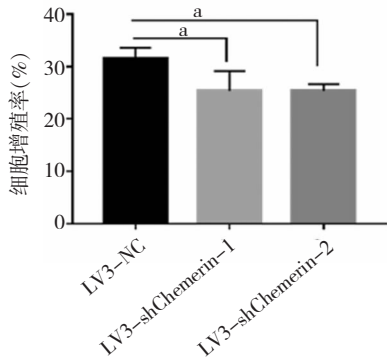
注: a, 与 LV3-NC 比, $P=0.003$; b, 与 LV3-NC 比, $P=0.003$

2.3 Chemerin 抑制 COV434 细胞凋亡

流式细胞结果显示, 下调 Chemerin 基因后, 与阴性对照组 LV3-NC [凋亡率为 (1.020 $\pm$ 0.020)%] 相比, 实验组 LV3-shChemerin-1 及 LV3-shChemerin-2 的细胞凋亡率分别为 (9.800 $\pm$ 0.264)%、(10.087 $\pm$ 0.562)%, 差异有统计学意义 ($F=206.474, P=0.000$) (图 3, 表 3); 上调 Chemerin 基因后, 与阴性对照组 LV5-NC [凋亡率为 (1.167 $\pm$ 0.044)%] 相比, 实验组 LV5-Chemerin 组凋亡率为 (1.010 $\pm$ 0.015)%, 差异有统计学意义 ($P=0.029$) (图 3, 表 3)。

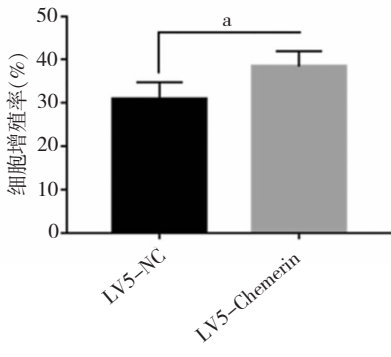


A. Edu 检测各组 COV434 细胞增殖能力结果



a: $P < 0.05$

B. Chemerin 基因下调组 COV434 细胞 Edu 阳性率



C. Chemerin 基因过表达组 COV434 细胞 Edu 阳性率

图 2 Edu 检测 Chemerin 对 COV434 细胞增殖能力影响 (200 ×)

表 3 流式细胞检测 COV434 细胞凋亡率 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率 (%)	F/t 值	P 值
下调组 LV3-NC	1.020 ± 0.0208		
LV3-shChemerin-1	9.800 ± 0.264 ^a	206.474	0.000
LV3-shChemerin-2	10.087 ± 0.562 ^b		
上调组 LV5-NC	1.167 ± 0.045	3.307	0.030
LV5-Chemerin	1.010 ± 0.015		

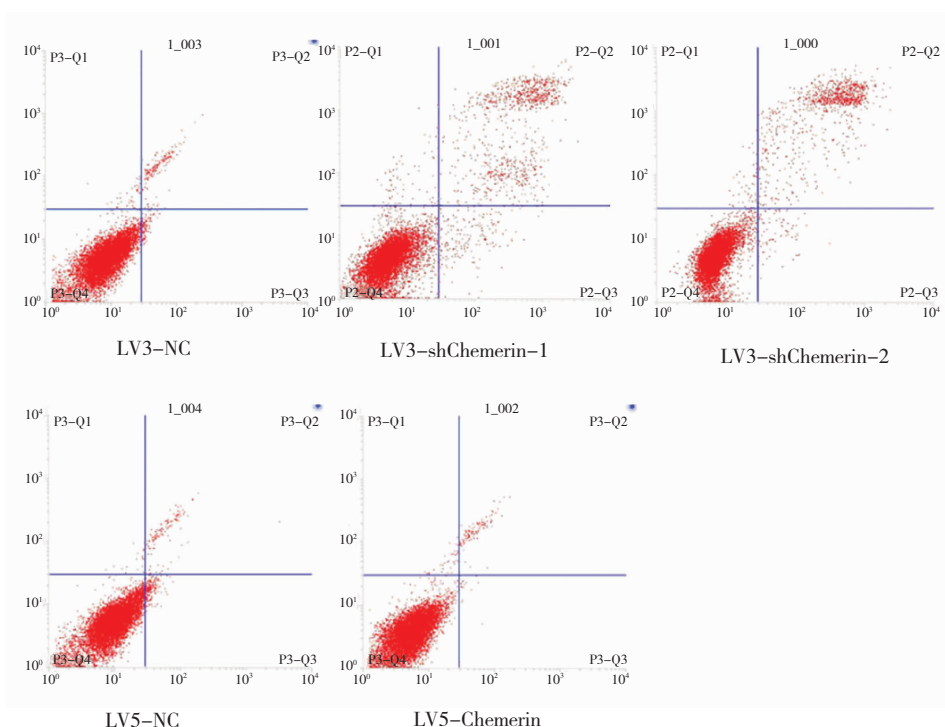
注: a, 与 LV3-NC 比, $P=0.000$; b: 与 LV3-NC 比, $P=0.000$

3 讨论

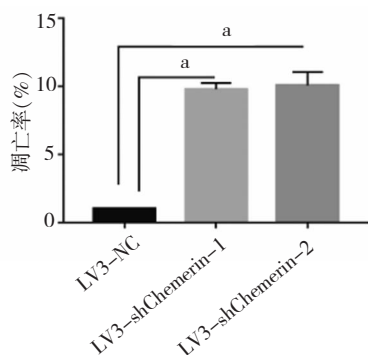
近年研究发现,慢性炎症参与较多疾病如系统性红斑狼疮、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病及 PCOS 的发生^[11-13]。PCOS 患者存在慢性炎症的病理生理过程,且卵巢局部存在明显炎症反应。多项研究报道 PCOS 患者体内 CRP、IL-6、IL-8、TNF- α 等

炎症因子水平上升,IL-10、APN 等抗炎因子水平下降,卵巢局部巨噬细胞、淋巴细胞等浸润增加^[2,14]。

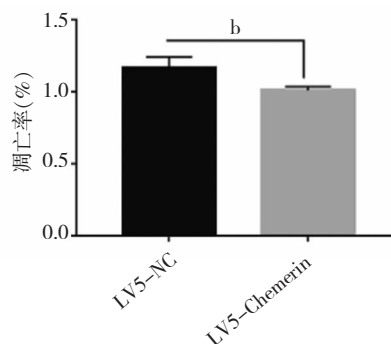
研究报道 PCOS 人体及大鼠模型血清中 Chemerin 水平明显增高^[9-10],体外培养卵巢颗粒细胞发现,重组 Chemerin 可减少类固醇激素合成与分泌^[15-16],提示 Chemerin 在 PCOS 发生中扮演重要角色。但 Chemerin 在 PCOS 的发生中是否与卵巢颗粒细胞的炎症反应有关目前尚不清楚。本实验以卵巢颗粒细胞 COV434 为研究对象,通过改变 Chemerin 表达水平,测定细胞周围炎症因子浓度,发现炎症因子 IL-6、IL-8 及 TNF- α 浓度在 Chemerin 下调组中较阴性对照组明显降低,在 Chemerin 过表达组中较阴性对照组明显升高,而抗炎因子 IL-10 浓度在 Chemerin 下调组中较阴性对照组明显升高,在 Chemerin 过表达组中较阴性对照组明显降低,差异均有统计学意义。既往研究已经证实,Chemerin 扮演着促炎或抗



A. 流式细胞检测各组 COV434 细胞凋亡结果

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.001$

B. Chemerin 基因下调组 COV434 细胞凋亡率



C. Chemerin 基因过表达组 COV434 细胞凋亡率

图 3 凋亡实验检测 Chemerin 对 COV434 细胞凋亡能力影响

炎 2 种不同的角色。重组人血清 Chemerin 可以促进免疫系统中表达 CMKLR1 的各种效应细胞(前体 B 淋巴细胞、巨噬细胞、不成熟的浆细胞样树突状细胞、自然杀伤细胞等)向炎症反应部位迁移。采用 Chemerin 处理 THP-1 源性巨噬细胞后培养液中促炎因子 $\text{TNF-}\alpha$ 浓度升高,而抗炎因子 IL-10 浓度降低,发现 Chemerin 刺激树突状细胞后能促炎症因子 IL-6、IL-8、 $\text{TNF-}\alpha$ 释放,并能抑制抗炎 M2 巨噬细胞反应,导致炎症性肠病的发生^[18]。最近发现在肿瘤条件培养液中培养巨噬细胞时加入鼠重组 Chemerin 能够增加促炎症因子 IL-1 β 、 $\text{TNF-}\alpha$ 的释

放^[17]。因此,推测 Chemerin 可促进细胞周围炎症因子分泌,引起卵巢颗粒细胞炎症反应,这可能是 Chemerin 参与 PCOS 发生的机制之一。

目前的研究发现,炎症因子对人及动物的颗粒细胞及卵泡膜细胞增殖、凋亡及内分泌功能有明显影响。Machelon 等通过对人排卵前卵泡颗粒细胞体外研究发现,IL-6 可刺激颗粒细胞增殖、促进优势卵泡形成和排卵^[19],而在鼠类,IL-6 可抑制颗粒细胞合成类固醇激素^[20]。体外培养卵泡膜细胞时加入炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$,细胞呈剂量依赖性增殖,这种效应可能是通过刺激细胞 G0/G1 周期转化完成^[21],Ko-

robowicz^[22]发现炎症因子可通过激活 JNK 等信号通路来影响细胞增殖和凋亡。而本研究发现,体外培养 COV434 细胞,在下调 Chemerin 基因后,细胞增殖能力降低,凋亡增加;上调 Chemerin 基因后,细胞增殖能力上升,凋亡降低。因此认为 Chemerin 可能影响卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡,同时前面的研究已经发现 Chemerin 可能影响炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF- α 的表达,因此推测该现象可能与上调 Chemerin 基因后,细胞培养液中炎症因子如 IL-6、TNF- α 增加有关。

综上所述,Chemerin 在 PCOS 的发生中可能通过炎症反应影响颗粒细胞功能,但是 Chemerin 是通过何种信号途径调控炎症因子的分泌,从而影响卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡,尚需进一步的研究,但是 Chemerin 在 PCOS 的研究可能为其发病机制的研究提供了更多的实验依据,并为 PCOS 的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Tan BK, Chen J, Farhatullah S, et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin[J]. *Diabetes*, 2009, 58(9): 1971-1977.
- [2] Fulghesu AM, Sanna F, Uda S, et al. IL-6 serum levels and production is related to an altered immune response in polycystic ovary syndrome girls with insulin resistance[J]. *Mediators Inflamm*, 2011, 2011: 389317.
- [3] Adams J, Liu Z, Ren YA, et al. Enhanced inflammatory transcriptome in the granulosa cells of women with polycystic ovarian syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(9): 3459-3468.
- [4] Homburg R. Should patients with polycystic ovarian syndrome be treated with metformin? A note of cautious optimism[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(4): 853-856.
- [5] Ghowsi M, Khazali H, Sisakhtnezhad S. Evaluation of TNF- α and IL-6 mRNAs expressions in visceral and subcutaneous adipose tissues of polycystic ovarian rats and effects of resveratrol[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 21(2): 165-174.
- [6] 李 聪, 王炼炼, 胡小靖. 高脂喂养下大鼠卵巢颗粒细胞的功能变化[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(2): 172-175.
- [7] Helfer G, Wu QF. Chemerin a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders[J]. *Journal of Endocrinology*, 2018, 238(2): 79-94.
- [8] Dimitriadis GK, Kaur J, Adya R, et al. Chemerin induces endothelial cell inflammation activation of nuclear factor- κ beta and monocyte-endothelial adhesion[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(24): 16678-16690.
- [9] Guvenç Y, Var A, Goker A, et al. Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *J Int Med Res*, 2016, 44(4): 796-805.
- [10] Wang Q, Kim JY, Xue K, et al. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5600-5611.
- [11] Jiang CR, Li TH. Circulating UCA1 is highly expressed in patients with systemic lupus erythematosus and promotes the progression through the AKT pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(8): 2364-2371.
- [12] Chen H, Shi B, Feng X, et al. Leptin and neutrophil-activating peptide 2 promote mesenchymal stem cell senescence through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2015, 67(9): 2383-2393.
- [13] Lee KH, Lee CH, Woo J, et al. Cigarette smoke extract enhances IL-17A-induced IL-8 production via up-regulation of IL-17R in human bronchial epithelial cells[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(4): 282-289.
- [14] Xiong YL, Liang XY, Yang X, et al. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 159(1): 148-150.
- [15] Reverchon M, Bertoldo MJ, Rame C, et al. CHEMERIN (RAR-RES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(5): 102.
- [16] Reverchon M, Cornuau M, Rame C, et al. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(6): 1790-1800.
- [17] Rama D, Esendagli G, Guc D. Expression of chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) on J744A.1 macrophages co-cultured with fibroblast and/or tumor cells: modeling the influence of microenvironment[J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(1): 134-140.
- [18] Lin Y, Yang X, Yue W, et al. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization[J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(4): 355-366.
- [19] Kawasaki F, Kawano Y, Kosay Hasan Z, et al. The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids[J]. *Clin Exp Med*, 2003, 3(1): 27-31.
- [20] Sun WS, Imai A, Tagami K, et al. *In vitro* stimulation of granulosa cells by a combination of different active ingredients of unkei-to[J]. *Am J Chin Med*, 2004, 32(4): 569-578.
- [21] Banas M, Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B. The role of tumor necrosis factor and interleukin-6 in polycystic ovary syndrome[J]. *Pol Merkuri Lekarski*, 2006, 21(125): 489-491.
- [22] Korobowicz A. Biology of tumor necrosis factor type alpha (TNF- α) [J]. *Pol Merkuri Lekarski*, 2006, 21(124): 358-361.

(责任编辑: 冉明会)